



**HAL**  
open science

# Rôle des récepteurs autophagiques dans la maturation des autophagosomes

Pauline Verlhac

► **To cite this version:**

Pauline Verlhac. Rôle des récepteurs autophagiques dans la maturation des autophagosomes. Biologie cellulaire. Université de Lyon, 2016. Français. NNT : 2016LYSE1138 . tel-01540361

**HAL Id: tel-01540361**

**<https://theses.hal.science/tel-01540361>**

Submitted on 16 Jun 2017

**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.



N°d'ordre NNT : 2016LYSE1138

## THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON

opérée au sein de

**l'Université Claude Bernard Lyon 1**

**Ecole Doctorale N° 340**

**Biologie Moléculaire Intégrative et Cellulaire**

**Spécialité de doctorat** : Biologie Cellulaire et Infectiologie

**Discipline** : Sciences du vivant

Soutenue publiquement le 20/09/2016, par :

**Pauline VERLHAC**

---

# **Rôle des récepteurs autophagiques dans la maturation des autophagosomes**

---

Devant le jury composé de :

Dr Martine BIARD-PIECHACZYK	Directrice de Recherche au CNRS	Rapporteur
Dr Hang NGUYEN	Chargée de Recherche à l'Inserm	Rapporteur
Pr Marc LECUIT	Professeur à l'Université Paris Descartes	Examineur
Dr Renaud LEGOUIS	Directeur de Recherche à l'Inserm	Examineur
Pr Renaud MAHIEUX	Professeur à l'ENS Lyon	Examineur
Pr Mathias FAURE	Professeur à l'Université Claude Bernard Lyon 1	Directeur de thèse

## UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

### **Président de l'Université**

Président du Conseil Académique

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil Formation et Vie  
Universitaire

Vice-président de la Commission Recherche

Directeur Général des Services

**M. le Professeur Frédéric FLEURY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Didier REVEL

M. le Professeur Philippe CHEVALIER

M. Fabrice VALLÉE

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

Directeur : Mme la Professeure A-M. SCHOTT

Département de formation et Centre de Recherche en  
Biologie Humaine

### **COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE**

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. THEVENARD

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme C. FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur G. TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. le Professeur J-C 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. le Professeur E. PERRIN

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. LEBOISNE

## Remerciements

J'aimerais tout d'abord remercier les membres de mon jury et tout particulièrement les docteurs Martine Biard et Hang Nguyen pour leur relecture et leur évaluation de ce manuscrit et de ce travail.

Merci à l'Ecole Normale Supérieure de Lyon et au Ministère de l'Education Nationale, de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche pour m'avoir soutenue financièrement pendant ces 4 ans.

Je tiens à remercier le professeur Mathias Faure pour m'avoir accueillie au sein de son équipe au cours de cette thèse qui m'aura passionnée de bout en bout. Merci Mathias pour ton encadrement et ta patience au cours de ces 4 ans et pour tous les conseils que tu continues de me donner. Je suis très contente d'avoir pu travailler sur ce projet et d'avoir tant appris sous ta direction. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir poussée à toujours donner le meilleur et rien de moins. Et je te promets de prendre de mon temps et de ne pas parler trop vite.

Un grand merci à tous les membres passés et présents de l'équipe Autophagie, Infection, Immunité. Merci tout d'abord à Clémence Richetta qui m'a accueillie et formée alors qu'elle finissait sa propre thèse. Merci à Isabel Pombo-Grégoire qui a ouvert la voie à ce travail et m'a fait confiance pour le continuer. J'aimerais tout particulièrement remercier mes deux co-thésards, la désormais docteur Denitsa Petkova et Mathieu Clavière pour tous les moments, scientifiques ou non, passés ensemble. Merci à Joël Baguet pour ses conseils, ses remises au point au moment opportun, sa moustache et son humour. Merci à Aurore Rozières et Christophe Viret qui m'auront beaucoup appris depuis leur arrivée dans l'équipe par leurs nombreux conseils et discussions des résultats. Merci enfin à la toute dernière arrivée, Cécile Daussy pour son aide déjà précieuse.

Merci aussi à tous ceux que j'ai croisés dans la Tour Pasteur et au CIRI avec qui j'ai eu le plaisir d'échanger sur des sujets divers et variés.

Merci enfin à ma famille de sang et de cœur pour leur présence et leurs encouragements. Merci à mes parents et à mon petit frère qui ont toujours été là pour moi. Merci à mon oncle et ma tante qui m'ont ouvert la voie vers Lyon et une certaine école. Merci à Diane pour sa patience et son soutien. Merci à mes amis qui savent quand et comment me tirer loin de ma paillasse.

## Résumé / Abstract

### **Rôle des récepteurs autophagiques dans la maturation des autophagosomes**

---

La xénophagie est une forme d'autophagie sélective permettant de capturer des pathogènes dans les autophagosomes et de les dégrader dans les autolysosomes. Cette sélectivité est assurée par une famille de protéines ; les récepteurs autophagiques qui reconnaissent des substrats cytosoliques d'un côté et les membres de la famille LC3 ancrés dans la membrane de l'autophagosome de l'autre. Parmi ces récepteurs, NDP52 cible la bactérie *Salmonella* Typhimurium vers l'autophagie.

Nous décrivons un rôle nouveau et inattendu pour NDP52 ; assurer la maturation d'autophagosomes durant l'infection par *Salmonella* mais aussi durant l'autophagie basale. De manière intéressante, ce rôle de NDP52 dans la maturation est indépendant de son rôle dans le ciblage de la bactérie puisque ces fonctions nécessitent des domaines et des partenaires moléculaires de NDP52 distincts. Nous montrons aussi que d'autres récepteurs peuvent participer à la maturation comme Optineurine. Ce travail montre donc que NDP52 assure deux rôles durant la xénophagie en ciblant les bactéries vers les autophagosomes en formation puis en promouvant la maturation de l'autophagosome. De plus, nous proposons un possible mécanisme de régulation de ces deux fonctions par des modifications post-traductionnelles des récepteurs autophagiques.

Ce travail démontre que les récepteurs autophagiques jouent des rôles au-delà du ciblage des pathogènes qui sont aussi cruciaux pour une xénophagie efficace. De plus, les récepteurs autophagiques sont aussi nécessaires pour le déroulement de l'autophagie basale. Ces travaux offrent une nouvelle compréhension de la régulation moléculaire de l'autophagie et de la xénophagie.

### **A role for autophagic receptors in autophagosome maturation**

---

Xenophagy relies on the ability of the autophagy process to selectively entrap intracellular pathogens within autophagosomes to degrade them into autolysosomes. The selectivity of the process relies on proteins named autophagy receptors that share the ability to recognise cytosolic cargos on one hand and autophagosome-bound members of the ATG8 family on the other. Among autophagy receptors NDP52 has been described to target *Salmonella* Typhimurium to the growing autophagosome.

We describe a new unexpected role for NDP52, as this receptor also regulates the maturation of *Salmonella*-containing autophagosomes and during ongoing autophagy. Interestingly, the role of NDP52 in maturation is independent from its role in targeting as they rely on different binding domains and protein partners. We also show that other autophagy receptors also mediate autophagosome maturation such as Optineurin. Therefore, our work shows that NDP52 plays a dual function during xenophagy first by targeting bacteria to growing autophagosomes and then by assuring autophagosome maturation. Moreover, we also provide insights as to how these dual roles are regulated by post-translational modifications of autophagy receptors.

This work demonstrates that autophagy receptors have other roles beyond pathogen targeting that are also crucial for an efficient xenophagy. Moreover, autophagy receptors are also necessary for autophagy completion in uninfected cells. These results strengthen our understanding of both ongoing autophagy and xenophagy molecular mechanisms.

### **Mots clés / Keywords**

---

Mots clés : autophagie, xénophagie, récepteurs autophagiques, maturation autophagique, *Salmonella* Typhimurium

Keywords: autophagy, xenophagy, autophagy receptors, autophagosome maturation, *Salmonella* Typhimurium

### **Intitulé et adresse du laboratoire**

---

Centre International de Recherche en Infectiologie (CIRI)

Equipe Autophagie, Infection, Immunité

PI : Pr Mathias FAURE

INSERM U1111 – CNRS UMR5308

Université Lyon 1, ENS de Lyon

21 Avenue Tony Garnier - 69365 LYON cedex 07

## Table des matières

Table des matières.....	6
Table des illustrations.....	8
Liste des abréviations.....	9
Préambule .....	11
Chapitre 1 Introduction.....	13
1.1    L'autophagie .....	15
1.1.1    La macroautophagie.....	15
1.1.2    La microautophagie.....	16
1.1.3    L'autophagie médiée par les chaperonnes.....	17
1.2    Mécanismes moléculaires de l'autophagie.....	19
1.2.1    Origines du phagophore.....	26
1.2.2    Initiation.....	26
1.2.3    Induction et inhibition de l'autophagie.....	28
1.2.4    Elongation .....	31
1.2.5    Maturation .....	35
1.2.6    Myosine VI et autophagie .....	39
1.3    Autophagie sélective.....	41
1.3.1    Les récepteurs autophagiques .....	43
1.3.2    Les principes et types d'autophagie sélective .....	44
1.3.3    Le récepteur autophagique NDP52.....	48
1.4    Pathogènes intracellulaires et autophagie.....	50
1.4.1    Dégradation par autophagie : la xénophagie.....	50
1.4.2    Mécanismes d'échappement à l'autophagie.....	54
1.4.3    Détournement de l'autophagie .....	58
1.4.4    Autophagie non-canonique en contexte infectieux.....	62
1.5    Présentation du projet de recherche .....	65
Chapitre 2 Résultats.....	67
2.1    NDP52 régule la maturation des autophagosomes (article publié dans Cell Host & Microbe Volume 17, Issue 4, Avril 2015, p515).....	69

2.2	Rôle de RNF11 dans la maturation des autophagosomes (résultats supplémentaires, non publiés).....	94
2.2.1	Interaction de RNF11 avec des protéines de l'autophagie .....	94
2.2.2	RNF11 régule la prolifération de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	97
2.2.3	L'absence de RNF11 ne module pas le ciblage de <i>Salmonella</i> vers l'autophagie .....	98
2.2.4	L'absence de RNF11 régule négativement la maturation des autophagosomes.....	99
2.2.5	L'absence de RNF11 module l'ubiquitination de NDP52 .....	101
Chapitre 3 Discussion .....		105
3.1	Les récepteurs autophagiques, quels rôles durant l'autophagie ? .....	107
3.2	Un récepteur à deux fonctions : quelles régulations ?.....	109
3.3	A quelle étape de la maturation interviennent les récepteurs autophagiques ?.	110
Chapitre 4 Perspectives et Conclusion.....		113
4.1	L'implication des SLRs dans la maturation autophagique .....	115
4.2	Les SLRs dans l'autophagie canonique et non canonique.....	117
4.3	NDP52 et la maladie de Crohn .....	119
4.4	Conclusion.....	123
Références bibliographiques.....		124
Annexes .....		149
Annexe I .....		151
Annexe II .....		152
Annexe III .....		156
Annexe IV .....		161
Annexe V .....		164



## Table des illustrations

Figure 1: Les trois formes d'autophagie. ....	19
Figure 2 : Vue d'ensemble des étapes de l'autophagie et des complexes impliqués.....	20
Tableau 1 : Les protéines ATGs chez la levure et les mammifères .....	21
Figure 3 : L'initiation de l'autophagie .....	28
Figure 4 : Activation ou inhibition de l'autophagie.....	31
Figure 5 : Systèmes de conjugaison et élongation du phagophore .....	34
Figure 6 : Maturation de l'autophagosome.....	39
Figure 7 : L'autophagie sélective par les Sequestosome-Like Receptors .....	42
Figure 8 : Mitophagie .....	48
Figure 9 : Xénophagie de <i>Salmonella</i> Typhimurium.....	52
Figure 10 : Exemples de stratégies d'évitement de l'autophagie.....	57
Figure 11 : Exemples de stratégies de détournement de l'autophagie .....	60
Figure 12 : Exemples de stratégies de détournement de protéines impliquées dans l'autophagie .....	62
Figure 13 : Phagocytose associée à LC3 (LAP).....	64
Figure 14 : Interactions de RNF11 avec les protéines de l'autophagie .....	96
Figure 15 : Validation des siRNAs.....	97
Figure 16 : L'absence de RNF11 ou des mSLRs augmente la prolifération de <i>Salmonella</i> .....	98
Figure 17 : L'absence de RNF11 ne module pas le ciblage de <i>Salmonella</i> vers l'autophagie .....	99
Figure 18 : L'absence de RNF11 module l'autophagie basale.....	100
Figure 19 : L'absence de RNF11 régule négativement la maturation des autophagosomes....	101
Figure 20 : L'absence de RNF11 module l'ubiquitination de NDP52 .....	103
Figure 21 : Rôles de NDP52 dans la xénophagie contre <i>Salmonella</i> .....	117
Figure 22 : Les SLRs et l'initiation de l'autophagie sélective.....	119
Figure 23 : Implications de NDP52 dans la maladie de Crohn.....	122

## Liste des abréviations

ADN : acide désoxyribonucléique  
ADP : adénosine diphosphate  
Alfy: autophagy-linked FYVE  
AMP : adénosine monophosphate  
AMPK : AMP- activated protein kinase  
ARN : acide ribonucléique  
ATG : autophagy related  
ATP : adénosine triphosphate  
Bcl-2/XL : B-cell lymphoma 2/XL  
BNIP3 : BCL2/adenovirus E1B 19 kd-interacting protein 3  
CALCOCO 2/3: Calcium-binding and coiled-coil domain-containing protein 2/3  
CC : coiled-coil  
CLIR : non canonical LIR  
CMA : chaperonne mediated autophagy  
DFCP1 : double FYVE containing protein 1  
FIP200 : FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa  
FYVE: zinc finger domain dont le nom vient des protéines Fab 1 (yeast orthologue of PIKfyve), YOTB, Vac 1 (vesicle transport protein), and EEA1 (early endosome antigen 1)  
GABARAP : Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein  
GABARAPL1/2: GABARAP Like protein 1/2  
GFP : Green Fluorescent Protein  
GST : glutathione S-transferase  
GTP : guanine triphosphate  
HOPS : homotypic fusion and vacuole protein sorting  
JNK1 : c-Jun N-terminal protein kinase 1  
KIR : KEAP1(Kelch-like ECH-associated protein) interacting region  
LAMP1/2 : Lysosomal-associated membrane protein 1/2  
LC3A/B/C : contraction de MAP1LC3A/B/C, Microtubule-associated protein 1 light chain 3 isoform A/B/C  
LGG-1/2 : LC3 GABARAP and GATE16 family protein 1/2  
LIR : LC3 interacting region  
MAM: mitochondria-associated membranes  
mSLRs : désigne les SLRs impliqués dans la maturation des autophagosomes (NDP52, Optineurine et T6BP)  
NBR1 : neighbor of BRCA1 (breast cancer 1) gene 1

NDP52 : nuclear dot protein 52  
NF- $\kappa$ B : nuclear factor-kappa B  
PB1 : domaine Phox and Bem1  
PE : phosphatidyléthanolamine  
PH-BEACH : domaines Pleckstrin homology - beige and Chediak-Higashi syndrome  
PI3K : phosphoinositide 3-kinase  
PI3P : Phosphatidylinositol-3-phosphate  
PINK1 : PTEN (Phosphatase and TENsin homolog)-induced putative kinase 1  
PLEKHM1 : Pleckstrin homology domain-containing family M member 1  
RFP : Red Fluorescent Protein  
RILP : Rab Interacting Lysosomal Protein  
RNF11 : RING (really interesting new gene) finger protein 11  
SKICH : skeletal muscle and kidney-enriched inositol phosphatase carboxyl homology domain  
SLR: Sequestosome like receptor  
SNAP29 : Synaptosomal-associated protein 29  
SQSTM1 : Sequestosome-1  
T6BP : TRAF (TNF receptor-associated factor) 6 binding protein  
TAX1BP1 : Tax1 binding protein 1  
TBK1 : TANK (TRAF family member-associated NF- $\kappa$ B activator)-Binding Kinase 1  
TBS : domaine de liaison à TRAF6  
TECPR1 : Tectonin Beta-Propeller Repeat Containing 1  
TNF : tumor necrosis factor  
UBA : UBiquitin Associated  
UBAN : Ubiquitin Binding in ABIN (A20 binding and inhibitor of NF- $\kappa$ B) and NEMO (NF- $\kappa$ B Essential Modulator)  
ULK1 : Unc like kinase 1  
UVRAG : UV radiation resistance-associated gene protein  
VAMP : Vesicle-associated membrane protein  
VPS : Vacuolar protein sorting  
WIPI : WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein  
ZF : zinc finger  
ZZ : domaine liant deux ions zinc

## **Préambule**

L'autophagie est un mécanisme intracellulaire d'élimination et de recyclage des composants cellulaires délétères. Ce mécanisme fut décrit pour la première fois dans les années 50 mais est encore intensément étudié après avoir été presque oublié dans les années 80. Ce regain d'intérêt est dû au clonage des premiers gènes impliqués dans l'autophagie en 1997. Depuis, il a été montré que l'autophagie et les gènes qui l'orchestrent sont cruciaux pour l'homéostasie cellulaire et que tout dérèglement de l'autophagie peut conduire à des pathologies variées. De plus, l'autophagie est particulièrement vitale en contexte infectieux car elle représente la première ligne de défense cellulaire. Ainsi mes travaux de thèse se sont focalisés sur l'étude des mécanismes de régulation de l'autophagie en contexte sain et infectieux.

Au cours de ce manuscrit, je présenterai donc l'état des connaissances sur l'autophagie et ses liens avec les pathogènes intracellulaires. La liste des pathogènes présentés n'est pas exhaustive mais choisie afin de refléter au mieux les connaissances actuelles sur le sujet complexe de l'autophagie en contexte infectieux.



# **Chapitre 1 Introduction**



## 1.1 L'autophagie

Le terme « autophagie » vient du grec et signifie « se manger ». Derrière ce terme sont regroupés plusieurs mécanismes cellulaires permettant aux cellules eucaryotes de dégrader et de recycler leurs composants intracellulaires. Ces mécanismes, au nombre de 3, reposent tous sur l'activité protéolytique des lysosomes pour la dégradation de leurs substrats mais diffèrent par les voies de « livraison » utilisées. Ces 3 formes d'autophagie sont nommées macroautophagie, microautophagie et autophagie médiée par les chaperonnes (Figure 1).

### 1.1.1 La macroautophagie

La macroautophagie, plus communément appelée autophagie, fut la première forme d'autophagie à être découverte et décrite. Une particularité de ce processus est notamment la formation de vésicules à double-membrane appelées autophagosomes. Ces autophagosomes emprisonnent une partie du cytoplasme, fusionnent ensuite avec les lysosomes et ainsi dégradent leurs contenus à des fins de recyclage (Figure 1). La macroautophagie peut soit séquestrer du cytoplasme de manière aléatoire, soit être dirigée spécifiquement contre des cargos à dégrader comme des agrégats protéiques, des organites en fin de vie ou encore des pathogènes intracellulaires. Dans ce dernier cas, les cargos à dégrader sont reconnus par des protéines nommées récepteurs autophagiques qui ciblent alors ces cargos vers la machinerie autophagique (voir paragraphe 1.3).

La découverte de la macroautophagie remonte à la toute fin des années 1950, début des années 1960 avec les travaux de Clark et Novikoff puis d'Ashford et Porter (Ashford and Porter, 1962; Clark, 1957; Novikoff, 1959). De manière générale, cette découverte et les suivantes doivent beaucoup au développement de la microscopie électronique qui permit d'observer pour la première fois les ultrastructures cellulaires avec une précision inégalée (Eskelinen et al., 2011). Clark et Novikoff, tout d'abord, observèrent dans des cellules rénales de souris des mitochondries enfermées dans des compartiments vésiculaires et démontrèrent que ces vésicules contiennent des enzymes lysosomales (Clark, 1957; Novikoff, 1959). Quelques années plus tard, Ashford et Porter observèrent dans des hépatocytes de rats exposés au glucagon, des vésicules contenant des mitochondries et du réticulum en voie de digestion (Ashford and Porter, 1962). Novikoff et Essner démontrèrent également que ces vésicules contenaient aussi des hydrolases lysosomales (Novikoff and Essner, 1962).

Ce fut Christian de Duve qui le premier proposa le nom d'autophagie et d'autophagosomes en 1963 (De Duve, 1963). Le laboratoire de de Duve participa aussi aux premiers travaux qui démontrèrent que les autophagosomes ayant emprisonné du matériel cytoplasmique fusionnent ensuite avec les lysosomes et que ce processus a lieu dans les cellules de manière constitutive. Les études qui suivirent montrèrent que l'autophagie est un processus régulé par de nombreux stimuli comme l'absence ou la présence d'acides aminés. A la fin des



années 1980, les études ultrastructurales de l'équipe de Seglen permirent d'identifier le phagophore, qui donne l'autophagosome après élongation, mais aussi l'amphisome, vésicule intermédiaire issue de la fusion entre autophagosome et endosome (Gordon and Seglen, 1988; Seglen et al., 1990). Cependant de nombreuses inconnues persistent, certaines restant toujours débattues, comme la ou les membranes à l'origine du phagophore. Il en est de même pour la régulation moléculaire de l'autophagie ; les gènes et protéines impliqués restèrent longtemps inconnus, tout comme les mécanismes à l'œuvre. Néanmoins, la possibilité que l'autophagie puisse séquestrer du cytoplasme de manière aléatoire mais aussi de manière sélective est déjà envisagée. En effet les autophagosomes contenant des mitochondries ou du réticulum apparaissent vides de tout autre composant, indiquant une possible sélectivité.

Au début des années 1990 le groupe d'Ohsumi montre pour la première fois que l'autophagie peut être étendue à des organismes non mammifères avec non seulement la démonstration de la conservation morphologique de l'autophagie chez la levure mais surtout le premier crible génétique pour des mutants de levure ayant une autophagie défectueuse (Tsukada and Ohsumi, 1993). C'est ainsi que fut identifié en 1997 le premier gène impliqué dans l'autophagie, nommé *ATG1* pour « *autophagy-related* » (Matsuura et al., 1997). Cette découverte déclencha un intérêt grandissant pour l'autophagie et ses mécanismes. Aujourd'hui 36 *ATGs* ont été décrits chez la levure, certains avec leurs homologues mammifères, permettant ainsi une étude approfondie des mécanismes de régulations moléculaires de l'autophagie. Très vite les liens entre autophagie et pathologies humaines furent établis; cancers, maladies neurodégénératives, infectieuses ou inflammatoires, sont autant de pathologies où l'autophagie est dérégulée.

Néanmoins, il convient de signaler que le terme autophagie recouvre plusieurs mécanismes par lequel la cellule dégrade et recycle ses composants cytosoliques, et pas seulement la macroautophagie qui reste cependant la forme d'autophagie la plus étudiée

### **1.1.2 La microautophagie**

Contrairement à la macroautophagie, la microautophagie a lieu directement au niveau de la membrane du lysosome pour les cellules mammifères ou de la vacuole chez la levure, sans qu'il y ait formation de vésicules intermédiaires. Au cours de la microautophagie, une portion du cytoplasme est capturée par invagination de la membrane du lysosome ou de la vacuole (Figure 1). Cette invagination, aussi appelée tube autophagique, forme ensuite une vésicule dans la lumière du lysosome ou de la vacuole par scission membranaire. Tout comme la macroautophagie, la microautophagie peut séquestrer des portions du cytoplasme de manière aléatoire ou sélective. Si de Duve et Wattiaux décrivent les caractéristiques morphologiques du processus de la microautophagie en 1966 et lui donne son nom, il faudra

encore attendre plusieurs décennies avant que ne soient décrits les mécanismes moléculaires et membranaires participant à la microautophagie (De Duve and Wattiaux, 1966).

Tout comme la macroautophagie, la microautophagie peut être observée de manière constitutive ou bien suite à des stress cellulaires. Ainsi, une microautophagie sélective peut elle aussi être induite pour dégrader spécifiquement des organites endommagés. Cette microautophagie sélective fut décrite chez la levure avec 3 cibles possibles ; les peroxysomes avec la micropexophagie découverte à la fin des années 1990 (Sakai et al., 1998), des portions du noyau avec la microautophagie « piecemeal » (Roberts et al., 2003) et enfin les mitochondries avec la micromitophagie (Kissová et al., 2007) toutes deux décrites au début des années 2000 (Figure 1).

La microautophagie reste un mécanisme peu étudié, et ce essentiellement chez la levure. Il y a donc très peu de données disponibles sur son mécanisme moléculaire, surtout dans les cellules mammifères. Cependant, tout comme la macroautophagie, la microautophagie est sous contrôle du complexe TORC1 (Target Of Rapamycin Complex 1, mTORC1 chez les mammifères) (Dubouloz et al., 2005). L'absence de données moléculaires sur les mécanismes impliqués dans la microautophagie rend l'évaluation de son importance ou de son implication dans des pathologies humaines difficile. Cependant, il est possible que la microautophagie soit impliquée dans le développement de la maladie de Pompe, une myopathie fatale caractérisée par une accumulation de lysosomes anormalement volumineux et remplis de glycogènes dans les cellules musculaires. Une équipe américaine a développé un modèle de cette maladie *in vitro* par culture de myotubes murins observé. Dans ce modèle le glycogène s'accumule dans les lysosomes dans des structures rappelant les invaginations de la membrane lysosomale caractéristiques de la microautophagie (Takikita et al., 2009). Néanmoins, ce modèle semble imparfait dans sa reproduction de la maladie notamment par l'absence d'accumulation d'autophagosomes pourtant retrouvée dans les cellules musculaires des patients.

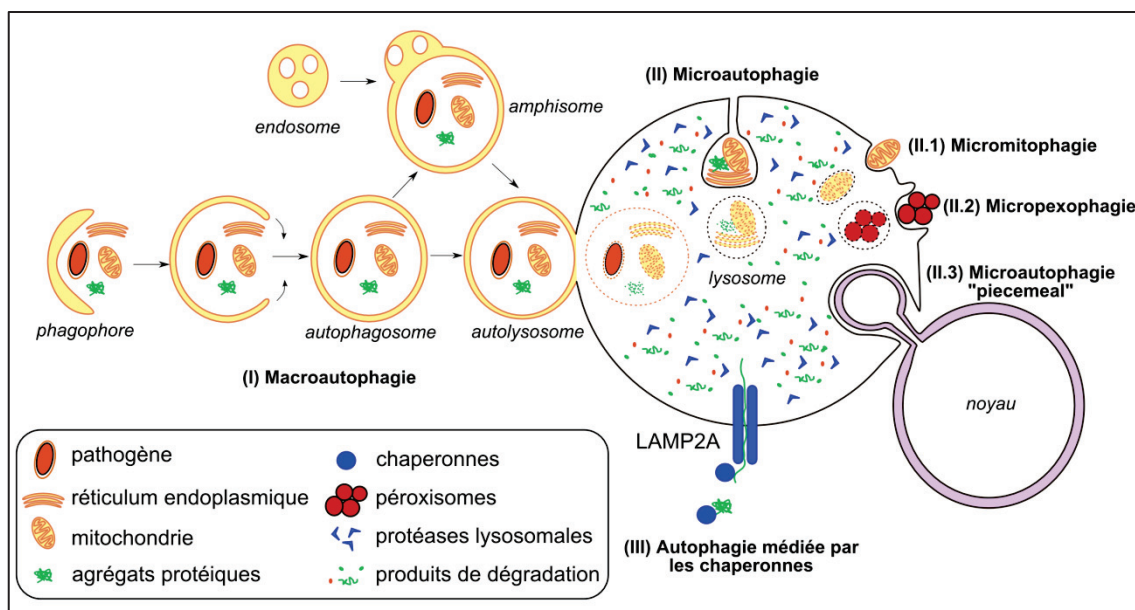
### 1.1.3 L'autophagie médiée par les chaperonnes

L'autophagie médiée par les chaperonnes se déroule elle aussi à la membrane même du lysosome (Figure 1). Cette troisième forme d'autophagie est exclusivement sélective et ne dégrade que des protéines ou agrégats de protéines. Cependant elle est aussi régulée par les apports en nutriments ou les « stress » de la cellule. Le mécanisme de l'autophagie médiée par les chaperonnes (ou CMA pour « Chaperonne Mediated Autophagy ») diffère grandement de celui des deux autres formes d'autophagie. En effet, il ne repose pas sur la formation d'une vésicule emprisonnant une portion du cytoplasme mais sur la translocation des protéines à dégrader à travers la membrane du lysosome. Les protéines à dégrader possèdent toutes le même motif d'acides aminés qui permet leur reconnaissance par un complexe de protéines chaperonnes comprenant Hsc70. Cette reconnaissance permet la liaison du substrat à la

surface du lysosome, sa linéarisation et sa translocation dans la lumière du lysosome menant à sa dégradation.

Dès les premières études sur l'autophagie et la dégradation lysosomale des protéines, l'existence d'un mécanisme permettant une dégradation rapide fut soupçonnée notamment grâce aux travaux de Dice en 1978 sur les différentes vitesses de protéolyse induite par le manque de nutriments (Dice et al., 1978). Les mécanismes de l'autophagie médiée par les chaperonnes furent découverts au cours des années 1980 avec par exemple l'identification du pentapeptide permettant la reconnaissance et la dégradation des substrats protéiques en 1988 par Chiang et Dice (Chiang and Dice, 1988) : KFERQ c'est-à-dire Lysine-Phénylalanine-Acide Glutamique-Arginine-Glutamine. Ce motif est reconnu par Hsc70 ce qui déclenche la linéarisation de la protéine et sa translocation à travers la membrane du lysosome. Cependant, la régulation de l'adressage des protéines contenant le motif KFERQ vers la CMA reste encore mal connue. Il se peut que les protéines à dégrader changent de conformation et révèlent le motif normalement caché par le repliement de la chaîne d'acides aminés (Kaushik and Cuervo, 2012). Une autre régulation pourrait impliquer des modifications post-traductionnelles des protéines ; il a été montré que l'acétylation et la phosphorylation du motif KFERQ peut déclencher la dégradation des protéines concernées par CMA (Lv et al., 2011; Thompson et al., 2009). Enfin la translocation des protéines à dégrader nécessite LAMP2A, un isoforme de LAMP2, et il semblerait que la régulation du flux de la CMA soit liée au niveau d'expression de LAMP2A (Cuervo and Dice, 1996, 2000). Il reste encore de nombreuses questions en suspens concernant le mécanisme de la CMA et sa régulation cependant son importance physiologique est déjà bien démontrée.

L'autophagie médiée par les chaperonnes est de plus en plus étudiée aujourd'hui car, comme les autres formes d'autophagies, elle est impliquée dans les réponses aux stress mais aussi dans des pathologies humaines et notamment dans des neuropathologies comme la maladie d'Alzheimer ou de Parkinson. En effet, les protéines tendant à former des agrégats dans ces maladies sont normalement éliminées par la macroautophagie mais aussi par la CMA et s'accumulent donc en cas de blocage de la CMA (Martinez-Vicente et al., 2008; Wang et al., 2009). Enfin, la modulation de la CMA a aussi été liée au traitement du lupus par un peptide de synthèse, le peptide P140 ; ce peptide réduit la production d'autoantigènes en inhibant LAMP2A mais aussi la formation du complexe de chaperonnes Hsc70 (Macri et al., 2015).



**Figure 1 : Les trois formes d'autophagie.**

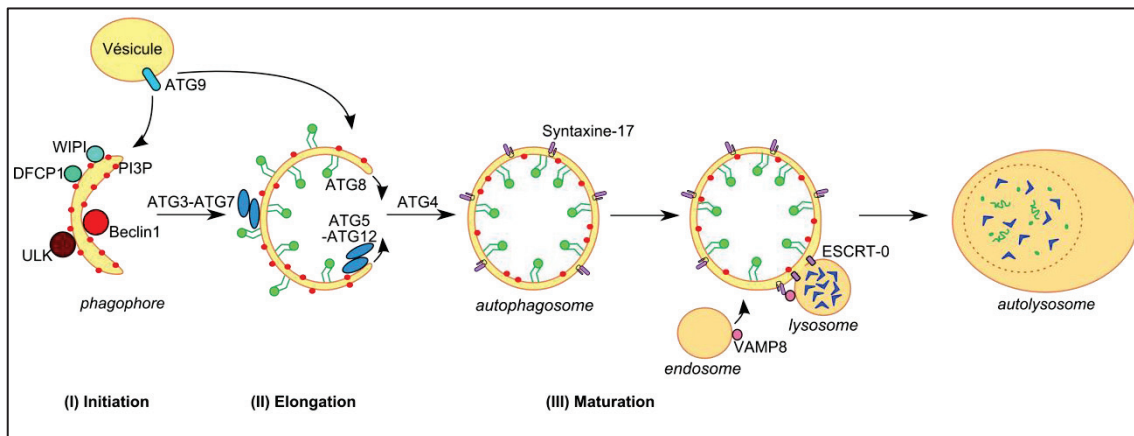
L'autophagie regroupe 3 mécanismes de dégradation intracellulaire dépendants du lysosome et hautement conservés chez les eucaryotes. **(I)** La macroautophagie nécessite la formation de vésicules intermédiaires, les autophagosomes, qui dégradent leur contenu en fusionnant avec le lysosome. Notons que les autophagosomes peuvent aussi fusionner avec des endosomes et former des amphisomes qui ensuite fusionneront avec les lysosomes. La macroautophagie permet de dégrader agrégats protéiques, organites et pathogènes. **(II)** La microautophagie a lieu par invagination de la membrane du lysosome et permet une dégradation rapide de protéine mais aussi de nombreuses organites comme les mitochondries **(II.1)**, les peroxysomes **(II.2)** mais aussi des portions du noyau **(II.3)**. **(III)** L'autophagie médiée par les chaperonnes ne permet que la dégradation de protéines et nécessite la reconnaissance de celles-ci par un complexe de chaperonnes pour aboutir à leur translocation dans la lumière du lysosome.

## 1.2 Mécanismes moléculaires de l'autophagie

La macroautophagie est la forme la plus étudiée d'autophagie et ne dérogeant pas à cette règle, le reste de ce manuscrit y est consacré. Le terme autophagie dans les paragraphes suivant ne désignera donc plus que la macroautophagie. De même, sauf mention contraire, nous ne mentionnerons plus ici que les mécanismes et protéines identifiées dans les cellules mammifères. Rappelons cependant que ces mécanismes et protéines sont extrêmement conservés entre les mammifères et la levure où ils furent généralement décrits en premier.

L'autophagie s'articule autour de 3 étapes ; l'initiation, l'élongation et l'étape finale, la maturation (Figure 2). Tout au long de ce mécanisme interviennent de nombreux complexes moléculaires qui permettent une régulation fine de l'autophagie à chacune de ces étapes (Figure 2). Les protéines et mécanismes moléculaires impliqués ont tout d'abord été décrits chez la levure ; ainsi les protéines identifiées furent nommées ATG (pour *autophagy-related*).

Cependant, la plupart des ATGs identifiés chez la levure trouvèrent très vite leurs homologues chez l'homme et les mammifères en général, démontrant une importante conservation de l'autophagie au cours de l'évolution. Dans ce manuscrit nous décrivons les mécanismes moléculaires de l'autophagie chez l'homme et les mammifères et utiliserons donc les noms usuels chez ces espèces des protéines impliquées. Néanmoins, dans un souci de clarté nous résumerons les fonctions des gènes et protéines ATG dans le Tableau 1 avec les homologues levure/mammifère ainsi que les principales publications les ayant décrits.



**Figure 2 : Vue d'ensemble des étapes de l'autophagie et des complexes impliqués**

Le mécanisme de l'autophagie repose sur la capture des substrats dans une vésicule à double membrane caractéristique, l'autophagosome, et leur dégradation par fusion de cette vésicule avec le lysosome. Le déroulement de l'autophagie est ainsi articulé en trois étapes : **(I)** l'initiation permet la formation du phagophore sous le contrôle des complexes ULK et Beclin 1 et nécessitant DFCP1 et WIPI, **(II)** l'élongation du phagophore se fait grâce à l'apport de lipides par des vésicules ATG9 positives et sous le contrôle de deux systèmes de conjugaison « ubiquitin-like » ATG5-ATG12 et ATG8. Enfin, l'étape finale de maturation **(III)** permet la fusion avec endosomes et lysosomes et nécessite l'action de la protéase ATG4 qui déconjugue toutes les protéines présentes sur la membrane externe de l'autophagosome mais aussi des facteurs d'attache et de fusion membranaire comme les SNARES Syntaxine-17, VAMP8 ou encore le complexe ECSRT-0.

**Tableau 1 : Les protéines ATGs chez la levure et les mammifères**

Levure	Mammifère	Fonction(s)	Référence(s)
Atg1	ULK1	Sérine/thréonine kinase participant à l'initiation de l'autophagie en complexe avec FIP200-ATG13-ATG101 chez les mammifères et Atg17-Atg13-Atg29-Atg31 chez la levure	(Ganley et al., 2009; Jung et al., 2009; Russell et al., 2013)
Atg2	ATG2A, ATG2B	Impliquée dans les mouvements d'Atg9/ATG9. Se lie à Atg18/WIPI et participe à la formation de l'autophagosome	(Kobayashi et al., 2012; Obara et al., 2008; Velikkakath et al., 2012; Watanabe et al., 2012)
Atg3	ATG3	Enzyme E2-like participant à la lipidation d'Atg8/LC3 durant l'élongation	(Ichimura et al., 2000)
Atg4	ATG4A, ATG4B, ATG4C, ATG4D	Protéase permettant la lipidation et délipidation d'ATG8 au cours de l'élongation	(Tanida et al., 2004; Yu et al., 2012)
Atg5	ATG5	Forme le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16 participant à l'élongation en lipidant ATG8	(Mizushima et al., 1998a)
Atg6	Beclin 1	Forme le complexe PI3K de classe III avec VPS34-ATG14 actif durant l'initiation	(Itakura et al., 2008; Liang et al., 1998, 1999)

Levure	Mammifère	Fonction(s)	Référence(s)
Atg7	ATG7	Enzyme E1-like participant à la conjugaison d'ATG5 et d'ATG8	(Mizushima et al., 1998a; Tanida et al., 2001)
Atg8	LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2	Protéines conjuguées à la phosphatidyléthanolamine (PE) sur le phagophore durant l'élongation. Nécessaires pour la formation de l'autophagosome	(Kirisako et al., 1999; Lang et al., 1998)
Atg9	ATG9	Seule ATG transmembranaire. Participe à l'apport de lipides au phagophore durant l'élongation	(Orsi et al., 2012; Papinski et al., 2014; Reggiori et al., 2004)
Atg10	ATG10	Enzyme E2-like participant à la conjugaison d'ATG5	(Nemoto et al., 2003; Shintani et al., 1999)
Atg11	non décrit (nd)	Protéine adaptatrice dans l'autophagie sélective chez la levure	(Mao et al., 2013; Yorimitsu and Klionsky, 2005)
Atg12	ATG12	Forme le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16 participant à l'élongation en lipidant ATG8	(Mizushima et al., 1998a, 1998b)
Atg13	ATG13	Membre du complexe ULK régulant l'initiation de l'autophagie avec ULK1-FIP200- -ATG101 chez les mammifères et Atg1-Atg17-Atg29-Atg31 chez la levure	(Ganley et al., 2009; Jung et al., 2009; Reggiori et al., 2004)

Levure	Mammifère	Fonction(s)	Référence(s)
Atg14	ATG14	Participe à l'initiation dans le complexe Beclin 1 mais aussi à la maturation avec Syntaxine-17 chez les mammifères	(Diao et al., 2015; Itakura et al., 2008)
Atg15	nd	Lipase impliquée dans la dégradation autophagique chez la levure	(Epple et al., 2001; Teter et al., 2001)
Atg16	ATG16L1, ATG16L2	Forme le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16 participant à l'élongation en lipidant ATG8	(Mizushima et al., 1998a, 1999)
Atg17	FIP200	Membre du complexe ULK régulant l'initiation de l'autophagie avec ULK1-ATG13 -ATG101 chez les mammifères et Atg1-Atg13-Atg29-Atg31 chez la levure	(Ganley et al., 2009; Jung et al., 2009; Reggiori et al., 2004)
Atg18	WIPI1	Participe aux étapes précoces de l'autophagie via l'apport de lipide	(Kobayashi et al., 2012; Obara et al., 2008; Proikas-Cezanne and Robenek, 2011; Watanabe et al., 2012)
Atg19	nd	Récepteur dans l'autophagie sélective chez la levure (« cytoplasm-to – vacuole targeting, CVT)	(Leber et al., 2001; Scott et al., 2001)
Atg20	nd	Appartient à aux néxines de tri, se lie à PI3P et participe ainsi à au CVT	(Nice et al., 2002)



Levure	Mammifère	Fonction(s)	Référence(s)
Atg21	WIPI2	Participe aux étapes précoces de l'autophagie en se liant à PI3P	(Dooley et al., 2014; Juris et al., 2015; Meiling-Wesse et al., 2004; Proikas-Cezanne and Robenek, 2011; Strømhaug et al., 2004)
Atg22	nd	Protéine membranaire de la vacuole chez la levure participant au recyclage des acides aminés durant l'autophagie induite	(Yang et al., 2006)
Atg23	nd	Protéine formant un complexe avec Atg9-Atg27, participe à la formation du phagophore	(Tucker et al., 2003)
Atg24 (SNX4)	nd	Néxine de tri formant un complexe avec Atg20	(Nice et al., 2002)
Atg26	nd	Glucuronosyltransférase impliquée dans l'autophagie chez certaines levures	(Cao and Klionsky, 2007; Warnecke et al., 1999)
Atg27	nd	Protéine membranaire participant à l'apport de lipide au phagophore avec Atg9	(Wurmser and Emr, 2002; Yen et al., 2007)
Atg29	nd	Interagit avec Atg17 dans l'équivalent du complexe ULK levure (Atg1)	(Kawamata et al., 2005, 2008)
Atg31	nd	Membre de l'équivalent du complexe ULK levure (Atg1)	(Kabeya et al., 2007; Kawamata et al., 2008)

Levure	Mammifère	Fonction(s)	Référence(s)
Atg32	nd	Protéine de la mitochondrie participant à la mitophagie chez la levure	(Kanki et al., 2009a)
Atg33	nd	Protéine de la mitochondrie participant à la mitophagie chez la levure	(Kanki et al., 2009b)
Atg34	nd	Paralogue d'Atg19	(Suzuki et al., 2010)
Atg36	nd	Participe à la pexophagie chez la levure	(Motley et al., 2012)
Atg38	nd	Maintient le complexe PI3K intact durant l'initiation de l'autophagie chez la levure	(Araki et al., 2013)
Atg39	nd	Récepteur participant à l'autophagie du réticulum et du noyau chez la levure	(Mochida et al., 2015)
Atg40	nd	Récepteur participant à l'autophagie du réticulum et du noyau chez la levure, similaire à FAM134B chez l'homme	(Mochida et al., 2015)
Atg41	nd	Fonction mal connue, régulerait la formation des autophagosomes	(Yao et al., 2015)
nd	ATG101	Participe au complexe ULK mammifère en se liant à ATG13	(Dooley et al., 2014)

### 1.2.1 Origines du phagophore

Dès les débuts de la recherche sur l'autophagie, une question cruciale qui émergea fut celle de l'origine du phagophore permettant la formation de l'autophagosome. Les premières observations montrèrent que le phagophore a une composition unique, il est notamment très pauvre en protéines (Réz and Meldolesi, 1980). Plusieurs théories existent, soit le phagophore est assemblé *de novo* soit il est dérivé d'une membrane préexistante. Les données actuelles semblent soutenir ce dernier modèle mais un obstacle majeur dans l'identification d'un organelle source est de le distinguer d'un organelle simplement ciblé par l'autophagie.

Malgré ces obstacles, le réticulum endoplasmique fut rapidement soupçonné comme étant une des sources de membrane donnant naissance au phagophore (Dunn, 1994; Kovács et al., 2000). Depuis il est admis que le réticulum et particulièrement des sous-domaines du réticulum appelés omégasomes (Figure 3) sont la source principale de membranes pour l'autophagie (Hayashi-Nishino et al., 2009; Ylä-Anttila et al., 2009). Cependant de nombreuses autres sources potentielles ont été identifiées au cours des années : les contacts mitochondrie-réticulum (Mitochondria-Associated Membranes, MAM, Figure 3) (Hailey et al., 2010), l'appareil de Golgi (Novikoff et al., 1971; Yen et al., 2010) ou la membrane plasmique (Ravikumar et al., 2010). De manière intéressante, il semblerait que suivant la nature du signal activateur de l'autophagie, le site d'assemblage des complexes d'initiation varie ; ainsi le réticulum semble être la source principale de membranes pour le phagophore en cas de manque de nutriments (Hayashi-Nishino et al., 2009).

D'après les données actuelles, les mécanismes moléculaires donnant lieu à l'émergence du phagophore reposent sur l'assemblage des complexes de l'initiation (voir paragraphe 1.2.2) sur des domaines membranaires particuliers (omégasomes ou MAM) qui ensuite donneront le phagophore après détachement de l'organelle source. De nombreuses questions restent cependant en suspens ; quelles sont exactement les compositions uniques en lipides et protéines du phagophore et d'où viennent-elles ? Comment se détache la portion de membrane à l'origine du phagophore ?

### 1.2.2 Initiation

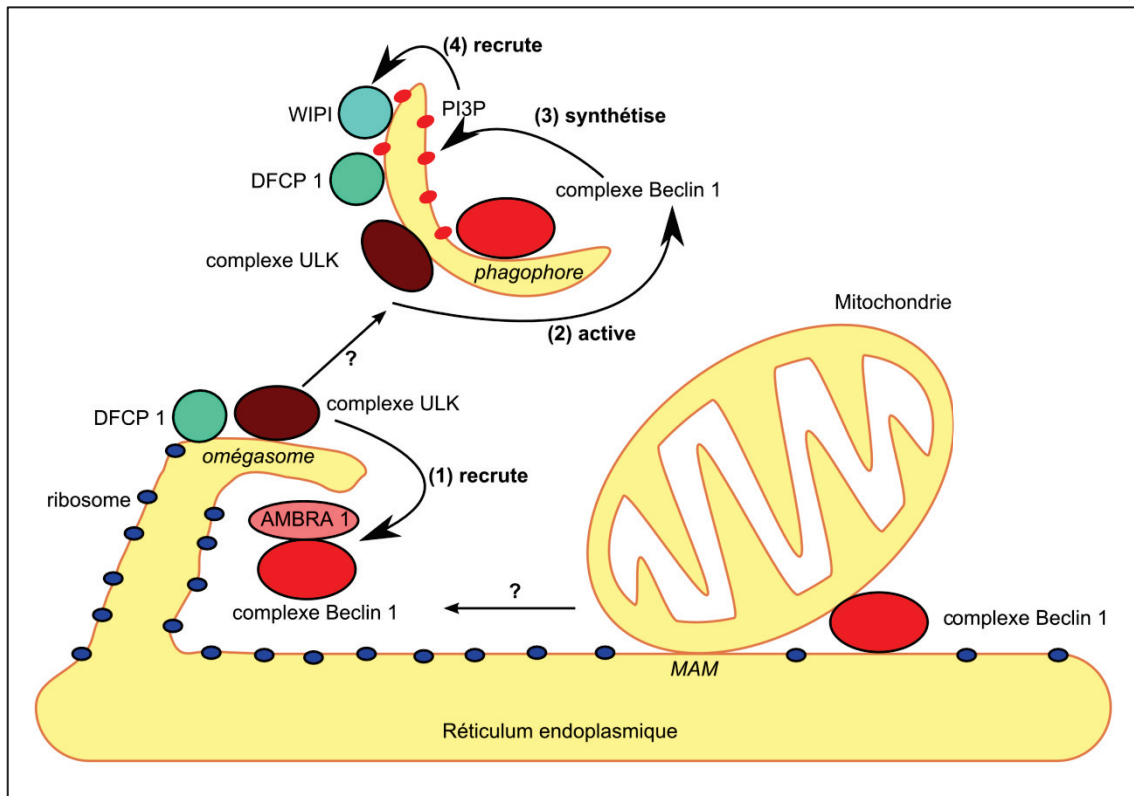
L'initiation de l'autophagie requiert l'activité du complexe ULK qui contient les protéines ULK1, ATG13, FIP200 et ATG101 (Figure 3, Figure 4 et Ganley et al., 2009; Hara et al., 2008; Jung et al., 2009). Ce complexe est activé en amont par l'absence de nutriments par exemple (voir paragraphe 1.2.3).

Les signaux activateurs de l'autophagie provoquent la déphosphorylation d'ULK1 qui peut ensuite phosphoryler les autres composants du complexe ULK, ATG13 et FIP200. Ces phosphorylations activent le complexe ULK dont l'activité va ensuite permettre le recrutement du deuxième complexe impliqué dans l'initiation. Ce dernier est le complexe PI3K de classe

III, plus communément appelé complexe Beclin 1 (Figure 3 et Figure 4) et composé des protéines Beclin 1, VPS34 et ATG14 (Itakura et al., 2008). Lors de l'induction de l'autophagie, le recrutement du complexe Beclin 1 vers le réticulum endoplasmique est dépendant de son interaction avec la protéine d'assemblage pro-autophagique AMBRA 1 phosphorylée par ULK1 (Bartolomeo et al., 2010; Fimia et al., 2007).

Une fois en place, le complexe Beclin 1 va phosphoryler des protéines pour l'instant non identifiées et VPS34 provoquer la production de phosphatidyl-inositol-3-phosphate (PI3P) sur la membrane du phagophore (Kihara et al., 2001; Petiot et al., 2000). Le complexe ULK peut aussi phosphoryler Beclin 1 et ainsi augmenter l'activité du complexe Beclin 1-VPS34-ATG14 (Russell et al., 2013). La synthèse de PI3P permet ensuite le recrutement de protéines effectrices comme DFCP1 et WIPI (Figure 3) mais aussi des complexes d'élongation nécessaires à la croissance du phagophore (Axe et al., 2008; Dooley et al., 2014; Proikas-Cezanne et al., 2004). L'interaction entre WIPI et ATG2 semble nécessaire pour les étapes plus tardives de formation de l'autophagosome mais les mécanismes impliqués restent encore inconnus (Lu et al., 2011). Une fois ces complexes activés et recrutés sur le lieu de formation du phagophore, l'élongation peut avoir lieu grâce au recrutement de nouveaux complexes moléculaires.

L'initiation de l'autophagie est une étape cruciale de régulation de l'autophagie et de nombreux signaux peuvent provoquer ou empêcher l'activation des complexes ULK et Beclin 1.



**Figure 3 : L'initiation de l'autophagie**

L'étape d'initiation permet la formation du phagophore qui est la membrane initiale servant de matrice pour la formation de l'autophagosome. Le phagophore est issu de membranes préexistantes provenant de domaines particuliers du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie ; l'omégasome et les « mitochondria-associated membranes » (MAM) respectivement. Les premiers complexes recrutés sur ces domaines sont les complexes ULK et Beclin 1 qui en coopération avec AMBRA1 permettent la séparation de l'organite source et l'émergence du phagophore dans un mécanisme encore inconnu. Une fois le phagophore formé, l'activité de Beclin 1 permet la synthèse de phosphatidylinositol-3-phosphate (PI3P) sur la membrane. Ce PIP3 permet le recrutement d'effecteurs précoces comme DFCP1 et WIPI qui sont nécessaires pour la formation d'un phagophore prêt pour l'élongation.

Note : les « ? » marquent les étapes dont le déroulement est encore mal défini.

### 1.2.3 Induction et inhibition de l'autophagie

L'autophagie est régulée par l'intégration d'un ensemble complexe de signaux activateurs et inhibiteurs. Les plus influents sont les signaux associés aux niveaux de nutriments disponibles que nous détaillerons ci-après mais d'autres signaux peuvent aussi moduler l'autophagie comme l'anoxie, les signaux apoptotiques ou le niveau d'espèces réactives de l'oxygène (pour une revue voir Jung et al., 2010). Ces signaux sont intégrés au niveau de complexes régulateurs comme le complexe inhibiteur mTORC1, le complexe activateur AMPK ou encore les membres de la famille Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> (Figure 4). Ces complexes intégrateurs vont ensuite réguler l'activité du complexe ULK et donc déclencher ou empêcher l'assemblage des complexes d'initiation ou encore directement réguler l'activité PI3K du complexe Beclin 1.

- Le complexe mTORC1

Le complexe mTORC1 est un complexe kinase composé de 5 sous-unités dont mTOR et RAPTOR. Ce complexe est constitutivement actif et recruté à la membrane du lysosome par les Rag GTPases ancrées dans la membrane du lysosome en condition de nutrition normale de la cellule (Sancak et al., 2008). La présence et l'activité des Rag GTPases à la membrane du lysosome sont elles-mêmes contrôlées par le complexe RAGULATOR qui est activé par l'accumulation d'acides aminés dans le lysosome en condition normale (Sancak et al., 2010). Lorsqu'il est recruté et activé à la membrane du lysosome, mTORC1 phosphoryle ULK1 sur plusieurs sites, inhibant ainsi son activité et donc l'autophagie (Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009; Kim et al., 2011a). Lorsque le niveau de nutriments disponibles diminue, la quantité d'acides aminés présents dans les lysosomes diminue elle aussi ce qui entraîne une baisse de l'activité de RAGULATOR et des Rag GTPases. Le complexe mTORC1 n'est plus recruté à la membrane du lysosome et reste inactif; la phosphorylation d'ULK1 diminue ce qui permet son activation et le déclenchement des étapes d'initiation de l'autophagie (Figure 4). D'autres signaux peuvent agir au niveau de mTORC1, c'est le cas notamment du stress du réticulum qui induit l'autophagie (Yorimitsu et al., 2006), ou de certains facteurs de croissance comme l'insuline qui au contraire l'inhibe (Pfeifer, 1977; Vander Haar et al., 2007).

- Le complexe AMPK

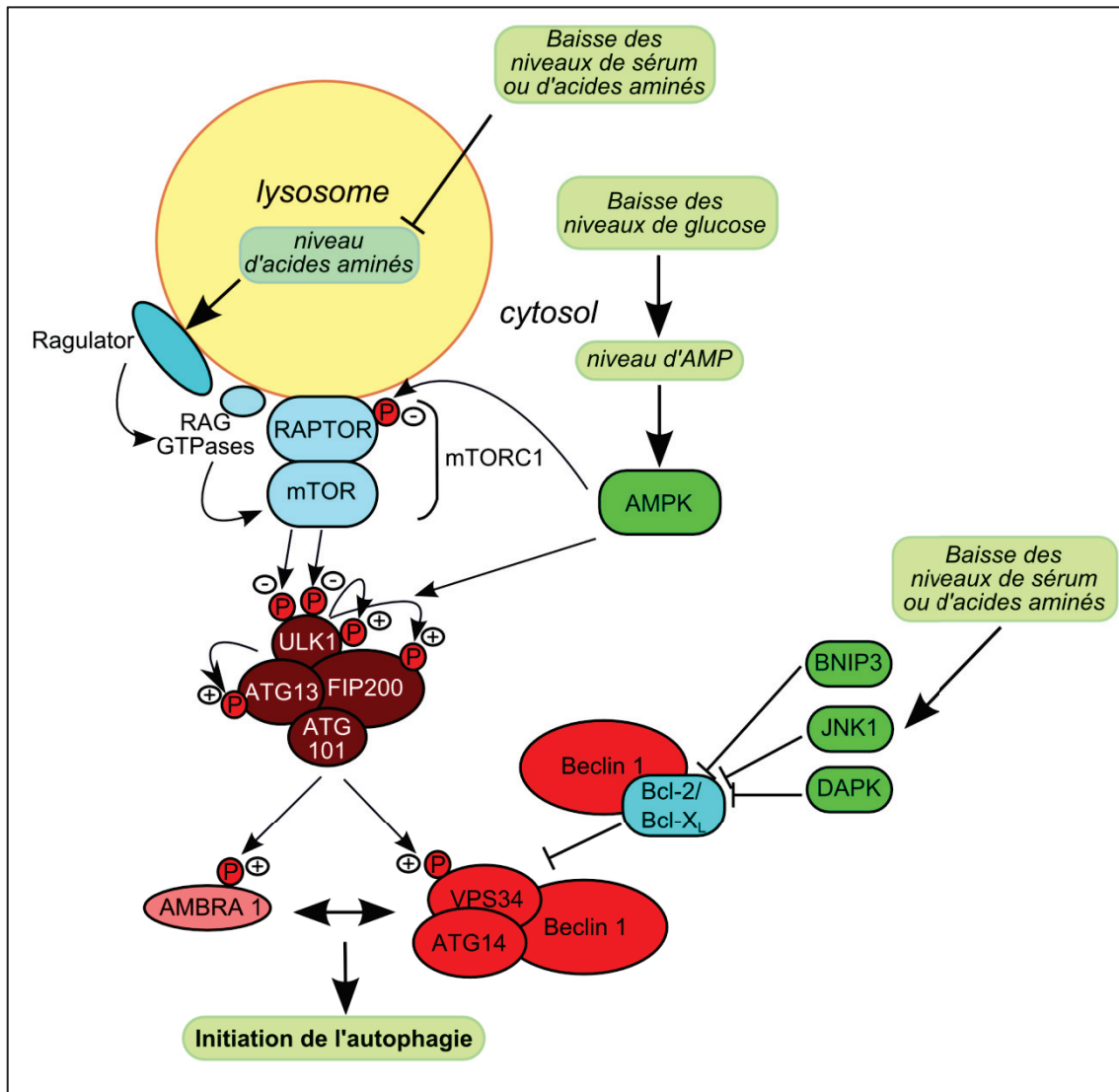
Un autre signal du niveau de nutriments disponible dans la cellule est la quantité relative d'ATP et d'AMP, ce ratio est mesuré par le complexe AMPK dans le cytosol. Lorsque le niveau d'AMP est élevé dans la cellule, AMPK phosphoryle mTORC1 au niveau de sa sous-unité RAPTOR ce qui inhibe l'activité de mTORC1 et active l'autophagie (Figure 4 et Gwinn et al., 2008). Deux études ont aussi montré qu'AMPK peut directement activer ULK1 en phosphorylant les sérines 317 et 777 lors de la baisse des niveaux de glucose dans la cellule (Bach et al., 2011; Egan et al., 2011).

- La famille Bcl-2

La famille Bcl-2 agit directement sur l'association de Beclin 1 avec les autres composants de son complexe suivant leur activité pro- ou anti-apoptotique. Les protéines anti-apoptotique comme Bcl-2 ou Bcl-X<sub>L</sub> inhibent l'autophagie alors que les pro-apoptotiques comme BNIP3 induisent l'autophagie. La liaison de Bcl-2 avec Beclin 1 perturbe son association avec VSP34 et ainsi inhibe l'activité PI3K du complexe Beclin 1 (Figure 4 et Pattingre et al., 2005). Cette liaison entre Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> et Beclin 1 peut être empêchée par différents mécanismes. Le domaine BH3 des protéines pro-apoptotiques peut entrer en compétition avec Beclin 1 pour la liaison avec Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub>, libérant ainsi Beclin 1 qui peut s'associer aux autres membres de son complexe: VPS34 et ATG14 (Maiuri et al., 2007; Pattingre et al., 2005). Un autre

mécanisme implique la phosphorylation de Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> par la kinase JNK1 inhibant son association avec Beclin 1 (Wei et al., 2008). Enfin, l'activation de Beclin 1 peut aussi impliquer l'association directe avec DAPK (« Death Associated Protein Kinase », un régulateur positif de l'apoptose), permettant ainsi sa phosphorylation par DAPK et sa libération de Bcl-2/Bcl-X<sub>L</sub> (Zalckvar et al., 2009).

Une fois les complexes ULK et Beclin 1 recrutés sur le phagophore, leurs activités vont permettre le recrutement des complexes protéiques nécessaires pour l'élongation du phagophore et la formation de l'autophagosome.



**Figure 4 : Activation ou inhibition de l'autophagie**

De nombreux signaux intra ou extracellulaires peuvent moduler l'autophagie et ce en agissant sur les deux complexes de l'initiation, ULK et Beclin 1. Parmi ces signaux, les plus importants sont ceux liés aux niveaux de nutriments disponibles : sérum, acides aminés et glucose. Ces signaux sont intégrés soit dans le cytosol par l'intermédiaire du complexe AMPK ou au niveau de la membrane du lysosome par le complexe mTORC1. Le complexe mTORC1 inhibe l'initiation en phosphorylant ULK1 sur de nombreux sites ce qui inhibe son activité kinase. A l'inverse, AMPK active l'initiation de deux façons : en phosphorylant la sous-unité RAPTOR du complexe mTORC1 ou en phosphorylant deux sites sur ULK1 qui activent son activité kinase. Enfin, l'association de Beclin 1 avec le reste de son complexe est modulée par sa libération de Bcl-2/Bcl-XL via l'implication de plusieurs protéines comme BNIP3, JNK1 et DAPK. Note : les + et les - indiquent l'activité activatrice ou inhibitrice des événements de phosphorylation sur les protéines phosphorylées.

### 1.2.4 Elongation

Durant l'élongation, la croissance du phagophore est assurée d'une part par l'apport de lipides mais aussi par le recrutement et l'activité de deux complexes dit de conjugaison « ubiquitin-like » (Figure 5).

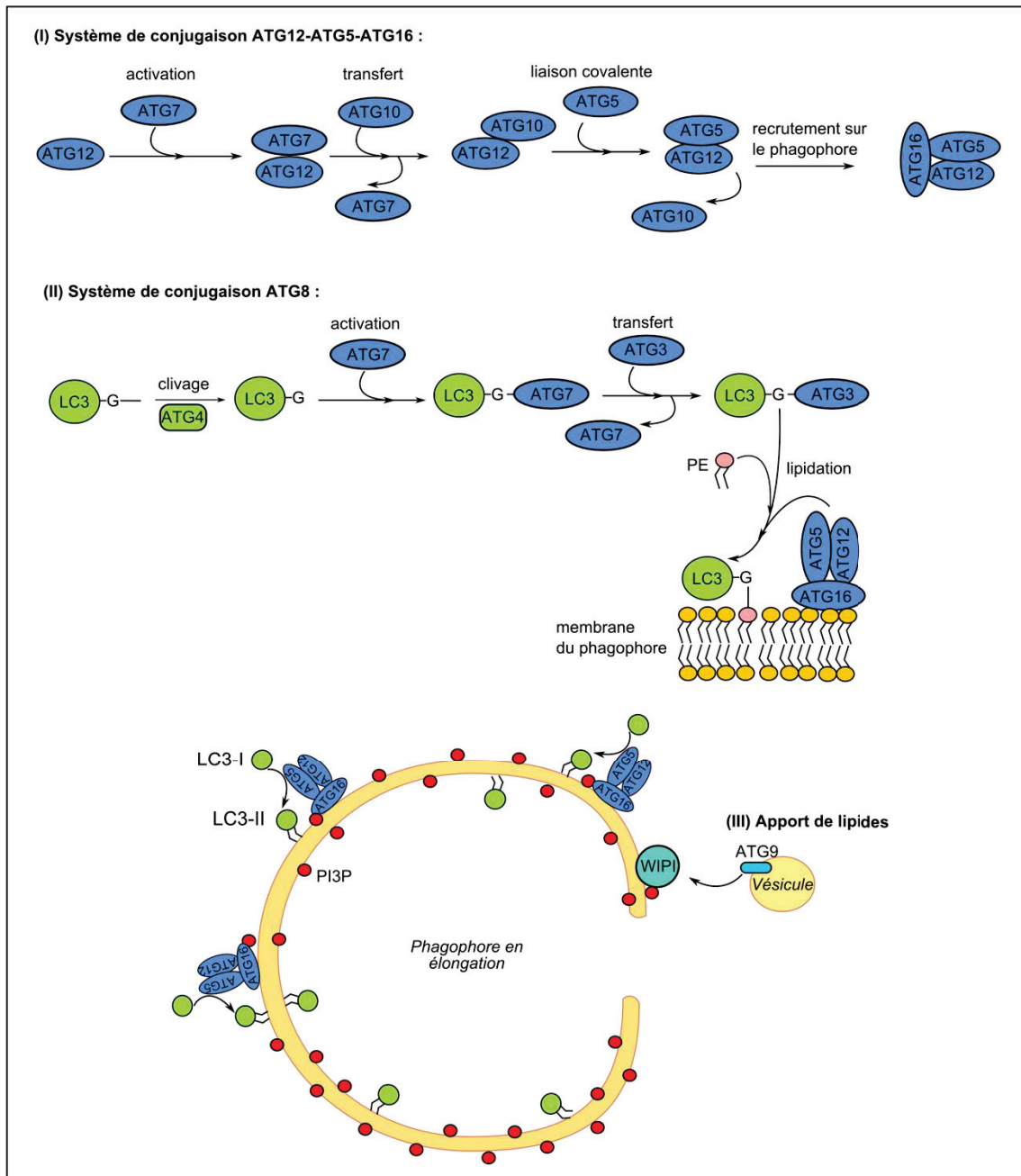


Ces complexes de conjugaison sont appelés « ubiquitin-like » par analogie avec le mode de fonctionnement de conjugaison de l'ubiquitine où des enzymes dites E1, E2 et E3 agissent successivement pour transférer l'ubiquitine sur son substrat. La formation du premier de ces complexes commence par l'activation d'ATG12 par ATG7 (qui agit ici comme une enzyme E1) (Tanida et al. 2001), puis ATG12 est lié de manière covalente à ATG5 par ATG10 (qui remplit donc le rôle d'une enzyme E2) (Mizushima et al., 1998b; Nemoto et al., 2003; Shintani et al., 1999). Enfin, ATG12-ATG5 est lié de manière non-covalente à ATG16 (Mizushima et al., 1998a). Dans le même temps, LC3 est clivée au niveau de sa glycine 120 par ATG4 (Tanida et al., 2004) et forme ainsi la LC3-I cytosolique qui sera ensuite conjuguée à la phosphatidyléthanolamine (PE) par l'action conjuguée d'ATG7 (qui joue le rôle d'une enzyme E1) et d'ATG3 (qui joue le rôle d'une enzyme E2) (Ichimura et al., 2000; Tanida et al., 2002). Cette forme de LC3 lipidée, appelée LC3-II, s'enchéasse dans la membrane du phagophore et joue un rôle crucial dans l'élongation mais également comme nous le verrons dans les formes sélectives d'autophagie. Cette transition de la forme LC3-I cytosolique à LC3-II lipidée est communément suivie par Western Blot afin d'évaluer l'activité autophagique de cellules ou de tissus (Klionsky et al., 2016). L'activité de ces 2 complexes de conjugaison est étroitement liée. En effet le complexe ATG12-ATG5-ATG16 est localisé au niveau de la membrane du phagophore et agit comme une enzyme E3 sur ATG3 et ainsi promeut la lipidation de LC3 (Sakoh-Nakatogawa et al., 2013).

Le système d'apport de lipide au phagophore reste encore peu connu, on suppose que cet apport est assuré par la seule protéine ATG transmembranaire : ATG9 (Papinski et al., 2014; Young et al., 2006). Des travaux récents ont montré qu'ATG9 circule de la membrane plasmique vers les endosomes précoces puis vers les endosomes de recyclage (Puri et al., 2013). Il semblerait que les endosomes positifs pour ATG9 puissent fusionner avec des vésicules contenant ATG16L1 grâce à des protéines SNARE, ce qui ensuite permettrait la croissance de l'autophagosome (Puri et al., 2013). Cependant, il reste encore de nombreuses inconnues dans ce mécanisme. Ainsi, la présence de WIPI semble nécessaire pour les mouvements d'ATG9 mais aussi pour la fermeture de l'autophagosome après lipidation où ATG2A et ATG2B pourraient aussi intervenir (Orsi et al., 2012; Proikas-Cezanne et al., 2015; Reggiori et al., 2004).

De même, les étapes finales de l'élongation, avec notamment la fermeture de l'autophagosome, sont mal résolues. Cependant, l'activité d'ATG4 est de nouveau nécessaire pour dissocier LC3-II de la face externe de l'autophagosome, sans quoi des autophagosomes incomplets et non fermés s'accumulent dans la cellule (Yu et al., 2012). Quant à la fermeture de l'autophagosome en elle-même, elle fut longtemps qualifiée à tort de fusion membranaire alors que le mécanisme s'apparente à la scission membranaire puisque le continuum entre la

face externe et interne de la double-membrane est rompu lors de la fermeture (Knorr et al., 2015).



**Figure 5 : Systèmes de conjugaison et élévation du phagosome**

Deux systèmes de conjugaison dits « ubiquitin-like » sont formés et recrutés sur les deux faces du phagosome. (I) Le premier aboutit à la formation du complexe ATG12-ATG5-ATG16 qui est ensuite recruté via PI3P sur le phagosome où il va catalyser la formation et l'action du deuxième système de conjugaison. (II) Ce deuxième système permet conjugaison de LC3 (et des autres homologues d'ATG8) à un lipide, la phosphatidyléthanolamine (PE) et donc leur encaissement dans la membrane du phagosome. (III) Enfin le phagosome est agrandi par apport de lipides venant de vésicules positives pour ATG9 et nécessite la présence de WIPI sur la membrane du phagosome.

### 1.2.5 Maturation

Une fois l'autophagosome formé il faut encore qu'il parvienne à fusionner avec un lysosome afin de dégrader son contenu. Cette ultime étape est peut-être la moins bien caractérisée car elle implique de nombreux acteurs vésiculaires et moléculaires mais aussi une régulation spatio-temporelle fine. En effet, il ne faudrait pas qu'un autophagosome non fermé fusionne avec un lysosome mais il faut aussi rapidement éliminer le contenu potentiellement délétère de l'autophagosome une fois clos. Enfin, il faut aussi que les lysosomes soient fonctionnels pour que la dégradation soit efficace. Notons aussi la possibilité pour les autophagosomes de fusionner avec des endosomes et de former ainsi des amphisomes qui pourront eux aussi *in fine* fusionner avec les lysosomes et donner des autolysosomes dégradatifs. Cette étape est souvent décrite comme facultative, mais le débat est toujours ouvert sur ce point; certaines études indiquent que bloquer la fusion avec les endosomes bloque tout le processus de maturation (Tumbarello et al., 2012).

Si un certain nombre de protéines nécessaires pour la maturation commence à être connu, les détails mécanistiques conduisant à la fusion entre autophagosomes et vésicules endo-lysosomales restent peu connus. Les premières études permirent tout d'abord d'identifier les protéines dont l'absence entraîne un défaut de maturation. Certaines ATG sont décrites comme capitales durant la maturation et ce de par leur présence ou leur absence. En effet, une étape clé de la maturation des autophagosomes est la déconjugaison des protéines présentes à la membrane externe de l'autophagosome médiée par la protéase ATG4 (Yu et al., 2012). Cependant, étant donné que la présence de plusieurs ATGs décrites plus loin est aussi nécessaire pour le recrutement de certains effecteurs participant à la maturation, il semblerait que cette déconjugaison soit finement régulée au cours de la maturation. La compréhension de la fusion autophagosome-lysosome a aussi grandement bénéficié des évolutions de notre compréhension du trafic vésiculaire intracellulaire. Ainsi, 3 familles de protéines impliquées dans la fusion membranaire sont aussi cruciales pour la maturation des autophagosomes; les Rab GTPases, les facteurs d'attache membranaire et enfin les SNAREs (Figure 6).

- Les Rab GTPases

Les Rab GTPases recrutent au niveau des vésicules de transport en formation de nombreux effecteurs comprenant des protéines adaptatrices et des protéines motrices. Ces effecteurs opèrent le déplacement des vésicules vers la membrane cible, l'attachement entre les deux membranes et le recrutement de la machinerie de fusion à proprement parler (pour une revue détaillée voir Bhuin and Roy, 2014). Rab7 est une Rab GTPase qui se trouve sur la membrane des endosomes tardifs et des lysosomes (Feng et al., 1995). Elle semble participer à la maturation des autophagosomes de multiples façons. Tout d'abord en participant à la mobilité des endosomes tardifs et des lysosomes en recrutant le moteur protéique dynéine 1

via un complexe d'adaptateurs contenant RILP à leur membrane, ce qui permet leur transport rétrograde dans la cellule (Johansson et al., 2007; Rocha et al., 2009). Rab7 est aussi impliqué dans le recrutement de l'adaptateur FYCO1 (FYVE and coiled-coil domain containing 1) sur l'autophagosome, recrutement qui pourrait être facilité par la liaison de FYCO1 avec LC3 (Pankiv et al., 2010). De plus, FYCO1 pourrait se lier à un moteur kinésine et ainsi participer aux mouvements antérogrades des autophagosomes (Pankiv et al., 2010). Enfin, Rab7 pourrait être directement impliquée dans la fusion entre autophagosome et lysosome en coopération avec le complexe d'attache HOPS (homotypic fusion and vacuolar protein-sorting) et Rubicon (Sun et al., 2010). Cependant, comment Rab7 est recrutée à la membrane de l'autophagosome mature reste encore mal défini même si certaines données impliquent la pompe à calcium SERCA (sarcoplasmic reticulum calcium ATPase) (Ganley et al., 2011). La protéine UVRAG serait aussi impliquée dans ce recrutement en stimulant la production de PI3P par VPS34 mais aussi en interagissant directement avec le facteur d'attache membranaire HOPS, ce qui permettrait le recrutement de Rab7 (Liang et al., 2008; Poteryaev et al., 2010). Cette hypothèse est appuyée par le fait que Rubicon, qui peut se lier à UVRAG et inhiber VPS34, inhibe la fusion entre endosomes, autophagosomes et lysosomes (Sun et al., 2010; Tabata et al., 2010). Ajoutons que Beclin 1 et UVRAG en plus de réguler l'initiation avec ATG14 (voir paragraphe 1.2.2) sont aussi impliquées dans la régulation de la maturation suivant le complexe formé; Beclin 1-UVRAG-VSP34-VPS45 régule positivement la maturation tandis que ce complexe associé à Rubicon régule négativement la maturation (Matsunaga et al., 2009; Zhong et al., 2009).

- Les facteurs d'attache membranaire

Les facteurs d'attache membranaires comme HOPS sont aussi cruciaux pour la maturation (Wartosch et al., 2015). Récemment, il a été démontré que l'adaptateur endocytaire PLEKHM1 interagit directement avec HOPS mais aussi avec LC3 et participe donc à la maturation (McEwan et al., 2015). Enfin une autre protéine, TECPR1 (tectonin  $\beta$ -propeller repeat containing protein 1), a aussi été impliquée dans la maturation (Chen et al., 2012). De manière intéressante, TECPR1 fut d'abord identifiée comme une protéine interagissant avec ATG5, un des facteurs de l'élongation (Ogawa et al., 2011). Cependant, il a été montré depuis que l'absence de TECPR1 conduit à l'accumulation d'autophagosomes et que TECPR1 se trouve au niveau des autophagosomes matures mais aussi des lysosomes, laissant supposer un rôle pour TECPR1 dans la maturation plutôt que dans l'élongation (Chen et al., 2012). Cependant, il reste encore à démontrer si TECPR1 se lie à d'autres facteurs de maturation comme les Rab GTPases ou les SNAREs. Ajoutons que TECPR1 semble se lier à ATG5 via PI3P et que cette liaison à PI3P pourrait réguler l'activité de TECPR1 (Ogawa et al., 2011).

- Les SNAREs

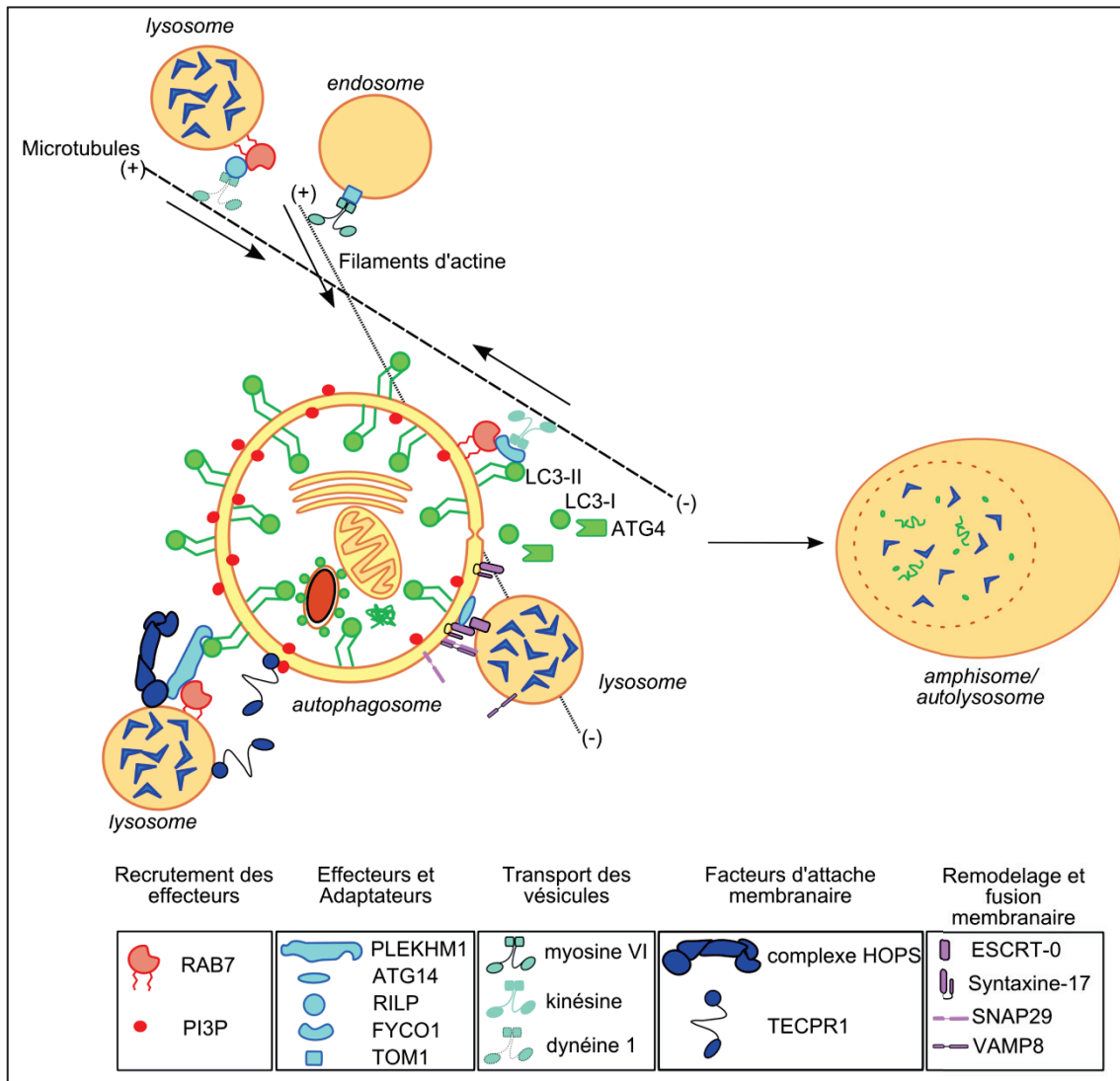
Les SNAREs sont des protéines membranaires qui peuvent interagir entre elles et provoquer la fusion entre les membranes des compartiments cellulaires. Cette fusion nécessite la formation d'un complexe *trans*-SNARE entre les deux membranes : un complexe R-SNARE (anciennement V-SNARE) sur la membrane du compartiment donneur et un complexe Q-SNARE (anciennement T-SNARE) sur la membrane du compartiment receveur. Beaucoup de SNAREs jouent un rôle indirect dans l'autophagie en régulant d'autres mécanismes du trafic intracellulaire ce qui rend délicate l'identification d'un rôle direct dans la fusion autophagosome-lysosome ou autophagosome-endosome. Il faut souligner néanmoins l'importance de ces rôles indirects qui aboutissent à la formation d'un compartiment endo-lysosomal fonctionnel qui est essentiel à la dégradation des substrats de l'autophagie (Renna et al., 2011). C'est le cas par exemple du complexe SNARE Syntaxine-5 qui régule le transport antérograde entre réticulum et Golgi et la maturation des protéases lysosomales. C'est aussi le cas des SNAREs régulant la fusion entre endosomes et lysosomes comme les Q-SNAREs Syntaxine-7, Syntaxine-8, Vti1b, et les R-SNAREs VAMP7 et VAMP8 (Pryor et al., 2004). Cependant il semblerait que VAMP3 et VAMP7 soient directement impliquées dans la fusion successive des autophagosomes avec les endosomes puis les lysosomes (Fader et al., 2009). Enfin citons l'importance capitale de la Q-SNARE Syntaxine-17 qui régule directement la fusion autophagosome-lysosome en étant recrutée sur la membrane des autophagosomes matures, c'est-à-dire dépourvu de LC3-II à leur surface (Itakura et al., 2012). Syntaxine-17 interagit ensuite avec une autre Q-SNARE, SNAP29 mais aussi avec la R-SNARE VAMP8 (Itakura et al., 2012). Il a été récemment montré que l'interaction entre Syntaxine-17 et SNAP29 est stabilisée par ATG14 et qu'ATG14 déclenche aussi l'interaction avec VAMP8 (Diao et al., 2015). Enfin, il semblerait que le complexe HOPS participe directement à la fusion médiée par Syntaxine-17 (Jiang et al., 2014).

D'autres composants participent aussi à la maturation mais leur implication n'ayant été montrée que par perte de fonction, leurs rôles potentiels restent encore à décrire avec précision. C'est le cas par exemple des complexes ESCRT (« endosomal sorting complex required for transport ») ; la perte d'éléments des complexes ESCRT-0 et ESCRT-III notamment bloque la maturation mais le mécanisme d'action reste inconnu (Rusten and Stenmark, 2009). C'est aussi le cas pour les protéines lysosomales LAMP1 et LAMP2 dont la perte provoque l'accumulation d'autophagosomes dans les cellules *in vitro* et *in vivo* (Eskelinen et al., 2004; Tanaka et al., 2000).

Ainsi, un certain nombre de protéines ont été impliquées dans la maturation de manière directe ou indirecte et quelques mécanismes moléculaires sont aussi décrits. Mais la coordination de toutes ces protéines et les étapes qu'elles catalysent reste à être déterminée

avec précision. On peut cependant supposer que les étapes impliquant des ATGs ont lieu avant leur déconjugaison de la membrane de l'autophagosome par ATG4.

Enfin un élément capital pour le bon déroulement de la maturation au cours de l'autophagie est la mobilité des vésicules et protéines impliquées. Les composants du cytosquelette que sont les microtubules et les filaments d'actine sont donc essentiels à la maturation en permettant le mouvement des autophagosomes et des vésicules endo-lysosomales et donc leur rencontre avant fusion (Aplin et al., 1992; Köchl et al., 2006). Ces mouvements le long des microtubules sont assurés par des moteurs dynéines (Kimura et al., 2008) et kinésines déjà mentionnées plus haut. Récemment, c'est un moteur catalysant les mouvements le long des filaments d'actine qui a été impliqué dans le bon déroulement de la fusion entre autophagosomes et endosomes : la myosine VI (Tumbarello et al., 2012).



**Figure 6 : Maturation de l'autophagosome**

Durant la maturation, l'autophagosome fusionne avec un lysosome pour former un autolysosome dégradatif. Cette étape est parfois précédée par la formation d'un amphisome lorsque l'autophagosome fusionne avec un endosome. La fusion de ces vésicules nécessite leur rencontre et donc leur transport par des moteurs protéiques (dynéine 1 pour les endo/lysosomes, myosine VI pour les endosomes et kinésine pour les autophagosomes) le long des filaments du cytosquelette (microtubules et actine). Ces moteurs protéiques sont liés par des adaptateurs souvent recrutés par Rab7. Les facteurs d'attache membranaire permettent de stabiliser les membranes avant fusion et nécessitent la présence de LC3-II ou de PI3P sur l'autophagosome. Cependant, le recrutement de la Q-SNARE Syntaxine-17 à la membrane de l'autophagosome et la fusion des vésicules ne peut se dérouler sans la déconjugaison de LC3 et des autres protéines de la face externe de l'autophagosome par ATG4.

### 1.2.6 Myosine VI et autophagie

La famille des myosines regroupe des protéines assurant le mouvement et le transport dans les cellules par conversion d'énergie chimique, sous forme d'ATP, en énergie mécanique. Certaines myosines forment des filaments contractiles alors que d'autres, comme la myosine VI, agissent de manière isolée et « marchent » le long des filaments d'actine. Ces myosines



assurent donc le transport de cargos tels que des vésicules. Parmi les membres de cette famille, la myosine VI est unique ; c'est en effet la seule myosine décrite à ce jour pour se déplacer vers l'extrémité (-) des filaments d'actine qui est le point de désassemblage des filaments (Ménétreay et al., 2006; Sweeney and Houdusse, 2010; Wells et al., 1999).

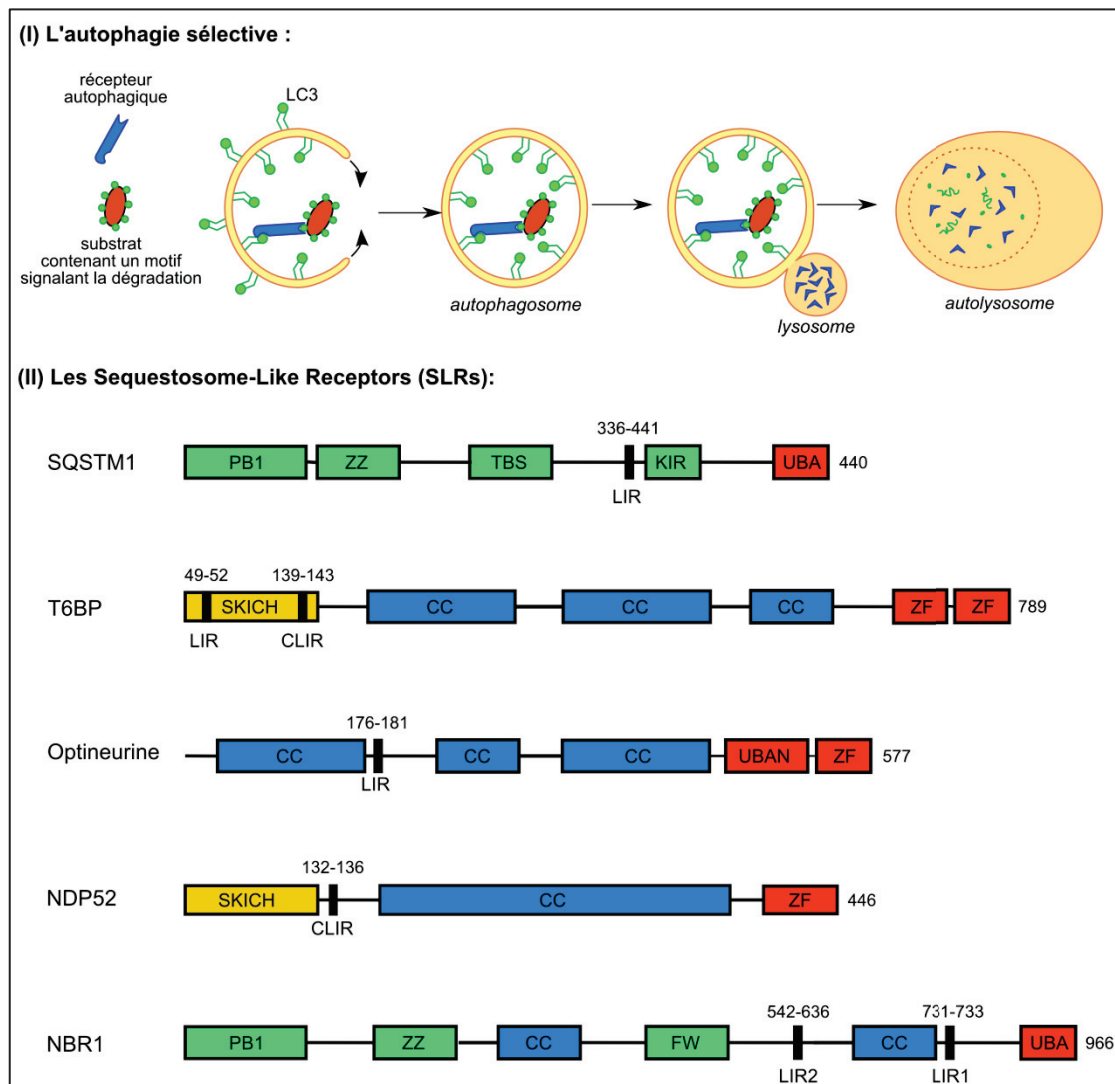
Les myosines sont toutes organisées suivant le même modèle. En position C-terminale se trouve le domaine de liaison au cargo qui diverge d'une myosine à l'autre, puis le bras de levier et enfin en position N-terminale se trouve le domaine moteur, extrêmement conservé. Ce domaine moteur, aussi appelé tête, constitue le site d'interaction avec le filament d'actine mais aussi le site de liaison et d'hydrolyse de l'ATP qui fournit l'énergie nécessaire au déplacement de la myosine le long du filament d'actine. Certaines myosines comme la myosine VI forment des dimères par l'intermédiaire d'un domaine situé entre le domaine de liaison et le bras de levier. Cette dimérisation permet à la myosine VI d'être toujours liée par une de ses deux têtes à l'actine et ainsi de « marcher » le long du filament. Ce mouvement est dû à l'hydrolyse de l'ATP par le domaine moteur qui induit un changement de conformation du bras de levier qui s'étend et permet au domaine moteur de se lier à l'actine. Le remplacement de l'ADP issu de l'hydrolyse par une nouvelle molécule d'ATP provoque le détachement du domaine moteur et déclenche le pas suivant en alternant ce mouvement entre les deux dimères de myosine VI. Jusqu'ici la myosine VI n'était impliquée que dans le transport et la biogénèse de compartiments d'endocytose (Altman et al., 2007; Aschenbrenner et al., 2004; Chibalina et al., 2007; Loubéry et al., 2012) mais récemment son implication dans la maturation des autophagosomes a été brillamment démontrée par l'équipe de Folma Buss et John Kendrick-Jones (Tumbarello et al., 2012).

Dans cette étude, les auteurs ont d'abord observé que l'absence de la myosine VI dans les cellules mammifères provoque un blocage de la maturation des autophagosomes. Ils ont aussi montré que la myosine VI peut co-localiser avec des vésicules positives pour LC3. De plus, l'absence d'interaction entre myosine VI et la protéine endosomale Tom1 (un composant du complexe ESCRT-0) provoque le même défaut de maturation (Figure 6). Cette interaction est dépendante d'un domaine situé dans le domaine de liaison C-terminal de la myosine VI. De manière intéressante, la myosine VI peut se lier à certains membres d'une famille de protéines intimement liée à l'autophagie sélective, les récepteurs autophagiques Optineurine, NDP52 (aussi appelée CALCOCO2) et T6BP (aussi appelée TAX1BP1 ou CALCOCO3) (voir paragraphe 1.3). L'absence simultanée de ces trois protéines provoque elle aussi un blocage de l'autophagie que les auteurs associent à un blocage de la biogénèse des autophagosomes couplé à un défaut de maturation. Si le domaine de liaison entre myosine VI et ces trois récepteurs autophagiques est aussi identifié dans le domaine de liaison de la myosine, comment cette liaison participe à la maturation des autophagosomes est une question qui demeure en suspens. En effet, comment des protéines associées à l'autophagie

sélective peuvent-elles participer à la maturation ou la biogénèse durant l'autophagie basale ? Est-ce que le complexe récepteurs-myosine VI-Tom1-endosome se lie à l'autophagosome ? Si oui, comment et par l'intermédiaire de quel(s) partenaire(s) ? Ce mécanisme est-il valable aussi en cas d'autophagie dirigée contre des pathogènes ? Certaines de ces questions ont été centrales durant le déroulement de mes travaux de thèse.

### **1.3 Autophagie sélective**

Il fut très vite proposé que lors de la formation de l'autophagosome deux possibilités puissent exister : soit l'autophagosome en se fermant emprisonne une portion du cytoplasme de manière aléatoire, soit une cible bien précise est visée lors de la formation de l'autophagosome. Dans ce dernier cas, on parlera alors d'autophagie sélective, qui devient cruciale lors de situation de stress comme l'accumulation d'agrégats protéiques, mais aussi lors d'infection par des pathogènes intracellulaires. La sélectivité de l'autophagie est rendue possible par une famille de protéines appelées récepteurs autophagiques dont le fonctionnement général est relativement conservé même si des particularités peuvent apparaître suivant les substrats dont ils assurent la dégradation.



**Figure 7 : L'autophagie sélective par les Sequestosome-Like Receptors**

**(I)** La spécificité de l'autophagie sélective repose sur une famille de protéines nommées récepteurs autophagiques. Ces récepteurs sont capables de reconnaître leur substrat de manière directe ou indirecte mais aussi de se lier à LC3 par un domaine LIR (LC3 Interacting Region) sur l'autophagosome en formation. Ceci permet la formation de l'autophagosome autour du substrat et sa dégradation après maturation de l'autophagosome. **(II)** Parmi les récepteurs autophagiques, les mieux connus sont les Sequestosome-Like Receptors ou SLRs. Ces récepteurs tiennent leur nom de SQSTM1, le premier récepteur autophagiques reconnaissant l'ubiquitine décrit. Les SLRs ont tous un domaine de reconnaissance de l'ubiquitine (en rouge) ainsi qu'au moins un LIR (en noir). Plusieurs de ces récepteurs ont aussi des domaines Coiled-coil (CC, en bleu).

PB1 : domaine "Phox and Bem 1", permet la dimérisation

ZZ : domaine liant deux ions zinc

TBS : domaine de liaison à TRAF6

KIR : domaine de liaison à KEAP1

SKICH : skeletal muscle and kidney-enriched inositol phosphatase carboxyl homology domain, domaines inactifs chez NDP52 et T6BP (Morriswood et al., 2007)

UBA : UBiquitin Associated

ZF : zinc finger

UBAN : Ubiquitin Binding in ABIN and NEMO

### 1.3.1 Les récepteurs autophagiques

Les récepteurs autophagiques sont la clé de l'autophagie sélective ; ce sont eux qui vont d'une part reconnaître le substrat et d'autre part la machinerie moléculaire de l'autophagie. Le substrat à dégrader peut être reconnu directement par le récepteur ou via un partenaire moléculaire comme l'ubiquitine (Figure 7). Le recrutement de la machinerie autophagique se fait via la liaison entre le récepteur et un membre de la famille LC3/GABARAP ancré dans la membrane du phagophore en élongation (Johansen and Lamark, 2011). Le récepteur permet ainsi la formation et la fermeture d'un autophagosome autour du substrat à dégrader. De manière intéressante, on ne trouve aucun composant cytosolique autre que le substrat à dégrader dans l'autophagosome ainsi formé.

Tous les récepteurs fonctionnent suivant le même principe et donc partagent des caractéristiques structurales nécessaires à leur bon fonctionnement. Le premier domaine principal d'un récepteur autophagique est le domaine de reconnaissance directe du substrat ou bien de l'intermédiaire permettant sa reconnaissance. L'affinité de liaison entre récepteur et substrat peut être modulée par des modifications post-traductionnelles ce qui permet d'améliorer la sélectivité du processus de dégradation autophagique ou encore d'amplifier le taux de substrat reconnu et dégradé. La liaison au phagophore se fait par l'interaction entre le récepteur et un membre de la famille LC3/GABARAP ce qui permet d'ancrer le complexe substrat-récepteur au phagophore en formation. Cette liaison implique deux domaines, le premier sur le récepteur est nommé LIR pour « LC3 Interacting Region ». Le LIR suit une séquence consensus  $\Theta\text{XX}\Gamma$ , où  $\Theta$  est un résidu aromatique (W/F/Y) et  $\Gamma$  est un résidu hydrophobe (L/I/V), tandis que X peut être n'importe quel résidu, et ce consensus est généralement précédé ou suivi de résidus acides (D) (Johansen and Lamark, 2011). Cependant, de plus en plus de LIR ne suivant pas ce consensus sont décrits dans la littérature ce qui pourrait suggérer un certain degré de liberté dans l'interaction récepteur/LC3. Ce domaine LIR permet au récepteur de se lier à LC3/GABARAP sur un domaine particulier de ce dernier nommé LBD pour LIR Binding Domain. L'insertion de mutations dans un de ces domaines abrogeant l'interaction entre un récepteur et LC3/GABARAP empêche la dégradation du substrat par l'autophagie et démontre donc que cette interaction est la clé de voûte de l'autophagie sélective (Birgisdottir et al., 2013; Johansen and Lamark, 2011).

Un des premiers récepteurs autophagiques identifié fut SQSTM1 ; ce récepteur est capable de se lier à l'ubiquitine conjuguée sur ses substrats comme les agrégats protéiques (Pankiv et al., 2007). Plusieurs récepteurs autophagiques suivent la même organisation et mode de reconnaissance de leur substrats que SQSTM1 ce qui leur vaut le nom de Sequestosome-Like Receptors (SLRs), ce sont les récepteurs NBR1, NDP52, Optineurine et T6BP. Les SLRs utilisent tous l'ubiquitine comme intermédiaire de reconnaissance de leur substrat et possèdent au moins un domaine LIR (Figure 7). Les substrats reconnus par les

SLRs sont variés et incluent non seulement les agrégats protéiques mais aussi les mitochondries, des bactéries intracellulaires et des protéines virales (voir paragraphes 1.3.2 et 1.4.1). S'ils sont les récepteurs les plus étudiés à ce jour, les SLRs ne sont pas les seuls récepteurs autophagiques et de nouveaux sont découverts régulièrement nous apportant une meilleure compréhension des différents modes de reconnaissance des substrats par l'autophagie sélective.

Enfin, l'activité d'un récepteur autophagique dans l'autophagie sélective ne se limite pas à la dégradation directe du substrat. En effet, de nombreux récepteurs impliqués dans l'élimination de substrat délétères ou étrangers à la cellule possèdent aussi des domaines permettant l'activation des voies de signalisation de l'immunité innée par exemple. Ces voies et les particularités des principaux récepteurs seront détaillées au cours des paragraphes suivant.

### **1.3.2 Les principes et types d'autophagie sélective**

- Xénophagie :

La xénophagie est l'élimination sélective par l'autophagie de composants étrangers à la cellule. Ces composants étrangers peuvent être des pathogènes intracellulaires entiers ou parcellaires. Les mécanismes impliqués seront détaillés au cours des paragraphes traitant plus précisément des liens entre autophagie et pathogènes (voir paragraphe 1.4.1).

- Aggréphagie :

Une des caractéristiques principales de la plupart des maladies neurodégénératives est l'accumulation dans les neurones d'agrégats de protéines. L'agrégation des protéines résulte le plus souvent de l'adoption d'une conformation anormale par une protéine ce qui entraîne une oligomérisation et enfin l'agrégation de ces oligomères. L'agrégation des protéines est un phénomène courant dans les cellules saines où environ un tiers des protéines nouvellement traduites adoptent une mauvaise conformation. L'ubiquitination de ces agrégats permet normalement leur élimination par le protéasome. Cependant, dans les cas pathologiques, ces agrégats ubiquitinés s'accumulent pour des raisons inconnues. Les agrégats étant en constante croissance, ils peuvent ainsi devenir trop imposants pour être dégradés par le protéasome et vont former des structures fibrillaires. Ces agrégats peuvent cependant être dégradés par autophagie grâce à leur reconnaissance par deux récepteurs autophagiques, SQSTM1 et NBR1 (Bjørkøy et al., 2005; Kirkin et al., 2009; Pankiv et al., 2007). Ces récepteurs sont capables de se lier à l'ubiquitine accumulée sur les agrégats protéiques par leur domaine UBA (pour « Ubiquitin Associated »). Ils peuvent aussi classiquement se lier à LC3/GABARAP par leur domaine LIR et ainsi provoquer la formation d'autophagosomes autour de leurs substrats. L'action de ces récepteurs est amplifiée par plusieurs mécanismes : NBR1 possède par exemple

deux domaines LIR ce qui pourrait augmenter son avidité de liaison avec LC3/GABARAP. De plus, NBR1 et SQSTM1 sont capables de se dimériser par leurs domaines Coiled-Coil et PB1 respectivement (Johansen and Lamark, 2011). Enfin, SQSTM1 peut aussi se lier à la protéine Alfy (pour «autophagy-linked FYVE») par son domaine PH-BEACH. Il a été montré ce que cette interaction est nécessaire au recrutement des systèmes de conjugaison ATG5-ATG12 et LC3 au niveau des agrégats positifs pour SQSTM1 ce qui suggère qu'Alfy sert de plateforme d'assemblage durant l'aggréphagie (Clausen et al., 2010). Il reste encore de nombreuses inconnues concernant notamment la régulation de l'aggréphagie et donc ses liens avec la physiopathologie des maladies neurodégénératives caractérisées par l'accumulation de ces agrégats protéiques comme la chorée de Huntington, la maladie d'Alzheimer ou encore la maladie de Parkinson. Si toutes ces maladies ont pour point commun l'accumulation de protéines agrégées, huntingtine pour la chorée de Huntington, alpha-synucléine pour la maladie d'Alzheimer et tau pour la maladie de Parkinson, il n'est pas encore établi si ces agrégats sont la cause ou la conséquence de la maladie. Il semblerait cependant que ces agrégats soient toxiques pour la cellule car ils modifient ou empêchent la fonction primaire de la protéine par exemple.

- Réticulophagie :

Le réticulum endoplasmique est l'un des organites majeurs de la cellule où il assure la synthèse des protéines et des lipides et leur contrôle qualité mais aussi l'homéostasie ionique de la cellule. C'est donc un organite extrêmement surveillé et renouvelé et l'autophagie participe à ce renouvellement en capturant et dégradant des portions du réticulum. S'il a été très tôt observé dans l'histoire de l'autophagie qu'elle pouvait sélectivement séquestrer et dégrader du réticulum au cours de la réticulophagie, ce n'est que très récemment que l'équipe d'Ivan Dikic a identifié le récepteur impliqué dans ce processus (Khaminets et al., 2015). Ainsi en réalisant un crible double-hybride en utilisant les deux membres les plus exprimés de la famille LC3/GABARAP (LC3B et GABARAPL2) comme appâts, les auteurs de cette étude ont découvert que des membres de la famille des protéines réticulaires FAM134 peuvent interagir avec LC3/GABARAP (Khaminets et al., 2015). FAM134B possède notamment un domaine LIR et la reconnaissance du réticulum à dégrader se fait de manière directe car les protéines de la famille FAM134 sont des récepteurs ancrés dans la membrane du réticulum. De plus, l'absence de FAM134B entraîne une augmentation du réticulum dans les cellules humaines mais aussi chez des souris knock-out due à une diminution de la réticulophagie. De manière fort intéressante, l'expression de formes mutées de FAM134B retrouvées chez des patients atteints de neuropathie sensorielle provoque un dysfonctionnement de la réticulophagie dans les cellules en culture de même que chez les souris qui ensuite développent elles-aussi une neuropathie (Khaminets et al., 2015). Si cette étude est la première à démontrer l'existence de

récepteurs autophagiques spécifiques du réticulum, le mécanisme permettant de sélectionner les portions du réticulum à dégrader reste encore à découvrir.

- Mitophagie :

La présence de mitochondries dans des autophagosomes fut comme pour le réticulum très vite observée et caractérisée chez la levure. Cependant, il faut attendre les années 2000 avant que la mitophagie soit formellement observée chez les mammifères (Elmore et al., 2001). L'élimination des mitochondries par mitophagie est un mécanisme critique dans la cellule afin de prévenir l'accumulation de mitochondries endommagées mais aussi de contrôler leur nombre dans les cellules. Enfin, l'élimination de mitochondries fonctionnelles est aussi capitale durant certains processus de développement. Par exemple, les hématies sont des cellules dépourvues de mitochondries et les premières démonstrations et descriptions de la mitophagie furent réalisées sur des réticulocytes. En effet, au cours de leur maturation en hématies, les réticulocytes éliminent leurs mitochondries par mitophagie grâce au récepteur autophagique NIX (aussi appelé BNIP3L) (Schweers et al., 2007). NIX est une protéine localisée sur la membrane externe de la mitochondrie et contient un domaine LIR lui permettant de lier GABARAP (Novak et al., 2010). La présence de NIX ayant un domaine LIR fonctionnel est capitale pour la bonne élimination des mitochondries au cours de la maturation des réticulocytes. De même, des souris n'exprimant pas NIX possèdent des hématies avec des mitochondries résiduelles ce qui démontre l'importance de la mitophagie dans ce processus. Une autre preuve de l'importance de la mitophagie au cours du développement vient cette fois-ci d'études menées chez le nématode *C.elegans*. Chez les métazoaires, l'ADN mitochondrial hérité est le plus souvent d'origine maternelle et les mitochondries apportées au cours de la fécondation par les gamètes mâles sont donc éliminées. Deux équipes, l'une française, l'autre japonaise, ont montré que chez *C.elegans* cette élimination est assurée par l'autophagie (Al Rawi et al., 2011; Sato and Sato, 2011). Une fois que la fécondation a eu lieu, les mitochondries paternelles sont ubiquitinées et les deux homologues de LC3 chez le nématode, LGG-1 et LGG-2, sont recrutés. De plus, l'absence de LGG-1 et LGG-2 empêche la mitophagie des mitochondries paternelles post-fécondation. Enfin, il semblerait que ce mécanisme soit conservé chez la souris ; l'équipe française a montré que la fécondation chez la souris induit le recrutement des protéines LC3 et GABARAP sur des zones ubiquitinées du spermatozoïde correspondant à la zone riche en mitochondries (Al Rawi et al., 2011).

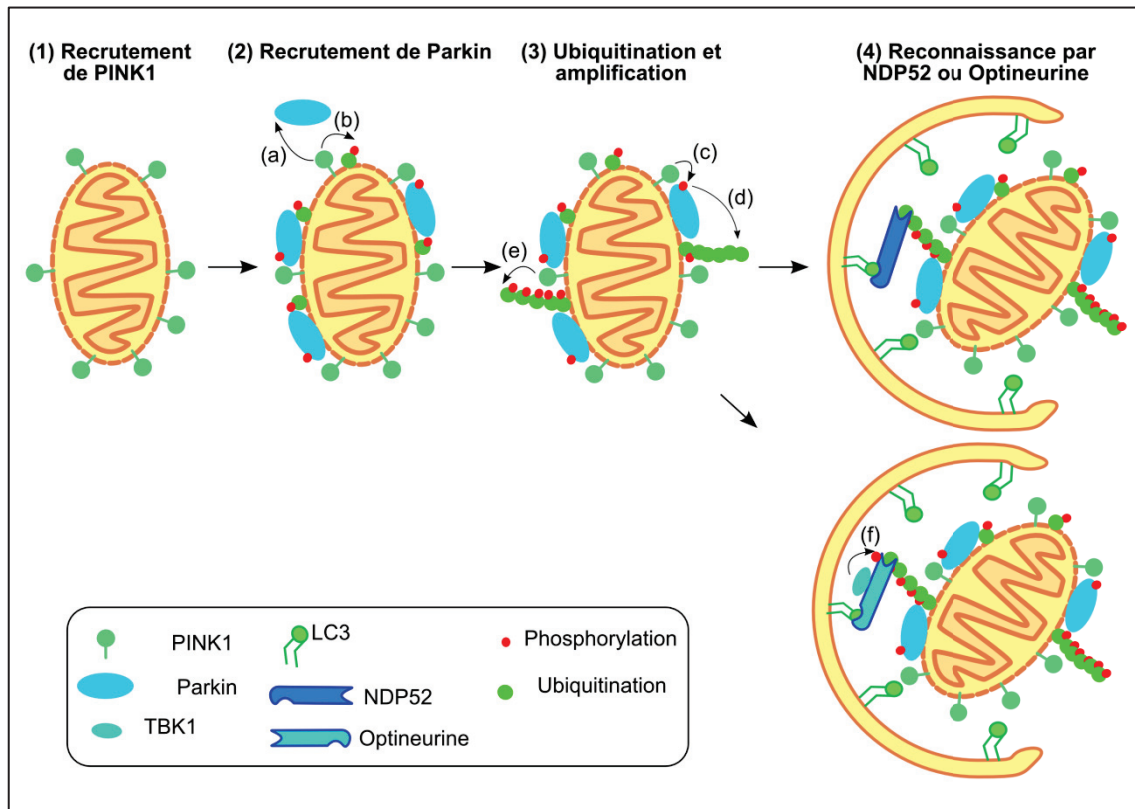
Enfin, la mitophagie permet aussi d'éliminer des mitochondries endommagées et de prévenir l'accumulation de radicaux néfastes pour la cellule et implique des récepteurs autophagiques de la famille des SLRs (Figure 8). Lorsqu'une mitochondrie arrive en fin de vie ou est endommagée, la perte de son potentiel membranaire ou l'accumulation de protéines

mal repliées à sa surface provoque le recrutement et la stabilisation de la kinase PINK1 sur sa membrane externe (Matsuda et al., 2010; Narendra et al., 2010b; Vives-Bauza et al., 2010). PINK1 va ensuite phosphoryler la sérine 65 de l'ubiquitine présente sur la membrane externe de la mitochondrie endommagée et ainsi activer l'activité ubiquitine ligase de Parkin (Koyano et al., 2014). Parkin amplifie l'ubiquitination de la mitochondrie ce qui permet le recrutement de récepteurs autophagiques liant l'ubiquitine à la membrane de la mitochondrie et son élimination par autophagie (Lazarou et al., 2015). SQSTM1 fut d'abord identifié comme un récepteur participant à la mitophagie dépendante de PINK1/Parkin en liant les mitochondries ubiquitinées et les autophagosomes (Geisler et al., 2010). Cependant, des études contredisent cette hypothèse et semblent indiquer que SQSTM1 participe en fait à l'agrégation pré-mitophagie des mitochondries (Narendra et al., 2010a; Okatsu et al., 2010). L'équipe de Youle a récemment réalisé une étude très complète du rôle des récepteurs autophagiques dans la mitophagie en utilisant des cellules HeLa n'exprimant ni SQSTM1, ni NDP52, ni Optineurine, ni NBR1, ni T6BP (Lazarou et al., 2015). Leurs résultats montrent que SQSTM1 n'est effectivement pas impliqué dans la mitophagie PINK1/Parkin dépendante et que seuls Optineurine et NDP52 sont cruciaux dans ce procédé. De manière intéressante, Optineurine et NDP52 fonctionnent de manière redondante dans la mitophagie et leur recrutement n'est dépendant que de PINK1. Le nouveau modèle proposé par l'équipe de Youle montre une forte amplification de l'ubiquitination grâce à la phosphorylation par PINK1 des chaînes d'ubiquitine nouvellement conjuguées par Parkin afin d'optimiser le recrutement d'Optineurine et NDP52 et ainsi assurer une mitophagie robuste et efficace (Lazarou et al., 2015). Enfin, il a été récemment montré que la kinase TBK1 permet aussi d'optimiser l'affinité de liaison d'Optineurine pour ses substrats (Richter et al., 2016). Durant la mitophagie, TBK1 peut se lier à Optineurine et phosphoryler son domaine de liaison à l'ubiquitine ce qui permet notamment à Optineurine de se lier aux chaînes d'ubiquitines phosphorylées. Ces récentes études sur la mitophagie et d'autres axées sur la xénophagie démontrent donc un rôle primordial des modifications post-traductionnelles dans l'amplification et l'optimisation de l'autophagie sélective.

Si la théorisation de l'autophagie sélective remonte aux premières heures de la découverte de l'autophagie, l'identification et la caractérisation des récepteurs autophagiques n'en est qu'à ses débuts. Initialement, leurs fonctions apparaissaient relativement simples et directes ; un récepteur reconnaît un substrat et par son interaction avec un membre de la famille LC3 permet sa capture et sa dégradation via l'autophagie. Aujourd'hui, les fonctions et mécanismes associés aux récepteurs autophagiques apparaissent de plus en plus complexes avec notamment des mécanismes de régulation et d'amplification de fonctions diversifiées et non plus limitées à la reconnaissance du substrat. Ainsi, un récepteur autophagique comme



NDP52 peut être impliqué dans la reconnaissance de plusieurs substrats mais aussi posséder des fonctions allant au-delà de cette simple reconnaissance. Ces substrats et fonctions de NDP52, l'un des principaux récepteurs étudiés dans ce manuscrit seront détaillés au cours des paragraphes suivants (voir paragraphe 1.3.3).



**Figure 8 : Mitophagie**

(1) La perte du potentiel de membrane de la mitochondrie stabilise PINK1 à sa surface. (2) PINK1 permet le recrutement de Parkin (a) et phosphoryle des peptides d'ubiquitine sur la membrane mitochondriale (b). (3) Parmi les substrats de PINK1 se trouve aussi Parkin (c) dont l'activité ubiquitine ligase est activée par cette phosphorylation (d). Les chaînes d'ubiquitine produites par Parkin sont elles aussi phosphorylées par PINK1 (e) ce qui amplifie l'activité ubiquitine-ligase de Parkin. (4) Enfin ces chaînes d'ubiquitine sont reconnues par NDP52 ou Optineurine ce qui permet la dégradation via l'autophagie de la mitochondrie. Dans le cas d'Optineurine, l'activité kinase de TBK1 permet la phosphorylation de son LIR et augmente l'affinité de liaison avec l'ubiquitine (f).

### 1.3.3 Le récepteur autophagique NDP52

NDP52 (pour Nuclear Dot Protein 52, aussi appelée CALCOCO2) est un récepteur autophagique de la famille des SLRs participant à la mitophagie PINK1/Parkin dépendante (Lazarou et al., 2015) mais également à l'élimination d'une bactérie intracellulaire, *Salmonella* Typhimurium (Thurston et al., 2009). NDP52 est une protéine de 446 acides aminés, capable de former des dimères et qui comme tous les récepteurs autophagiques possède des domaines de liaison à LC3/GABARAP, à ses substrats mais aussi aux composants de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B via TBK1 (Thurston et al., 2009). La principale particularité de NDP52 est

de pouvoir reconnaître *Salmonella* de deux manières distinctes correspondant à deux étapes successives du cycle intracellulaire de la bactérie. Ces mécanismes seront décrits plus en détails dans les paragraphes successifs traitant de la xénophagie.

Notons cependant que l'une des caractéristiques de NDP52 est la manière dont elle se lie à LC3. En effet, il a été montré que NDP52 se lie avec une grande affinité avec LC3C lors de la xénophagie contre *Salmonella* Typhimurium et que cette liaison non seulement précède mais est nécessaire au recrutement des autres membres de la famille LC3/GABARAP sur la bactérie (von Muhlinen et al., 2012). Sans LC3C, il n'y a plus de ciblage de la bactérie vers l'autophagie par NDP52. Cette interaction de forte affinité est médiée par un LIR non canonique, nommé CLIR pour « non-Canonical LC3 Interacting Region » (von Muhlinen et al., 2012). Ce CLIR est constitué des acides aminés LVV (en position 135 à 137), et ne possède donc pas d'acide aminé aromatique caractéristique des LIR canoniques. Cette absence est compensée par de fortes interactions hydrophobes entre NDP52 et LC3C dans la poche formée par le CLIR.

Enfin, NDP52 a aussi été impliqué dans l'autophagie sélective contre une protéine agrégée participant au développement de la maladie d'Alzheimer ; la protéine tau. Chez les patients atteints d'Alzheimer, tau est anormalement phosphorylée ce qui déclenche son oligomérisation et participe à la dégénérescence neuronale. Il a été supposé que l'augmentation du stress oxydatif puisse être un des facteurs déclencheurs de la maladie (Kanninen et al., 2011). Il a été récemment montré que le facteur de transcription Nrf2 induit par le stress oxydatif participe à la dégradation de tau en augmentant les niveaux de NDP52 cellulaires (Jo et al., 2014). De plus NDP52 possède trois éléments de réponse au stress oxydatif dans sa région promotrice et co-localise avec la forme phosphorylée de tau dans les cerveaux de patients et de souris modèles pour Alzheimer (Jo et al., 2014; Kim et al., 2014). Cependant, il n'a pas encore été démontré que NDP52 reconnaisse tau ni de quelle manière si tel est bien le cas.

NDP52 est aussi lié à la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B, un facteur de transcription impliqué dans la réponse immunitaire innée et adaptative. En effet, NDP52 peut interagir avec la kinase TBK1 via le complexe NAP1/Sintbad (Thurston et al., 2009). TBK1 est un effecteur de la voie de signalisation non-canonique résultant dans l'activation de NF- $\kappa$ B. Cependant, le rôle de TBK1 durant la xénophagie reste mal connu bien que certaines données suggèrent une implication de TBK1 dans la réparation des vacuoles contenant les bactéries indépendamment de son activité dans la voie NF- $\kappa$ B (Radtke and O'Riordan, 2008). Plus récemment, une étude réalisée dans des cellules cancéreuses fait le lien entre autophagie basale et activation non canonique de la voie NF- $\kappa$ B par NDP52/TBK1 (Newman et al., 2012). S'il semble que NDP52 puisse provoquer une activation de cette voie, les mécanismes et circonstances exacts de cette action sont encore en cours d'élucidation et pourrait apporter des éclaircissements sur les tenants et les aboutissants de l'engagement de ce récepteur autophagique.

NDP52 est un récepteur autophagique impliqué dans au moins trois formes d'autophagie sélective : la mitophagie, l'aggréphagie et la xénophagie. Cependant NDP52 n'est pas le seul récepteur autophagique impliqué dans la xénophagie, qu'elle soit dirigée contre *Salmonella Typhimurium* ou contre d'autres pathogènes.

## **1.4 Pathogènes intracellulaires et autophagie**

Tout pathogène intracellulaire, qu'il soit obligatoire ou opportuniste, doit faire face à l'autophagie. En effet, toutes les cellules eucaryotes utilisent en permanence l'autophagie qui constitue alors la première ligne de défense intracellulaire autonome à travers la xénophagie. Cependant, notre compréhension de l'autophagie en contexte infectieux a grandement avancé au cours de la dernière décennie et a démontré que les liens entre autophagie et pathogènes ne se limitent pas à la xénophagie. L'évolution a permis une diversification des fonctions de l'autophagie, particulièrement chez les mammifères où elle s'inscrit dans les mécanismes de l'immunité aussi bien innée qu'adaptative. Mais l'évolution a aussi favorisé l'apparition de multiples stratégies d'échappement du côté des pathogènes : virus et bactéries peuvent éviter la dégradation autophagique de bien des façons. Certains pathogènes intracellulaires obligatoires comme les virus mais aussi quelques bactéries ont même acquis des mécanismes leur permettant de détourner l'autophagie à leur avantage.

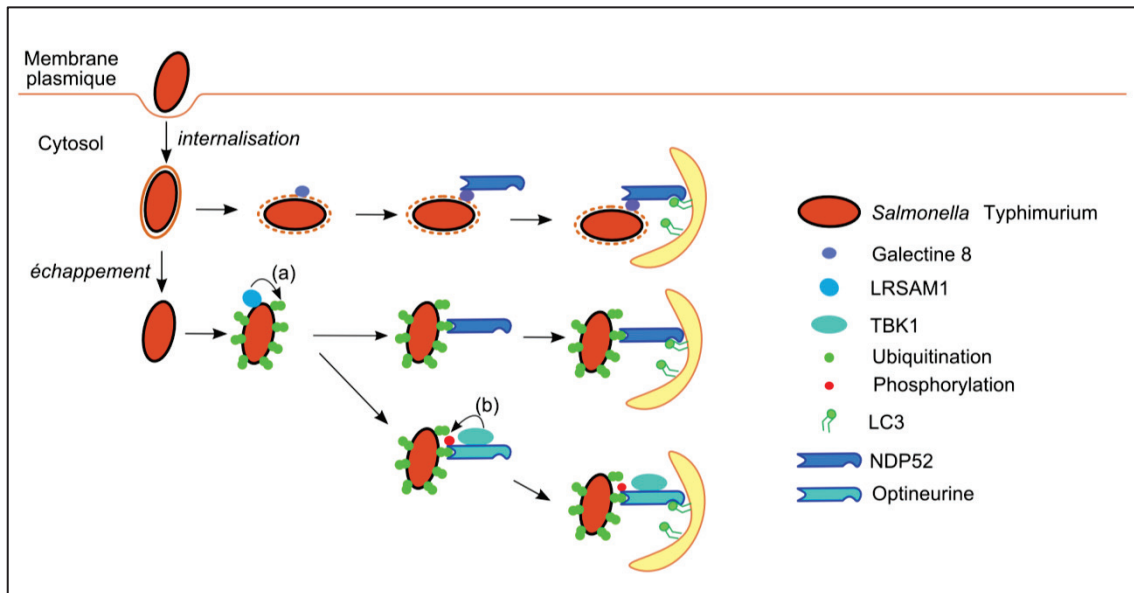
### **1.4.1 Dégradation par autophagie : la xénophagie**

La xénophagie est la dégradation par l'autophagie des pathogènes intracellulaires ; il s'agit d'une des premières lignes de défense immunitaire intrinsèque des cellules. Tous les pathogènes intracellulaires peuvent potentiellement être ciblés et dégradés par xénophagie. La xénophagie est donc une forme d'autophagie sélective et comme décrit précédemment sa sélectivité dépend de la reconnaissance de ses substrats par les récepteurs autophagiques. Parmi les récepteurs autophagiques, plusieurs ont été impliqués dans la xénophagie contre une variété de pathogènes comprenant des bactéries et des virus ; SQSTM1, NDP52, Optineurine, T6BP et NBR1, tous membre de la famille des SLRs. Il semblerait que les mécanismes de reconnaissance des bactéries et des virus par les récepteurs autophagiques diffèrent légèrement. En effet, dans le cas d'infections bactériennes ce sont des bactéries entières que l'on retrouve capturées dans les autophagosomes alors que durant les infections virales on retrouve essentiellement certaines protéines virales dans les autophagosomes et rarement des virions entiers.

Une des bactéries où le processus de xénophagie est le mieux décrit est *Salmonella Typhimurium* (Figure 9). *Salmonella Typhimurium* est une bactérie Gram négative intracellulaire opportuniste et l'agent causatif chez l'homme de la salmonellose, mais aussi de la fièvre typhoïde pour certaines souches. L'infection se produit par voie orale et *Salmonella*

peut alors coloniser les tissus épithéliaux du tractus intestinal. L'entrée de *Salmonella* Typhimurium dans les cellules épithéliales se fait par endocytose. Une fois dans la cellule, la bactérie va, en activant son système de sécrétion de type III, stimuler le trafic vésiculaire intracellulaire afin d'établir sa vacuole de réplication. Cependant, une conséquence de cette activation est la perturbation de l'intégrité de la membrane de la vésicule d'endocytose. Ces dommages provoquent l'exposition du côté cytosolique de la vésicule de  $\beta$ -galactosides auxquels peuvent se lier les galectines et notamment la galectine 8 (Thurston et al., 2012). Une fois liée à la membrane de la vésicule, la galectine 8 peut alors recruter NDP52 et ainsi provoquer la séquestration de la bactérie dans un autophagosome et sa dégradation (Thurston et al., 2012).

Cependant, *Salmonella* Typhimurium peut aussi s'échapper de la vésicule d'endocytose vers le cytosol où certaines protéines bactériennes, probablement de sa paroi, sont reconnues et conjuguées à l'ubiquitine. Cette ubiquitination est notamment médiée par l'E3 ubiquitine-ligase LRSAM1 qui se lie à *Salmonella* par son domaine LRR et conjugue à l'ubiquitine une ou des protéines bactériennes encore inconnues grâce à l'activité de son domaine RING (Huett et al., 2012). Ces chaînes d'ubiquitine sont ensuite reconnues par plusieurs récepteurs autophagiques qui agissent de concert : SQSTM1, Optineurine mais aussi NDP52 (Cemma et al., 2011; Wild et al., 2011). Ces trois récepteurs, une fois liés à la bactérie par leurs domaines de liaison à l'ubiquitine, vont recruter la machinerie autophagique par l'intermédiaire de leurs domaines LIR ou CLIR les liant à LC3/GABARAP. De plus, une fois encore la kinase TBK1 peut se lier à Optineurine et augmenter son affinité de liaison à LC3 en phosphorylant son LIR (Wild et al., 2011). Ce mécanisme est capital durant la xénophagie contre *Salmonella* médiée par Optineurine et pourrait être étendu aux autres récepteurs qui sont eux-aussi phosphorylables par TBK1 (Richter et al., 2016). Il est intéressant de noter la similitude des mécanismes et récepteurs autophagiques impliqués dans la reconnaissance des salmonelles et des mitochondries ubiquitinées.



**Figure 9 : Xénophagie de *Salmonella Typhimurium***

Après l'internalisation de *Salmonella Typhimurium*, deux mécanismes distincts permettent sa xénophagie. Pour les bactéries résidant dans une vésicule d'internalisation endommagées, ces dommages sont détectés par la Galectine 8 qui recrute NDP52. NDP52 recrute ensuite LC3C via son domaine CLIR ce qui permet la formation d'un autophagosome autour de la bactérie. En cas d'échappement de la bactérie dans le cytosol de la cellule, celle-ci va être ubiquitinée par l'E3 ligase LRSAM1 (a). Ces chaînes d'ubiquitine sont ensuite reconnues par NDP52 ou Optineurine et comme précédemment l'activité kinase de TBK1 permet d'augmenter l'affinité d'Optineurine pour l'ubiquitine (b).

D'autres bactéries peuvent être soumises à la xénophagie dans les cellules mammifères, par exemple *Streptococcus pyogenes* peut aussi être ubiquitinée et reconnue par NDP52 (Thurston et al., 2009). Cependant, *Streptococcus pyogenes* comme *Shigella flexneri* ou *Listeria monocytogenes* ont développé des moyens d'échapper à la xénophagie que nous détaillerons plus loin (voir paragraphe 1.4.2).

Tout comme les bactéries, les virus peuvent être soumis à la xénophagie. Cependant, il a rarement été observé la présence de virions entiers dans des autophagosomes. Néanmoins, la xénophagie peut permettre de dégrader certaines protéines virales essentielles à la réplication du virus et ainsi la bloquer. C'est le cas par exemple pour le virus de Sindbis, un virus enveloppé à ARN positif qui infecte le système nerveux central. Durant l'infection des neurones chez la souris, la capsid ubiquitinée de Sindbis est reconnue par SQSTM1 ce qui provoque sa dégradation par l'autophagie (Orvedahl et al., 2010). L'absence d'ATG5 chez les souris infectées par ce virus augmente la létalité du virus, démontrant donc l'importance de l'élimination de la capsid par xénophagie *in vivo* pour la protection des cellules contre l'apoptose induite par l'infection (Orvedahl et al., 2010). A l'inverse, la surexpression de Beclin-1 protège les souris contre l'encéphalite fatale provoquée par Sindbis (Liang et al., 1998). Dans le cas de Sindbis, les données actuelles suggèrent donc un rôle protecteur de l'autophagie durant l'infection.

Le virus de l'immunodéficience humaine (VIH-1) est un rétrovirus à l'origine chez l'homme du syndrome de l'immunodéficience acquise (SIDA). Ce virus isolé en 1983 par une équipe française (Barre-Sinoussi et al., 1983) est aujourd'hui considéré comme pandémique avec presque 37 millions de personnes infectées de par le monde, 2 millions de néo-infections et 1 million de victimes par an (WHO | Global update on the health sector response to HIV, 2014). Le VIH-1 a pour particularité d'infecter principalement les macrophages et les lymphocytes T ce qui finit par déclencher une immunodéficience chez les personnes infectées. En effet, après une phase d'infection aiguë, les patients entrent généralement en phase de latence avec une faible production de virions mais durant laquelle leur taux de lymphocytes T CD4 (LT CD4) diminue progressivement. Cette diminution aboutit au bout de plusieurs années à une immunodéficience profonde. Cette phase appelée phase SIDA est accompagnée de pathologies infectieuses et tumorales qui conduisent au décès des patients. Il n'existe pour l'instant aucun vaccin commercialisé contre ce virus, seulement des traitements antirétroviraux permettant de ralentir l'apparition de la phase SIDA. Le VIH-1 est donc encore extensivement étudié pour mieux comprendre ses interactions avec les cellules et organismes infectés. Ainsi, il apparaît que les liens entre autophagie et VIH-1 sont complexes et dépendent des cellules étudiées, macrophages ou lymphocytes, et que l'autophagie joue aussi bien un rôle anti- que pro-viral. L'infection des lymphocytes T CD4 (LT CD4) par le VIH-1 provoque une augmentation du flux autophagique (Wang et al., 2012). Cette autophagie peut être antivirale suite à la xénophagie d'une des protéines du VIH-1 cruciale pour l'établissement d'une infection productive dans les lymphocytes infectés : la protéine Tat (Sagnier et al., 2015). Tat est une protéine nécessaire pour la transcription de gènes viraux et sa dégradation dans les LT CD4 par SQSTM1 inhibe la réplication du virus dans ces cellules (Sagnier et al., 2015). De même, l'induction de l'autophagie par la Torin 1, un inhibiteur de mTOR, provoque une diminution de la réplication du virus (Sagnier et al., 2015) indiquant une action antivirale de l'autophagie dans ce cas. Néanmoins, l'autophagie a aussi des rôles proviraux durant l'infection par le VIH-1, rôles que nous détaillerons plus loin (voir paragraphe 1.4.3).

Ainsi, dans le cas des infections virales le rôle de l'autophagie et de la xénophagie est souvent peu clair avec parfois de grandes disparités entre les modèles humains et murins. Un autre exemple de cette dichotomie de l'autophagie durant les infections virales est très bien illustré par le virus Chikungunya. Chikungunya est un virus enveloppé à ARN positif appartenant aux *Alphavirus*, une famille de virus provoquant une arthralgie fébrile chez l'homme. Dans les cellules mammifères, le cycle de réplication est un cycle lytique qui implique donc le déclenchement de l'apoptose des cellules infectées afin de libérer les virions néo-synthétisés. Chez la souris, l'infection par Chikungunya déclenche une autophagie antivirale qui retarde l'apoptose cellulaire et diminue la réplication virale (Joubert et al., 2012)

tandis que chez l'homme cette autophagie a un rôle pro-viral (Krejebich-Trotot et al., 2011). L'autophagie a donc ici un impact spécifique selon l'espèce infectée qui influe sur le déroulement même de l'infection, les souris étant bien plus résistantes à l'infection que l'homme. Cette divergence s'explique par le rôle différentiel de deux récepteurs autophagiques durant l'infection ; SQSTM1 et NDP52. SQSTM1 reconnaît les protéines ubiquitinées de la capsid de Chikungunya chez l'homme et chez la souris, et cette reconnaissance provoque la dégradation de la capsid par xénophagie ce qui retarde l'apoptose et inhibe la réplication virale (Judith et al., 2013). SQSTM1 joue le même rôle chez l'homme et chez la souris ce qui peut notamment s'expliquer par un fort degré de conservation entre les protéines murine et humaine (89% d'identité entre les 2 séquences d'acides aminés). A l'inverse, NDP52 semble avoir un rôle pro-viral chez l'homme qu'il n'a pas chez la souris (voir paragraphe 1.4.3 pour plus de détails) (Judith et al., 2013). Chikungunya n'est pas le seul pathogène dont l'évolution a favorisé l'apparition de mécanismes de détournement de l'autophagie ; d'autres virus mais aussi bactéries ont la capacité d'utiliser l'autophagie au profit de leur prolifération.

#### **1.4.2 Mécanismes d'échappement à l'autophagie**

L'évolution favorisant les pathogènes pouvant se répliquer en dépit des défenses cellulaires, nombreux sont ceux qui ont acquis des mécanismes leur permettant d'échapper à l'autophagie. Ainsi, bactéries et virus ont développé plusieurs tactiques ; une première consiste à bloquer complètement l'autophagie dès l'initiation ou l'élongation, une autre stratégie est d'éviter la reconnaissance par les récepteurs autophagiques ou par les systèmes d'ubiquitination (Figure 10).

La famille des *Herpesviridae* regroupe des virus enveloppés à ADN et à forte prévalence chez l'homme et ayant pour particularité d'avoir une primo-infection associée à des symptômes cliniques suivie d'une latence souvent asymptomatique. De nombreux membres de cette famille ont développé des stratégies d'échappement à l'autophagie basées sur l'inhibition des étapes d'initiation de la formation du phagosome. Parmi eux le plus étudié est l'Herpes Simplex Virus de type 1 (HSV-1). HSV-1 est très largement répandu dans le monde et en Europe le taux de séropositivité varie entre 50% et 85% de la population suivant les états étudiés (Pebody et al., 2004). Enfin HSV-1 peut engendrer des neuropathies comme des encéphalites ou des méningites. Il a d'abord été montré que l'infection de cellules mammifères par HSV-1 induit une autophagie dégradant le virus (Tallóczy et al., 2006) et que cette dégradation permet d'augmenter la présentation d'antigènes d'HSV-1 par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe I (English et al., 2009). Cependant, HSV-1 peut aussi contrer l'autophagie induite durant l'infection en inhibant l'activité de Beclin 1 via l'expression d'ICP34.5 (Orvedahl et al., 2007), une protéine impliquée dans la neurovirulence d'HSV-1 (Markovitz et al., 1997). Il est intéressant de noter que cette stratégie d'inhibition de

l'autophagie via Beclin 1 est conservée au sein de la famille des *Herpesviridae*; le cytomégalovirus humain et le gamma herpesvirus inhibent tout deux l'activité de Beclin 1 et donc l'autophagie (Chaumorcel et al., 2012; Sinha et al., 2008). Mais HSV-1 peut aussi inhiber l'autophagie durant sa phase de latence via une autre protéine virale, Us11 mais cette fois-ci le mécanisme d'inhibition semble indépendant de Beclin 1 et dépendant de la protéine kinase PKR (Lussignol et al., 2013).

Certaines bactéries sont elles aussi capables d'échapper à la xénophagie, parmi elles citons par exemple *Shigella flexneri*, *Streptococcus pyogenes* et *Listeria monocytogenes* qui utilisent trois stratégies différentes pour échapper à l'autophagie.

*Shigella* est une bactérie gram négative extrêmement infectieuse et responsable de la dysenterie dans les pays en voie de développement. *Shigella* envahit principalement les tissus épithéliaux intestinaux et utilise les filaments d'actine pour sa dissémination de cellule en cellule (Vasselon et al., 1992). *Shigella* entre dans les cellules épithéliales par un mécanisme ressemblant à la phagocytose, puis rompt sa vacuole pour proliférer directement dans le cytoplasme des cellules. Après son internalisation, les dommages causés à la membrane de sa vacuole par la bactérie déclenche son ubiquitination, la reconnaissance par SQSTM1 et dégradation par xénophagie (Dupont et al., 2009; Mostowy et al., 2011). Cependant, *Shigella* possède un système de sécrétion de type III lui permettant de sécréter dans le cytosol des cellules infectées de nombreux effecteurs interférant avec la machinerie cellulaire. Parmi ses effecteurs, IcsB est localisé sur la paroi bactérienne et inhibe l'autophagie déclenchée par VirG, un autre effecteur du système de sécrétion de *Shigella* (Ogawa et al., 2005). Sans IcsB, la bactérie ne prolifère plus après quelques heures d'infection et reste piégée dans des vésicules autophagiques. Cependant, il semblerait que l'action d'IcsB sur l'autophagie ne soit pas directe mais passe par l'inhibition de VirG (Ogawa et al., 2005). *Shigella* échappe donc au moins partiellement à l'autophagie en modulant l'activité d'un de ses propres effecteurs qui déclenche l'autophagie. Cependant, il semblerait que ce qui était jusqu'ici considéré comme un déclenchement de l'autophagie durant l'infection par *Shigella* puisse en fait être une forme d'autophagie non canonique (voir paragraphe 1.4.4).

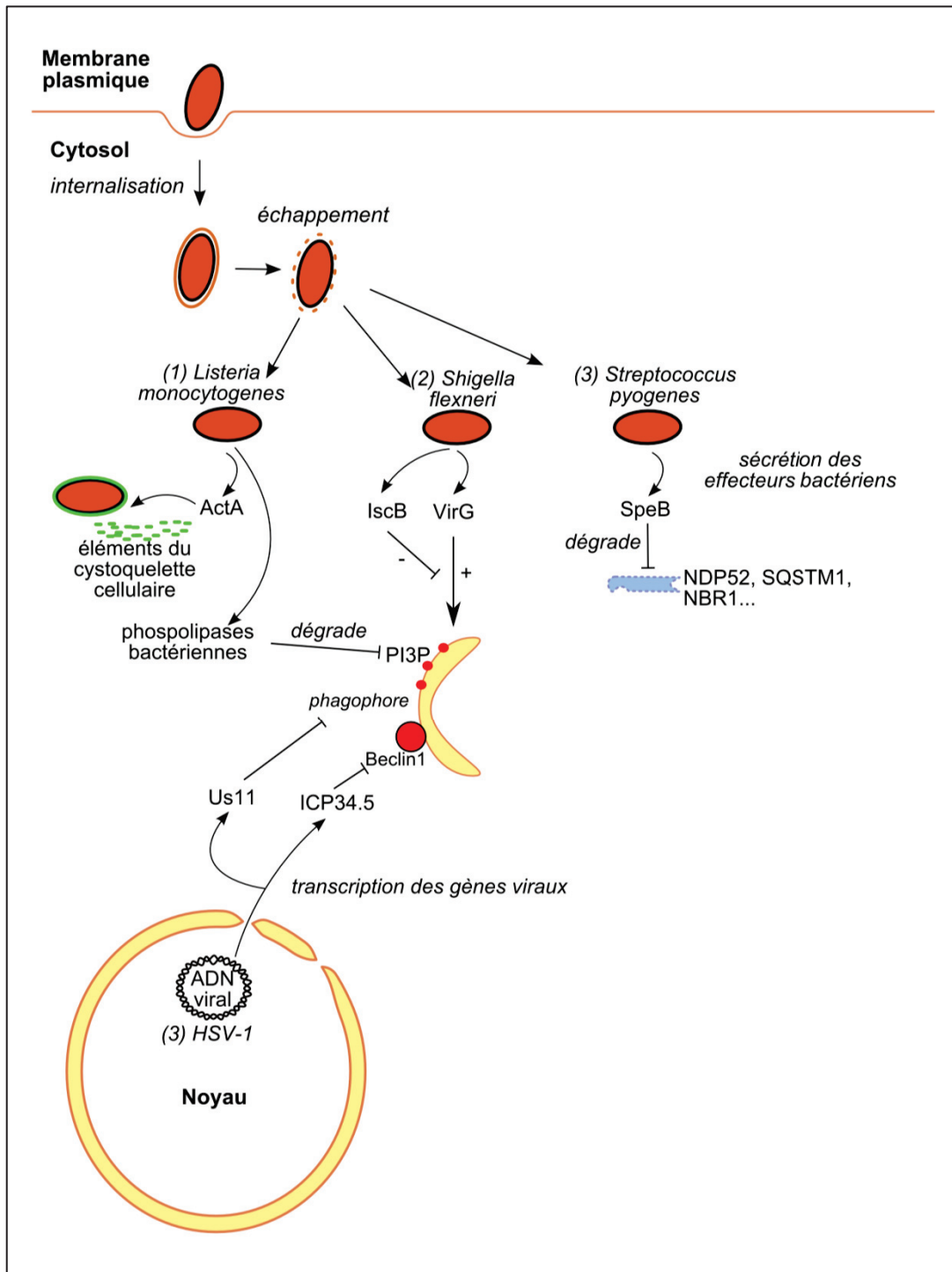
*Streptococcus pyogenes* est une bactérie gram positive responsable chez l'homme d'infections superficielles de la peau ou des amygdales causant des pathologies peu sévères comme l'impétigo ou des angines. Cependant, *Streptococcus pyogenes* est aussi liée à des pathologies plus sévères comme la fasciite nécrosante ou le syndrome du choc toxique. *Streptococcus pyogenes* est capable de se lier aux cellules via l'interaction entre ses adhésines et des protéines cellulaires comme les fibronectines ce qui permet ensuite son internalisation. Plusieurs souches de *Streptococcus pyogenes* ont été montrées comme étant dégradées par autophagie (Joubert et al., 2009; Thurston et al., 2009), cependant elles ne reflètent pas les sérotypes prévalents dans les infections humaines. Une souche correspondant au sérotype le



plus disséminé mondialement est, elle, capable d'échapper à la xénophagie (Barnett et al., 2013). Cette souche exprime une protéase SpeB capable de dégrader les récepteurs autophagiques normalement impliqués dans la xénophagie contre *Streptococcus pyogenes*; NDP52, SQSTM1 and NBR1 (Barnett et al., 2013). Cette souche de *Streptococcus pyogenes* possède donc une stratégie directe d'échappement à l'autophagie via la dégradation de certaines des protéines impliquées, ici les récepteurs autophagiques.

*Listeria monocytogenes* est une bactérie gram positive causant chez l'homme des gastroentérites fébriles mais aussi des septicémies et des méningites. *Listeria* est principalement transmise via de la nourriture contaminée et envahit préférentiellement les cellules épithéliales intestinales. Tout comme *Shigella*, une fois internalisée dans les cellules et sortie de sa vacuole *Listeria* peut utiliser les filaments d'actine pour se disséminer dans les cellules avoisinantes. De plus, *Listeria* peut aussi infecter les macrophages. Plusieurs facteurs bactériens ont été proposés pour expliquer l'échappement de *Listeria* à la dégradation par l'autophagie; les phospholipases bactériennes (Tattoli et al., 2013), la lysteriolysine O (Birmingham et al., 2008) ou encore le facteur de virulence ActA (Yoshikawa et al., 2009). Une fois internalisée, *Listeria* est contenue dans une vacuole et ne peut s'en échapper sans une forte expression d'une toxine permettant de former des pores dans la vacuole; la lysteriolysine O (LLO) (Birmingham et al., 2008). Si la bactérie n'exprime que peu de LLO, l'autophagie peut alors réparer cette vacuole, cependant la bactérie continue de proliférer dans la vacuole mais plus lentement que dans le cytosol (Birmingham et al., 2008). Une fois dans le cytosol, le facteur de virulence ActA permet le recrutement de protéines cellulaires dont des éléments du cytosquelette permettant la mobilité de la bactérie dans la cellule mais aussi l'échappement de la bactérie à l'ubiquitination cellulaire et la dégradation autophagique médiée par SQSTM1 (Yoshikawa et al., 2009). Enfin, les phospholipases bactériennes permettent la dégradation des structures pré-autophagosomales et limitent ainsi la dégradation des bactéries cytosoliques par l'autophagie (Tattoli et al., 2013). *Listeria* est donc l'une des bactéries qui apparaît comme ayant le mieux perfectionné l'art d'échapper à l'autophagie en contrant son action réparatrice de sa vacuole, en se « déguisant » pour échapper à la reconnaissance cellulaire et enfin en dégradant activement les structures initiant l'autophagie.

Certains pathogènes et notamment un nombre important de virus ne se contentent pas d'échapper à l'autophagie mais l'exploitent au profit de leur propre réplication.



**Figure 10 : Exemples de stratégies d'évitement de l'autophagie**

Les bactéries établissant leur réplique dans le cytosol ont diverses stratégies d'échappement à l'autophagie. (1) *Listeria monocytogenes* déploie deux stratégies lui permettant d'éviter l'autophagie ; l'effecteur ActA recrute des composants du cytosquelette autour de la bactérie ce qui empêche son ubiquitination tandis que les phospholipases bactériennes dégradent les PI3P et donc les structures pré-autophagosomales. (2) L'effecteur VirG de *Shigella flexneri* déclenche l'autophagie mais cette action est contrée par l'effecteur IscB. (3) Certaines souches de *Streptococcus pyogenes* sécrètent l'effecteur SpeB, une protéase qui dégrade les récepteurs autophagiques ce qui empêche la xénophagie de la bactérie. (4) Côté virus, HSV-1 possède deux protéines virales toutes deux capables d'inhiber l'initiation ; Us11 mais surtout ICP34.5 qui inhibe Beclin 1.

### 1.4.3 Détournement de l'autophagie

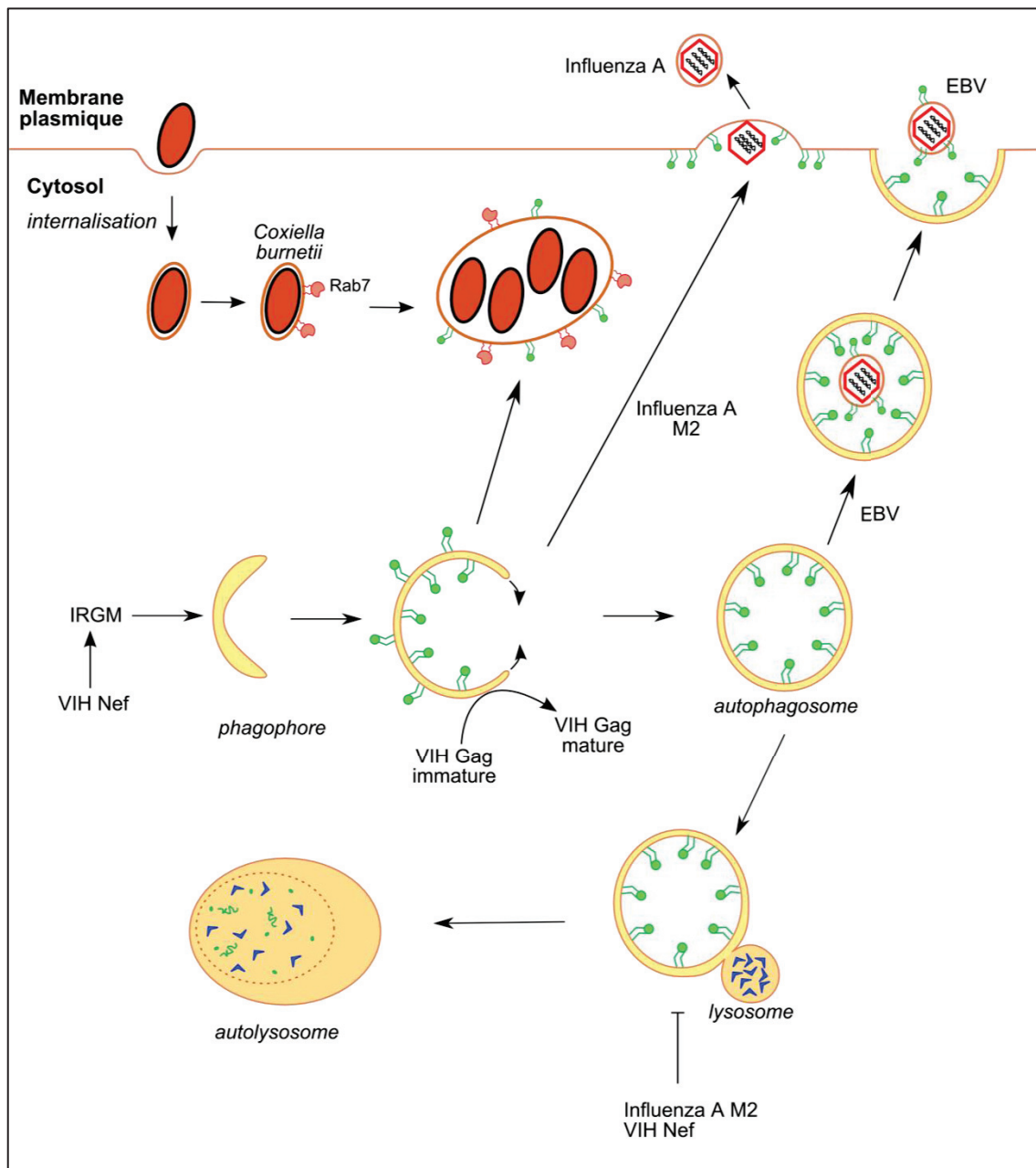
Certains pathogènes et notamment ceux ayant un cycle de réplication exclusivement intracellulaire ont acquis au cours de l'évolution des mécanismes leur permettant d'utiliser tout ou partie de l'autophagie au profit de leur réplication. De plus en plus d'études décrivent des stratégies microbiennes d'exploitation de l'autophagie à travers ses effets directs comme le recyclage de nutriments, la production d'énergie mais aussi à des fins structurales pour établir une niche de réplication ou un site d'assemblage (Figure 11).

*Coxiella burnetti* est une bactérie gram négative intracellulaire stricte hautement infectieuse et responsable de la fièvre Q chez l'homme. *Coxiella* est capable de se répliquer *in vitro* dans différents types de cellules comme des fibroblastes, des cellules épithéliales ou encore des macrophages. Après internalisation par phagocytose, *Coxiella* a pour particularité d'établir sa niche de réplication dans une vésicule acide dérivant du phagolysosome (Baca et al., 1994). Il a depuis été montré que cette vacuole de réplication est positive pour la Rab GTPase Rab7 et que l'activité de Rab7 est nécessaire pour la formation de cette vacuole (Berón et al., 2002). De plus, cette vacuole possède des caractéristiques autophagiques ; elle est positive pour LC3 et les inhibiteurs chimiques classiques de l'autophagie empêchent sa formation (Berón et al., 2002). Enfin, l'induction d'autophagie par privation d'acides aminés durant l'infection par *Coxiella* favorise la formation de la vacuole et la prolifération de la bactérie indiquant que *Coxiella* utilise activement l'autophagie en plus de la voie endosomale pour l'établissement de sa vacuole (Gutierrez et al., 2005). Il a depuis été confirmé que l'autophagie participe activement à la formation de la vacuole de *Coxiella* par l'intermédiaire des effecteurs du système de sécrétion de type IV de la bactérie (Newton et al., 2014; Romano et al., 2007; Winchell et al., 2014). Cependant les mécanismes moléculaires permettant à *Coxiella* de détourner les autophagosomes pour assurer la formation et l'expansion de sa vacuole de réplication restent inconnus dû aux grands nombres d'effecteurs sécrétés par la bactérie.

Nous avons déjà mentionné que durant l'infection des lymphocytes par le VIH-1, l'autophagie permet la dégradation de la protéine Tat et joue ici un rôle antiviral (voir paragraphe 1.4.1). Cependant, d'autres études suggèrent un rôle proviral de l'autophagie aussi bien dans les lymphocytes de manière indirecte que dans les macrophages de manière directe. En effet, durant l'infection par le VIH-1, l'apoptose des lymphocytes T est un mécanisme proviral aboutissant au déclenchement de la phase SIDA de la maladie (Corbeil and Richman, 1995). Or, il a été montré que cette apoptose résulte de la simple interaction entre la protéine d'enveloppe du VIH-1 avec son récepteur CXCR4, et ce même sur les lymphocytes non infectés, et que cette apoptose est dépendante de l'autophagie (Espert et al., 2006). Enfin, lors de l'infection de macrophages par le VIH-1, plusieurs protéines virales interagissent avec des protéines de l'autophagie ce qui permet au virus d'exploiter une partie du processus pour

favoriser sa réplication. En effet, la protéine de surface du virus, Gag, interagit et co-localise avec LC3, et les étapes précoces de l'autophagie permettent alors sa maturation (Kyei et al., 2009). De plus, une autre protéine non structurale du virus, Nef, induit une autophagie provirale via IRGM, une protéine impliquée dans l'induction de l'autophagie en contexte infectieux via l'assemblage du complexe Beclin 1 (Chauhan et al., 2015; Grégoire et al., 2011). Enfin, Nef peut aussi retarder la maturation des autophagosomes, limitant ainsi la dégradation du VIH-1 et permettant l'utilisation des structures pré-autophagosomales pour sa réplication (Kyei et al., 2009). Le VIH-1 possède donc aussi des stratégies d'utilisation de l'autophagie à son profit malgré la dégradation d'une de ses protéines via xénophagie. Cet exemple illustre la complexité qui peut découler des interactions entre pathogènes et autophagie où bien souvent l'autophagie joue un rôle protecteur mais aussi délétère *in vitro*. Cette dichotomie peut parfois s'expliquer par l'utilisation de cellules différentes pour modéliser l'infection (ici lymphocytes et macrophages par exemple). Mais elle peut s'expliquer aussi par l'utilisation non pas de l'autophagie et de ses vésicules mais seulement de l'utilisation de protéines impliquées dans l'autophagie.

Influenza A est un virus de la famille des *Orthomyxoviridae* responsable des épidémies de grippe A à travers le monde. Les premières études sur les liens et l'impact de l'autophagie avec la réplication du virus furent conflictuelles. Certains groupes montrèrent qu'Influenza A induit l'autophagie ce qui participe au retardement de l'apoptose des cellules infectées et favorise donc la production de nouveaux virions (Zhirnov and Klenk, 2013; Zhirnov et al., 2002; Zhou et al., 2009). Cependant, une autre étude montre que la protéine de matrice M2 du virus peut bloquer la maturation des autophagosomes ce qui déclenche l'apoptose des cellules (Gannagé et al., 2009). Ce n'est que récemment qu'il a été montré que M2 possède un domaine LIR lui permettant de se lier à LC3 et de la relocaliser à la membrane plasmique, lieu d'assemblage des virions (Beale et al., 2014). Cette liaison à LC3 est nécessaire pour la formation de virions infectieux et servirait donc à favoriser la transmission du virus de cellule à cellule. Influenza A n'est pas le seul virus à utiliser l'autophagie et LC3 pour sa réplication. Le virus d'Epstein-Barr (EBV) utilise lui aussi l'autophagie pour son transport à travers la cellule et pour son assemblage (Granato et al., 2014; Nowag et al., 2014). Dans un mécanisme rappelant celui d'Influenza A, EBV bloque la maturation des autophagosomes et détourne les autophagosomes pour son transport intracellulaire et son assemblage (Granato et al., 2014). Une des protéines nécessaires à ce processus est LC3 qui est ensuite retrouvée incorporée dans l'enveloppe des virions néo-synthétisés (Nowag et al., 2014). Ces deux virus semblent donc utiliser à leur profit non seulement les membranes issues du processus autophagique mais aussi certaines protéines ATG pour assurer la production de virions infectieux. Il reste encore à démontrer si ces éléments ont un rôle structural durant l'assemblage des virions.



**Figure 11 : Exemples de stratégies de détournement de l'autophagie**

La bactérie *Coxiella burnetii* a pour particularité de proliférer dans une vacuole acide décorée par Rab7 et LC3. Il semblerait que *Coxiella* détourne des autophagosomes pour former cette vacuole. EBV semble aussi détourner des autophagosomes pour son transport à travers la cellule et son bourgeonnement, on retrouve même LC3 sur l'enveloppe virale. La protéine Nef du VIH-1 induit l'autophagie via IRGM et bloque la maturation des autophagosomes. Ce mécanisme pro-viral pourrait permettre la maturation de Gag ou l'établissement de complexes de répliquons. Influenza A détourne LC3 via le domaine LIR de sa protéine M2 vers la membrane plasmique. Ceci permet l'assemblage du virus et son bourgeonnement. M2 peut aussi bloquer la maturation des autophagosomes ce qui pourrait favoriser le détournement de LC3.

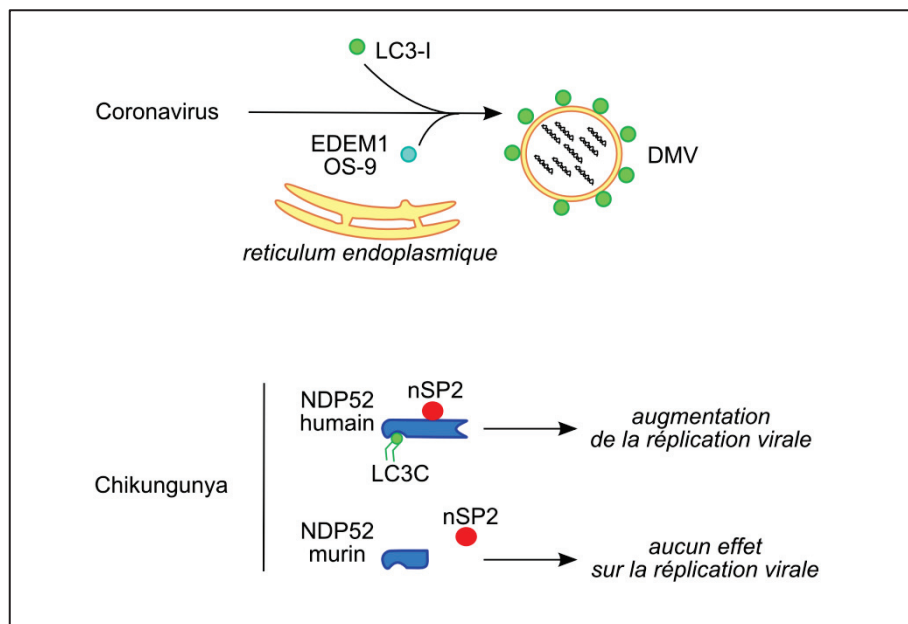
D'autres virus semblent utiliser des protéines impliquées dans l'autophagie pour des fonctions qui n'ont que peu ou pas de lien avec leurs fonctions autophagiques (Figure 12).

C'est le cas par exemple de Chikungunya dont nous avons détaillé la dégradation via SQSTM1 (voir paragraphe 1.4.1). Néanmoins, Chikungunya semble aussi utiliser un autre récepteur autophagique, NDP52, pour cette fois-ci favoriser sa réplication (Judith et al., 2013). En effet, chez l'homme NDP52 interagit avec la protéine virale non-structurale nsP2 et la protéine cellulaire LC3C. Ces interactions favorisent la réplication du virus, probablement via la formation de complexes de réplication (Judith et al., 2013). De manière intéressante, cet effet n'est pas retrouvé chez la souris où LC3C n'est pas exprimée et NDP52 est tronqué, ce qui abolit son interaction avec nsP2 (Judith et al., 2013). Cette dichotomie entre les deux espèces pourrait expliquer la faible permissivité des cellules murines pour Chikungunya. Le mécanisme moléculaire aboutissant à ce rôle pro-viral de NDP52 durant l'infection de cellules humaines par Chikungunya est encore inconnu mais il pourrait impliquer aussi bien une fonction de NDP52 dans la mitophagie ou la xénophagie comme un rôle non-autophagique, connu ou non.

En effet, il a été montré que certains virus utilisent des fonctions appelées non-canoniques ou non-autophagiques des protéines ATG. Les coronavirus sont des virus à ARN positif enveloppés parmi lesquels on trouve le virus de l'hépatite murine (MHV) et le virus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS). Ces virus ont pour particularité d'induire la formation de vésicules à double membrane (DMV) lors de leur réplication. Ces vésicules ressemblant fortement à des autophagosomes et provenant du réticulum endoplasmique la question d'un possible lien avec l'autophagie fut donc posée et investiguée. Certaines études font état d'un lien entre autophagosomes et DMV mais d'autres rapportent que la formation des DMV ne requiert qu'une partie de la machinerie autophagique et ne nécessite pas ATG5 (Cottam et al., 2011; Prentice et al., 2004; Zhao et al., 2007). Néanmoins, une étude a démontré que certains Coronavirus ne détournent en fait que LC3 et ce pour une fonction indépendante de l'autophagie. En effet, les Coronavirus utilisent la forme cytosolique LC3-I pour détourner des composants du système de dégradation protéique associée au réticulum et ainsi détourner des membranes pour sa réplication (Reggiori et al., 2010). De manière intéressante, ce détournement de LC3 ne nécessite pas sa lipidation et donc son implication dans l'autophagie classique. Ce détournement d'une ATG de son rôle autophagique suggère que les ATGs peuvent avoir des rôles en dehors de l'autophagie ce qui pourrait expliquer les liens entre l'autophagie et d'autres fonctions cellulaires mais aussi les données parfois contradictoires lors des études des liens entre autophagie et pathogènes intracellulaires.

Ainsi, certains pathogènes peuvent utiliser tout ou partie de la machinerie autophagique pour faciliter leur réplication. De plus, ce détournement exacerbe généralement une partie du fonctionnement autophagique au détriment d'une autre (induction de l'initiation au détriment de la maturation par exemple). Ceci rend l'utilisation de ces pathogènes en tant qu'outils pour disséquer les mécanismes moléculaires de l'autophagie

particulièrement attrayante. Enfin, l'autophagie non-canonique induite par certains pathogènes peut aussi beaucoup nous apprendre sur la régulation moléculaire de l'autophagie.



**Figure 12 : Exemples de stratégies de détournement de protéines impliquées dans l'autophagie**

Les coronavirus détournent LC3-I et les protéines du système de dégradation protéique associée au réticulum EDEM1 et OS-9 afin de former des vésicules à double membrane (DMV) qui permettent la réplication de leur génome. Chikungunya peut détourner NDP52 humain et LC3C via sa protéine non-structurale nSP2 pour favoriser sa réplication. Ce mécanisme est impossible dans les cellules murines du fait de la troncation du NDP52 murin.

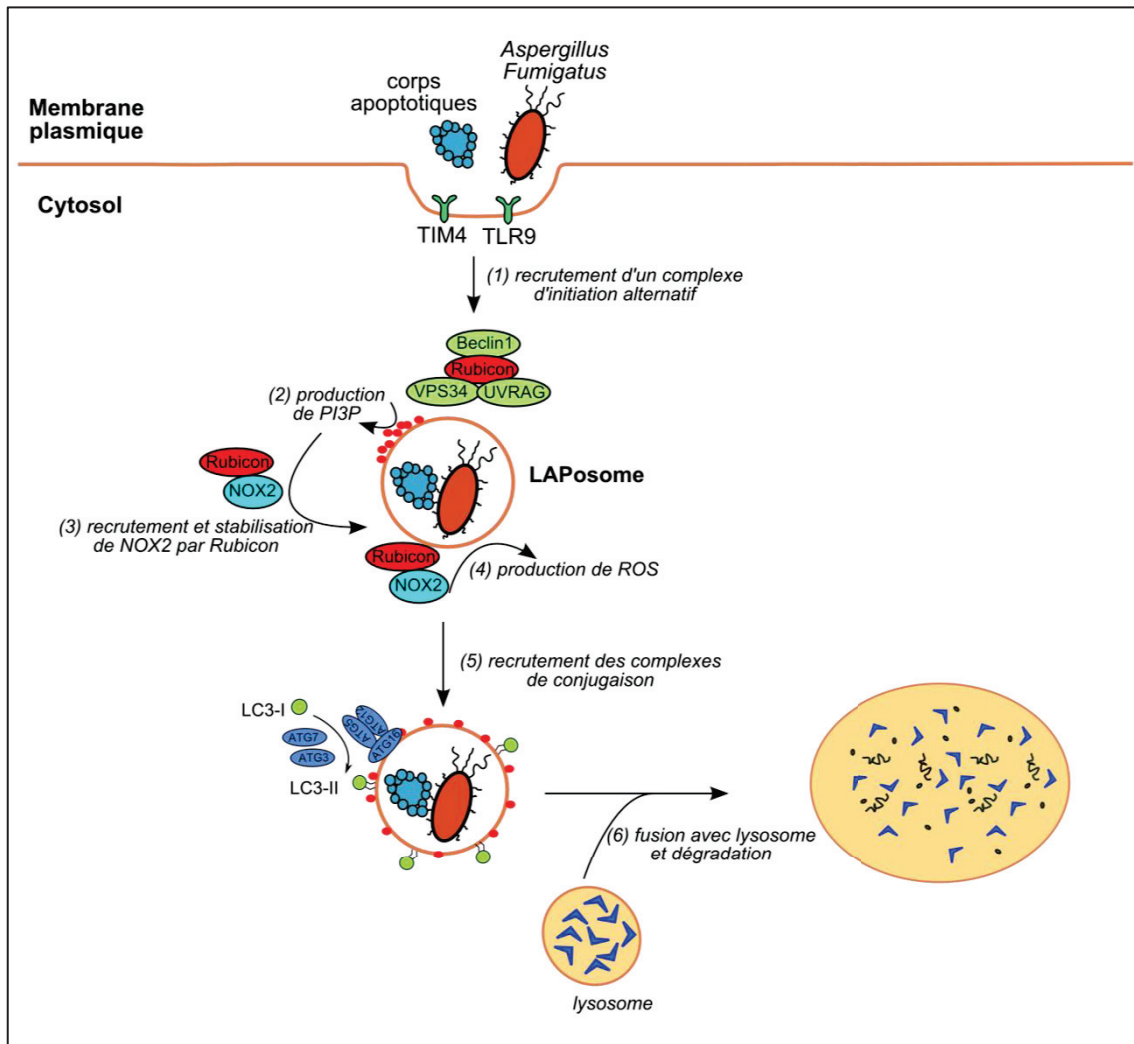
#### 1.4.4 Autophagie non-canonique en contexte infectieux

La xénophagie et la phagocytose sont deux procédés de dégradation des pathogènes très conservés et nécessitant la fusion de la vésicule de capture, autophagosome ou phagosome, avec les vésicules du système endo-lysosomal. La xénophagie assure la dégradation des pathogènes intracellulaires alors que la phagocytose prend en charge des pathogènes extracellulaires mais le processus de maturation des deux procédés est très similaire. Au point qu'il a récemment été démontré qu'il existe un mécanisme de phagocytose impliquant une partie de la machinerie autophagique ; la phagocytose associée à LC3 (LAP) (Figure 13). La première description de ce mécanisme fait état de l'induction d'un type de phagocytose de cellules mortes au cours duquel les phagosomes sont décorés par LC3 malgré le fait que ces vésicules ne possèdent qu'une seule membrane (Sanjuan et al., 2007). De plus, il a aussi été montré que ce mécanisme nécessite l'action d'ATG5, d'ATG7 mais aussi de VSP34 alors que FIP200 et ULK1 semblent ne pas être impliquées dans le déroulement du LAP (Florey et al., 2011). Deux études successives confirment l'existence du LAP et précisent son

importance dans la réponse inflammatoire. La première observe notamment la formation de vésicules de phagocytoses associées à LC3 en réponse à l'engagement du Toll Like Receptor 9 (TLR9) par des complexes immuns contenant de l'ADN. De plus, les auteurs montrent que cette réponse LAP est nécessaire pour la sécrétion d'interféron de type I par les cellules dendritiques plasmacytoïdes en réponse à ces complexes (Henault et al., 2012). La deuxième étude démontre quant à elle que le LAP est crucial dans l'élimination des cellules mortes par les macrophages et confirme le mécanisme moléculaire décrit précédemment en ajoutant l'implication de Beclin 1 dans la formation de ces vésicules alors nommées « LAPosomes » (Martinez et al., 2011). Depuis le mécanisme du LAP a été précisé par l'équipe de Douglas Green ; l'engagement du récepteur TIM 4 par des phosphatidylsérines déclenche le LAP (Martinez et al., 2011) par la formation d'un complexe Beclin 1 alternatif composé de Beclin 1, VPS34, UVRAG et enfin Rubicon qui est absolument nécessaire pour la production de PI3P au niveau de la membrane du LAPosome (Martinez et al., 2015). Cette production de PI3P associée à la présence de Rubicon permet de recruter le complexe NOX2 sur la membrane du LAPosome et donc de produire localement des espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Martinez et al., 2015). Enfin cette double production de PI3P et de ROS au niveau de la membrane du LAPosome permet le recrutement des complexes de conjugaison aboutissant à la lipodation de LC3 sur la face externe de la simple membrane du LAPosome (Martinez et al., 2015). De manière intéressante, il semblerait que cette conjugaison de LC3 permette d'optimiser la maturation du LAPosome et donc la dégradation de son contenu (Martinez et al., 2015).

Tout comme l'autophagie canonique, l'importance physiologique du LAP fut vite démontrée *in vivo* dans différents modèles murins ; le LAP est impliqué dans l'établissement de la vision au cours du développement mais aussi dans la régulation de la réponse inflammatoire suite à la phagocytose des cellules mortes (Kim et al., 2013; Martinez et al., 2016). Des souris déficientes pour des gènes impliqués dans le LAP ont une vision diminuée et peuvent développer un syndrome auto-immun similaire au lupus. Dans ces deux cas, l'étape clé est la maturation du LAPosome, puisque sans les composants aboutissant à la lipodation de LC3, le LAPosome ne mature pas. Etant donné la convergence mécanistique entre LAP et autophagie il est possible que LC3 joue un rôle primordial dans les étapes de maturation de ces deux mécanismes. Par ailleurs, un rôle des récepteurs autophagiques dans le LAP reste possible bien qu'il n'ait jamais été mis en évidence à ce jour.





**Figure 13 : Phagocytose associée à LC3 (LAP)**

L'engagement de TIM4 ou de TLR9 à la surface des cellules phagocytaires par des corps apoptotiques ou *Aspergillus fumigatus* déclenche la phagocytose associée à LC3. (1) Le LAP est initié par la formation d'un complexe d'initiation contenant Beclin 1, UVRAG, VPS34 et Rubicon. (2) Ce complexe d'initiation va produire à la membrane du LAPosome des PI3P. (3) Cette production de PI3P permet le recrutement et la stabilisation de NOX2 par Rubicon à la membrane du LAPosome. (4) NOX2 va produire des espèces réactives de l'oxygène (ROS) ce qui permet le recrutement des complexes de conjugaison (5). Enfin, la conjugaison de LC3 à la membrane du LAPosome permet la fusion avec les lysosomes (6) et la dégradation du contenu.

## 1.5 Présentation du projet de recherche

L'équipe des Pr Chantal Rabourdin-Combe et Mathias Faure fut l'une des premières à montrer que l'engagement d'un récepteur extracellulaire par un pathogène induit l'autophagie. Ce récepteur, CD46, peut être engagé par le virus de la rougeole ou la bactérie *Streptococcus pyogenes* et induit l'autophagie en recrutant le complexe Beclin 1 via une protéine d'assemblage, GOPC (Meiffren et al., 2010). Ce travail initia une étude approfondie des liens entre le virus de la rougeole et l'autophagie afin de mieux comprendre comment l'autophagie est régulée ou dérégulée par les pathogènes. L'équipe montra ainsi que le virus de la rougeole, un virus à ARN de la famille des *Paramyxoviridae*, induit et maintient un flux dégradatif d'autophagie au profit de sa réplication (Richetta et al., 2013). Afin d'élucider le mécanisme permettant au virus de la rougeole et à d'autres de détourner l'autophagie, l'ensemble des protéines connues pour participer à l'autophagie fut criblée afin d'identifier celles ciblées par des protéines virales. Ce crible mit au jour plusieurs protéines ciblées par ces virus parmi lesquelles IRGM (Grégoire et al., 2011). Une autre de ces protéines est le récepteur autophagique NDP52 déjà connu pour participer à la dégradation autophagique des mitochondries et de *Salmonella Typhimurium* (voir paragraphe 1.3.3). Mes travaux préliminaires au sein du laboratoire m'amènèrent à montrer que l'absence de NDP52 a un impact négatif sur la production de particules virales durant l'infection par le virus de la rougeole. Ce résultat fut surprenant ; NDP52 étant un récepteur autophagique connu pour dégrader au moins un pathogène, nous avons supposé que son absence serait bénéfique au virus. Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que NDP52 puisse avoir d'autres rôles dans la régulation de l'autophagie et avons donc tenté de les élucider.

Mes travaux de thèse se sont donc focalisés sur le ou les rôles potentiels des récepteurs autophagiques et particulièrement de NDP52 dans le déroulement de l'autophagie aussi bien dans des cellules saines qu'infectées par un substrat de ces récepteurs, *Salmonella Typhimurium*. Certains récepteurs comme NDP52, Optineurine et T6BP ont la capacité de se lier à la Myosine VI, qui comme nous l'avons dit, joue un rôle dans la maturation des autophagosomes (voir paragraphe 1.2.6). De plus, l'absence de NDP52 inhibe la réplication du virus de la rougeole, virus dont la réplication dépend d'un flux autophagique complet et donc d'une maturation des autophagosomes fonctionnelle. Mes travaux de thèse se sont donc orientés sur 3 axes de travail :

- l'élucidation d'un potentiel rôle pour NDP52 dans la maturation des autophagosomes aussi bien durant l'autophagie basale qu'en contexte infectieux
- la résolution des mécanismes moléculaires impliqués dans cette fonction dans ces deux contextes
- l'extension partielle de ces résultats à d'autres récepteurs autophagiques



## **Chapitre 2 Résultats**



## 2.1 NDP52 régule la maturation des autophagosomes (article publié dans *Cell Host & Microbe* Volume 17, Issue 4, Avril 2015, p515)

La xénophagie est un processus de défense cellulaire autonome utilisant l'autophagie pour l'élimination de pathogènes intracellulaires. Cette élimination repose sur la reconnaissance spécifique des pathogènes et leur capture dans les autophagosomes, puis sur leur dégradation après fusion des autophagosomes avec les lysosomes. La reconnaissance des pathogènes est assurée par une famille de protéines appelées récepteurs autophagiques qui ont la capacité de se lier aux pathogènes mais aussi aux autophagosomes via LC3. Parmi ces récepteurs, NDP52 a été décrit comme permettant l'élimination de *Salmonella* Typhimurium via la reconnaissance de l'ubiquitine ou de la galectine 8 côté bactérien et via son domaine CLIR permettant la liaison à LC3C côté autophagosomal.

Une fois capturés, les pathogènes doivent encore être dégradés suite à la maturation des autophagosomes fusionnant avec les vésicules du système endo-lysosomal et créant ainsi des autolysosomes acides et dégradatifs. Bien que la régulation moléculaire de ce processus soit mal connue, il a été récemment montré que la Myosine VI participe à la maturation autophagique en se liant aux endosomes via la protéine membranaire Tom1. De manière intéressante, la Myosine VI peut se lier à trois récepteurs autophagiques : NDP52, Optineurine et T6BP. De plus l'absence de la Myosine VI, de Tom1, ou des trois récepteurs bloque la maturation des autophagosomes (Tumbarello et al., 2012). Cependant, l'importance individuelle de ces récepteurs et les mécanismes moléculaires les impliquant dans la maturation des autophagosomes ne sont pas décrits.

Nous nous sommes donc demandé si NDP52 pouvait aussi participer à la maturation des autophagosomes contenant *Salmonella* Typhimurium grâce à sa liaison à la Myosine VI. En utilisant des cellules HeLa exprimant un mutant de NDP52 incapable de se lier à la Myosine VI, nous avons montré que *Salmonella* prolifère mieux dans ces cellules que dans les cellules contrôles (Figure 1A, condition siNPD52+NDP52 C425A). De plus, l'analyse par microscopie confocale montre que cela n'est pas dû à un mauvais ciblage des bactéries vers l'autophagie mais à un défaut de dégradation des bactéries séquestrées dans les autophagosomes (Figure 1B).

Nous avons aussi montré que l'absence de NDP52 dans des cellules HeLa non infectées entraîne un blocage de la maturation des autophagosomes en condition basale. En effet, l'absence de NDP52 provoque une accumulation de LC3-II, la forme lipidée de LC3, par rapport à LC3-I, la forme cytosolique (Figure 1C). De plus, dans des HeLa exprimant LC3 couplée à la GFP nous observons une accumulation de structures ponctiformes correspondant à des autophagosomes (Figure 1E). En utilisant des cellules HeLa exprimant LC3 couplée au

tandem GFP-RFP (Figure 2) nous avons démontré que l'absence de NDP52 provoque une accumulation d'autophagosomes (GFP et RFP positifs) au détriment des autolysosomes (RFP positifs mais GFP négatifs, la GFP étant sensible au pH acide). De manière intéressante ce résultat peut être étendu à Optineurine mais pas à SQSTM1, un autre récepteur impliqué dans la xénophagie contre *Salmonella* (Figure S4D).

Nous avons aussi montré que le rôle de NDP52 dans la maturation ne fait pas intervenir son domaine CLIR et LC3C (Figure 3). Nous avons identifié un autre domaine que nous avons nommé pseudo-LIR ou LIR-Like qui permet la liaison avec LC3A, LC3B et GABARAPL2 (Figure S2). Ce domaine pseudo-LIR est crucial pour la maturation des autophagosomes médiée par NDP52 dans des cellules saines (Figure S3). Enfin nous avons étendu ce mécanisme moléculaire à la xénophagie dirigée contre *Salmonella*, démontrant ainsi un double rôle de NDP52 durant la xénophagie (Figure 4).

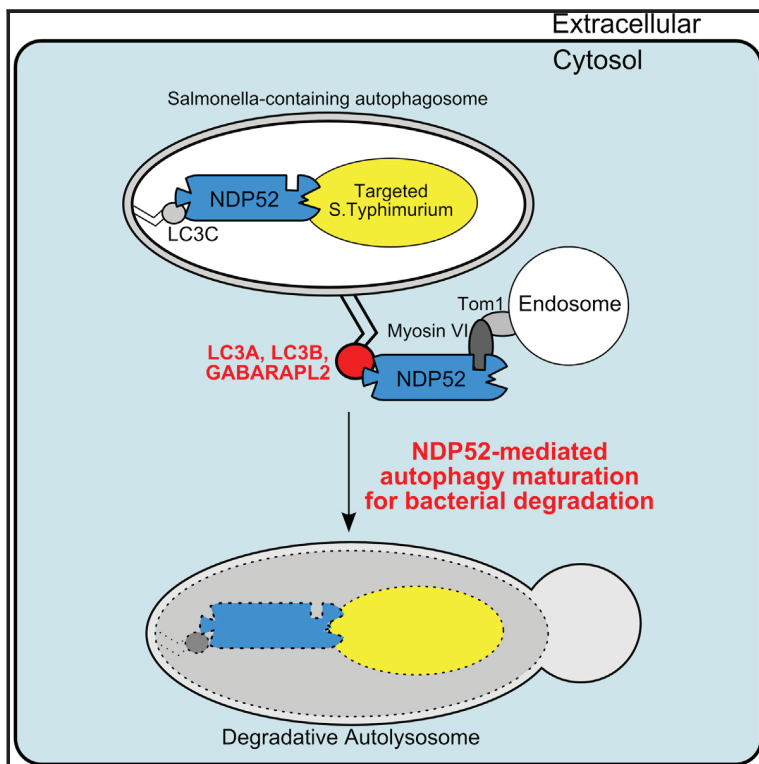
Ainsi, le rôle de NDP52 dans la maturation des autophagosomes dans des cellules infectées ou non par *Salmonella* fait intervenir des domaines de liaison et des partenaires moléculaires distincts de ceux impliqués dans le ciblage des bactéries vers la machinerie autophagique (voir graphical abstract de l'article et Figure S4F). De plus, il semblerait que d'autres récepteurs autophagiques se liant à la Myosine VI comme Optineurine puissent participer à la maturation des autophagosomes.

Nous avons donc démontré que NDP52 joue un double rôle durant la xénophagie ; tout d'abord celui de récepteur autophagique permettant le ciblage des pathogènes vers l'autophagie puis celui d'adaptateur autophagique facilitant la maturation des autophagosomes. Ce mécanisme pourrait permettre d'optimiser l'élimination des substrats capturés dans l'autophagosome. Dans le cas d'infection, il est en effet crucial d'éviter l'échappement des pathogènes séquestrés. Il est intéressant de noter que d'autres SLRs comme Optineurine et T6BP semblent partager cette nouvelle fonction de NDP52 (Tumbarello et al., 2015; Verlhac et al., 2015). Ainsi, nous désignerons ces trois SLRs, NDP52, Optineurine et T6BP, des mSLRs (m pour maturation). Ces résultats contribuent ainsi à mieux comprendre le déroulement de la maturation dans le flux autophagique mais aussi de mieux appréhender l'importance des récepteurs autophagiques dans l'autophagie sélective. Ce travail a fait l'objet de plusieurs commentaires présentés en annexe discutant plus longuement les implications potentielles de ces résultats.

# 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,<sup>1,2,3,4,5</sup> Isabel P. Grégoire,<sup>1,2,3,4,5</sup> Olga Azocar,<sup>1,2,3,4,5</sup> Denitsa S. Petkova,<sup>1,2,3,4,5</sup> Joël Baguet,<sup>1,2,3,4,5</sup> Christophe Viret,<sup>1,2,3,4,5</sup> and Mathias Faure<sup>1,2,3,4,5,\*</sup>

<sup>1</sup>CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, 69007 Lyon, France

<sup>2</sup>Inserm, U1111, 69007 Lyon, France

<sup>3</sup>CNRS, UMR5308, 69007 Lyon, France

<sup>4</sup>Ecole Normale Supérieure de Lyon, 69007 Lyon, France

<sup>5</sup>Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectologie, 69007 Lyon, France

\*Correspondence: [mathias.faure@inserm.fr](mailto: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 Brumell, 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-

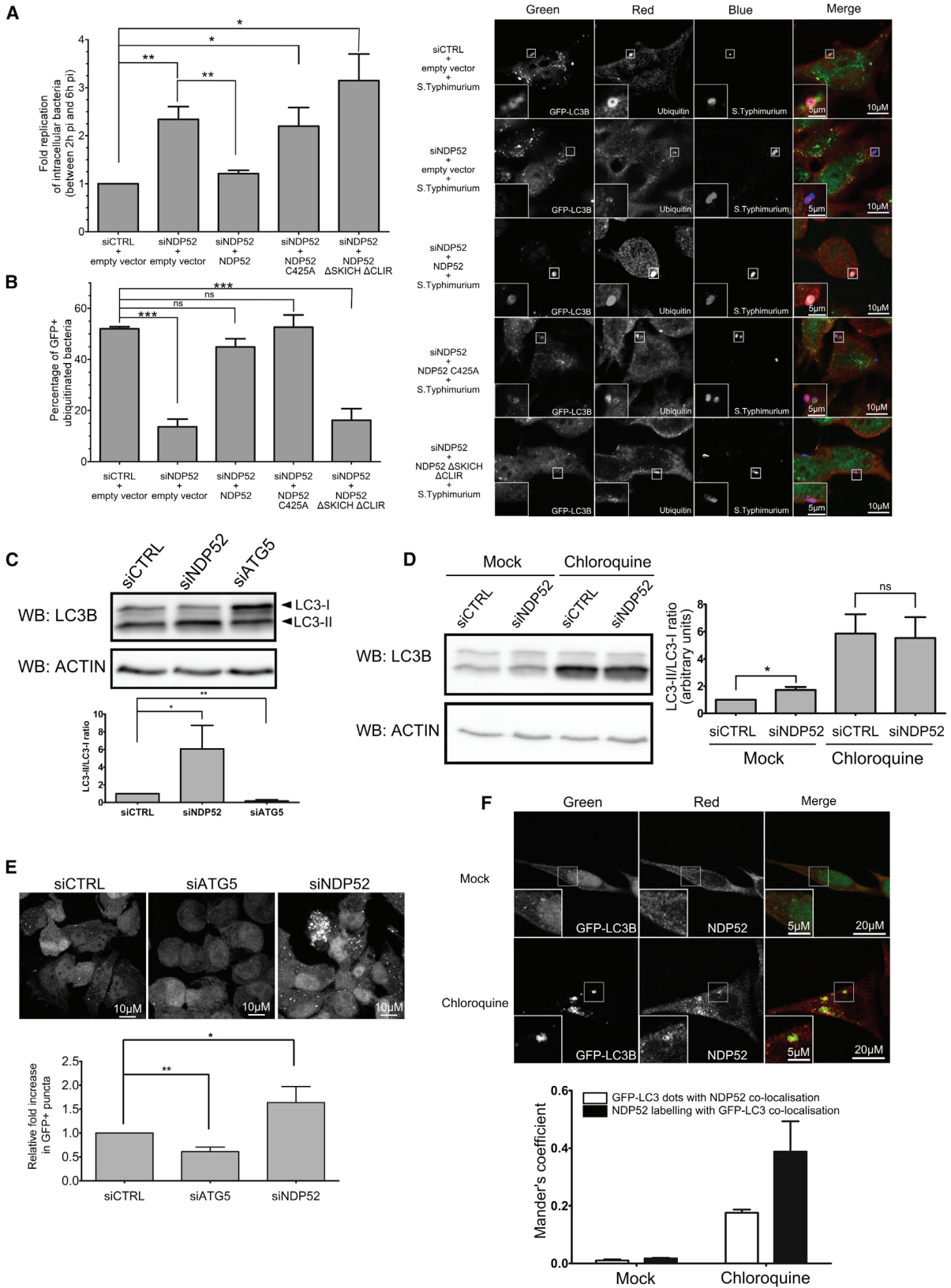
tion, a process known as xenophagy (Levine, 2005; Randow and Youle, 2014).

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  $\Delta$ SKICH $\Delta$ 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<sup>+</sup> autophagosomes in infected GFP-LC3-expressing HeLa cells. As expected, when compared with control cells, NDP52-deficient cells showed reduced GFP-LC3<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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  $t = 6 \text{ hr}/t = 2 \text{ hr}$  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.

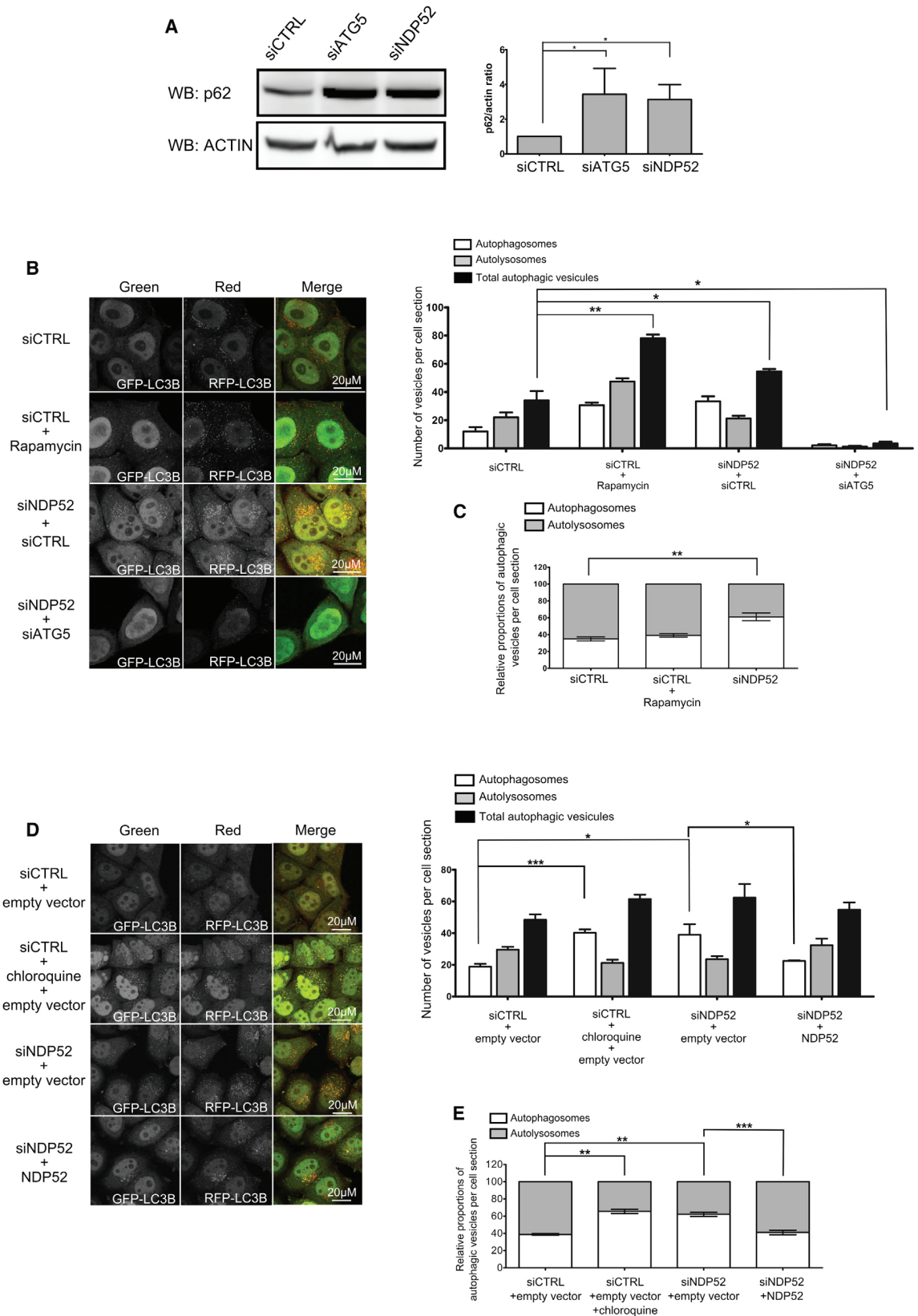
(C) HeLa cells transfected with the indicated siRNAs for 48 hr were lysed, and anti-LC3 or anti-ACTIN western blots were performed. Representative results are shown along with a graph representing the intensity of LC3-II/LC3-I bands normalized to the control condition.

(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<sup>+</sup> 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 NH<sub>2</sub>-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 X<sub>3</sub> (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

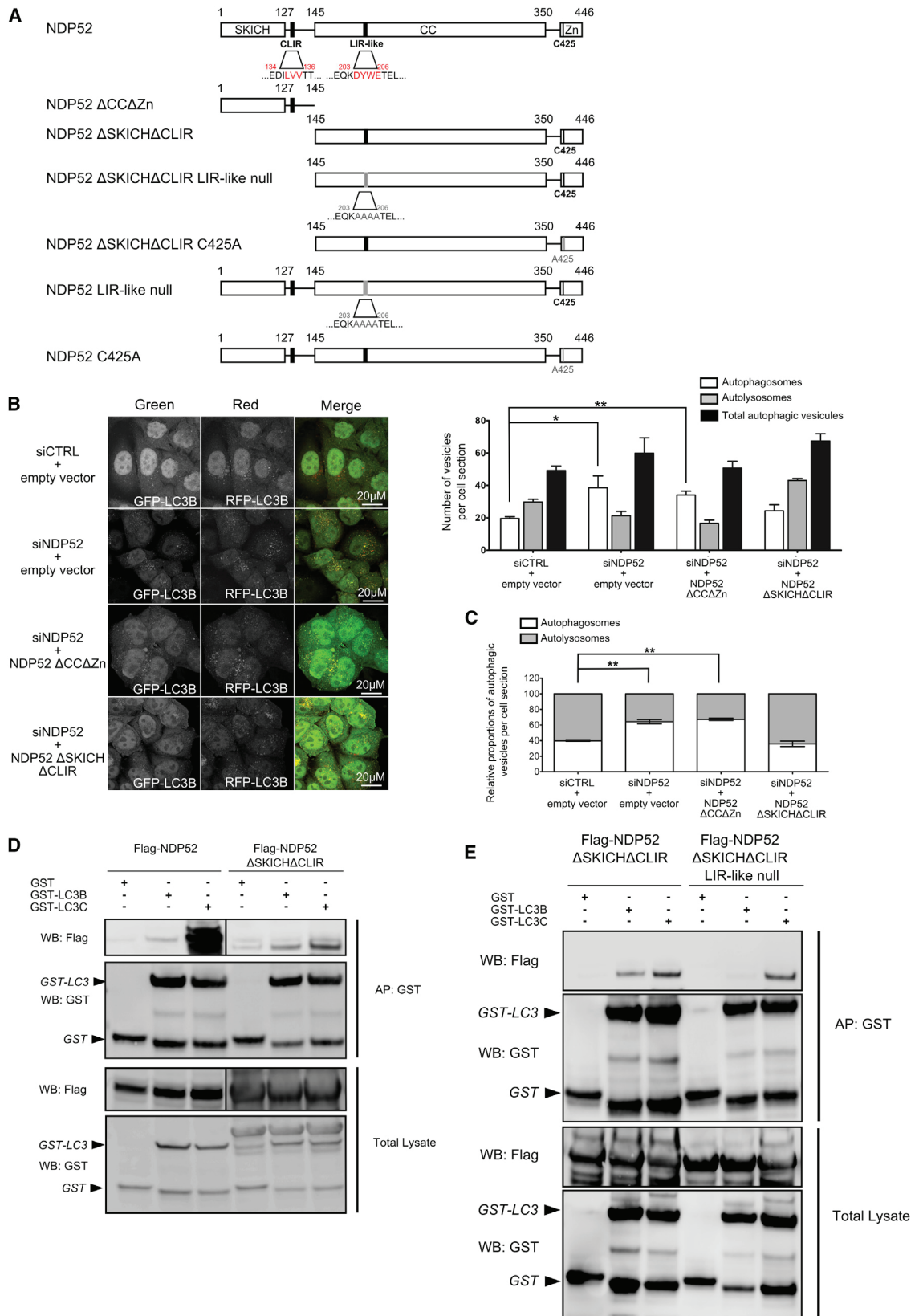
#### Figure 2. NDP52 Function in Autophagosome Maturation

(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<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> dots) and autolysosomes (RFP<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup> 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<sup>+</sup> 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  $\Delta$ SKICH $\Delta$ CLIR/LIR-like null) or no CLIR motif and no MYOSIN VI binding motif (NDP52  $\Delta$ SKICH $\Delta$ 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  $\Delta$ SKICH $\Delta$ 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.

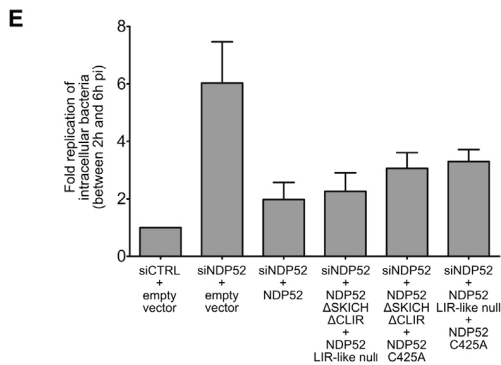
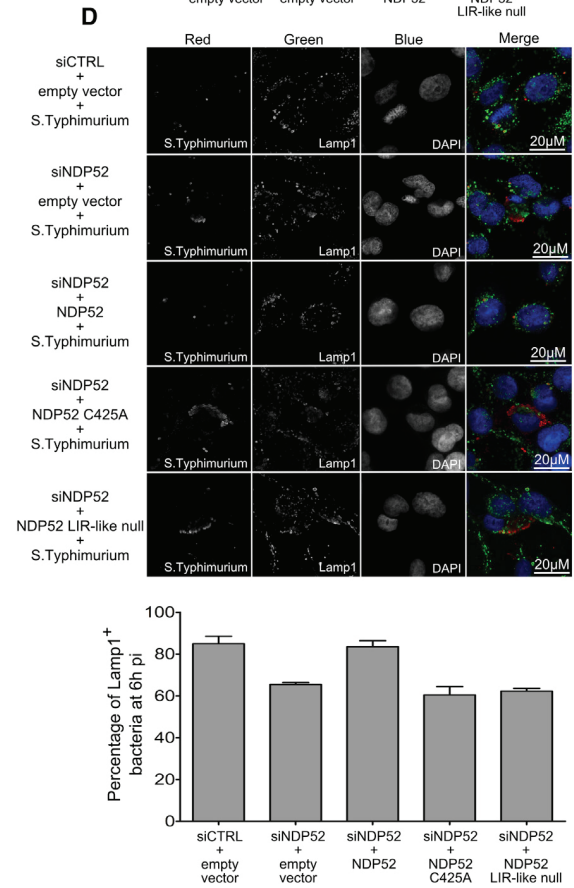
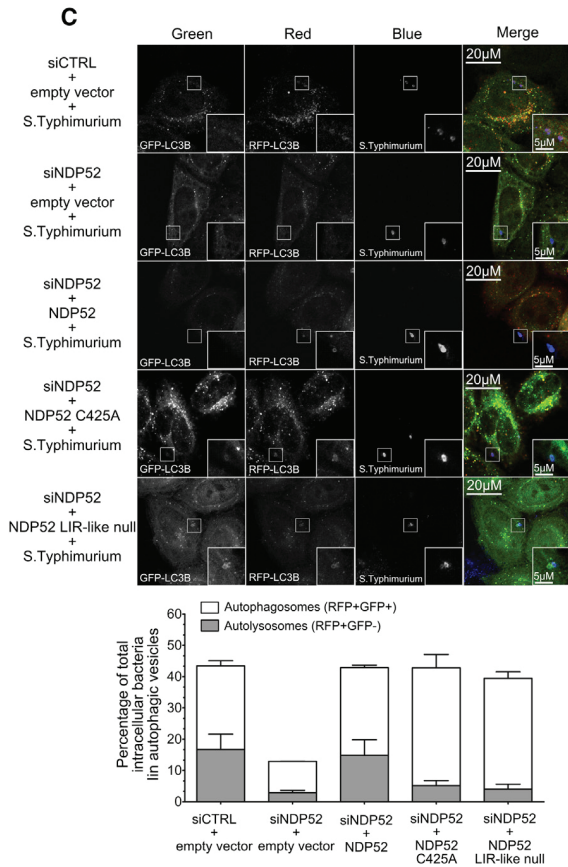
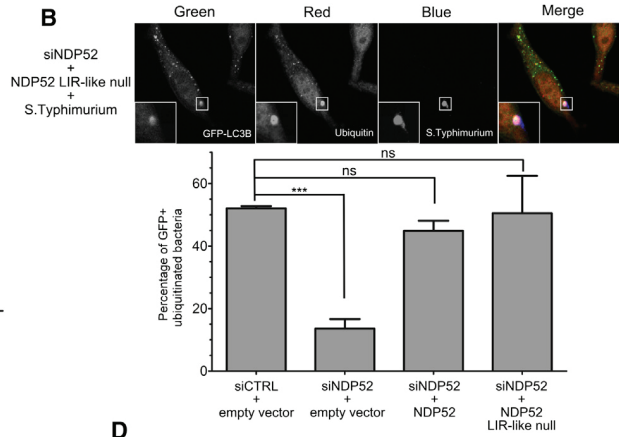
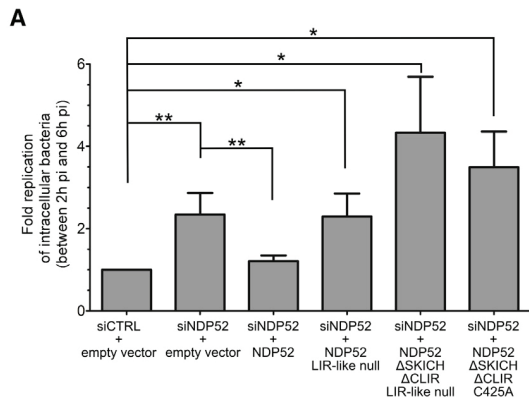
(B) mRFP-GFP-LC3 HeLa cells were transfected with the indicated siRNA for 48 hr before a second transfection with the indicated construct-encoding plasmid. Representative profiles of autophagosomes (RFP<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> dots) and autolysosomes (RFP<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup> dots) per cell section assessed by confocal microscopy are shown and were quantified. Results are expressed as absolute numbers of individual vesicles (total autophagic vesicles = all RFP<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> autophagosomes, which co-localized with NDP52, whereas most NDP52<sup>+</sup> 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, GABARAPL1, and GABARAPL2, 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 GABARAPL2, 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 GABARAPL2 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<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> dots) or autolysosomes (RFP<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup> 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  $\mu\text{g}/\text{ml}$  of Gentamicin. Additional 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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  $1 \times 10^5$  cells per well in OPTIMEM complemented with 10% FBS, 2 mM of L-glutamine, 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  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  $5 \times 10^4$  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 Française 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., McIver, E.G., Kamal, A., and Wilkinson, S. (2012). TBK1 kinase addition in lung cancer cells is mediated via autophagy of Tax1bp1/Ndp52 and non-canonical NF- $\kappa$ 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

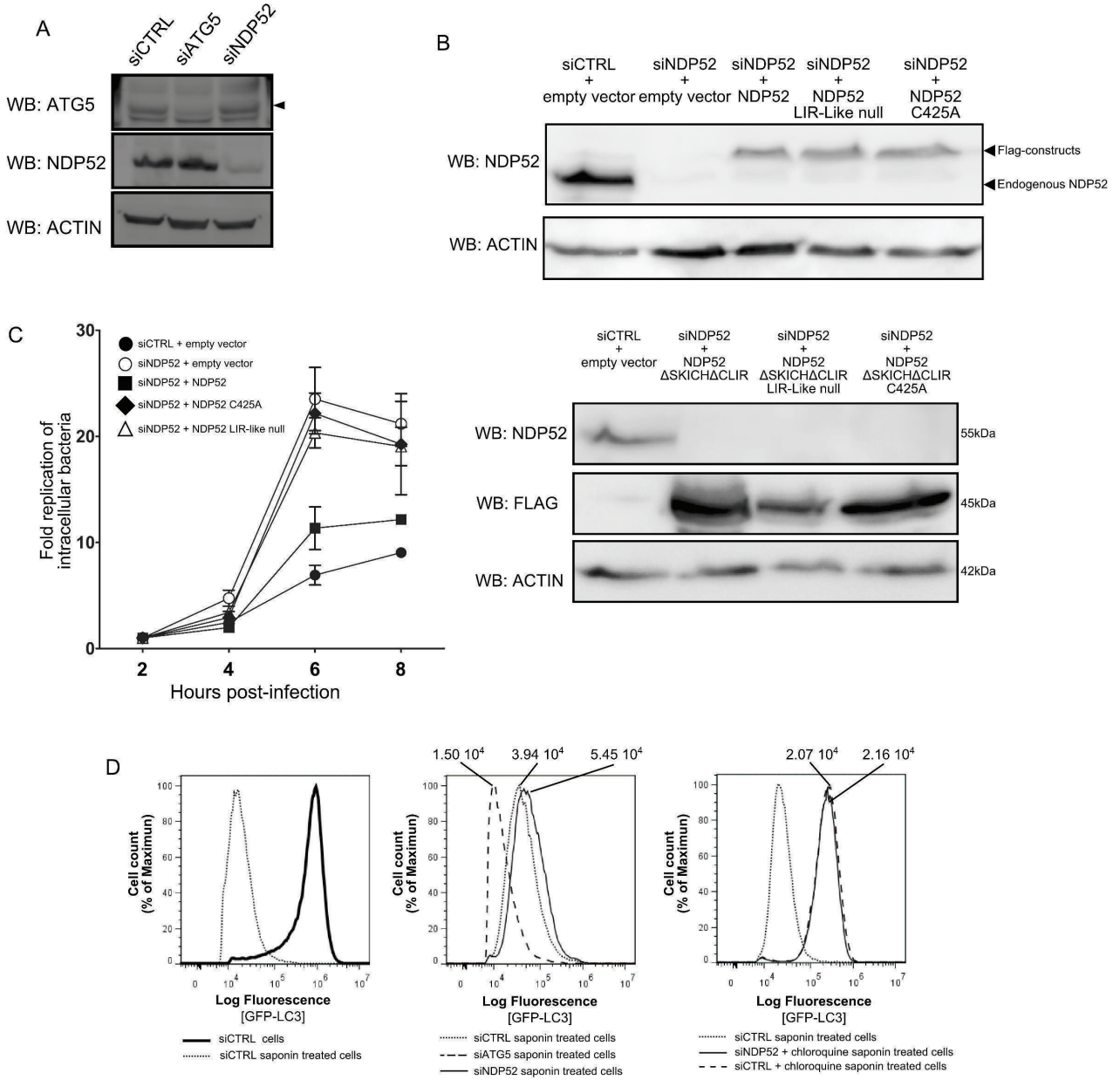


Figure S2

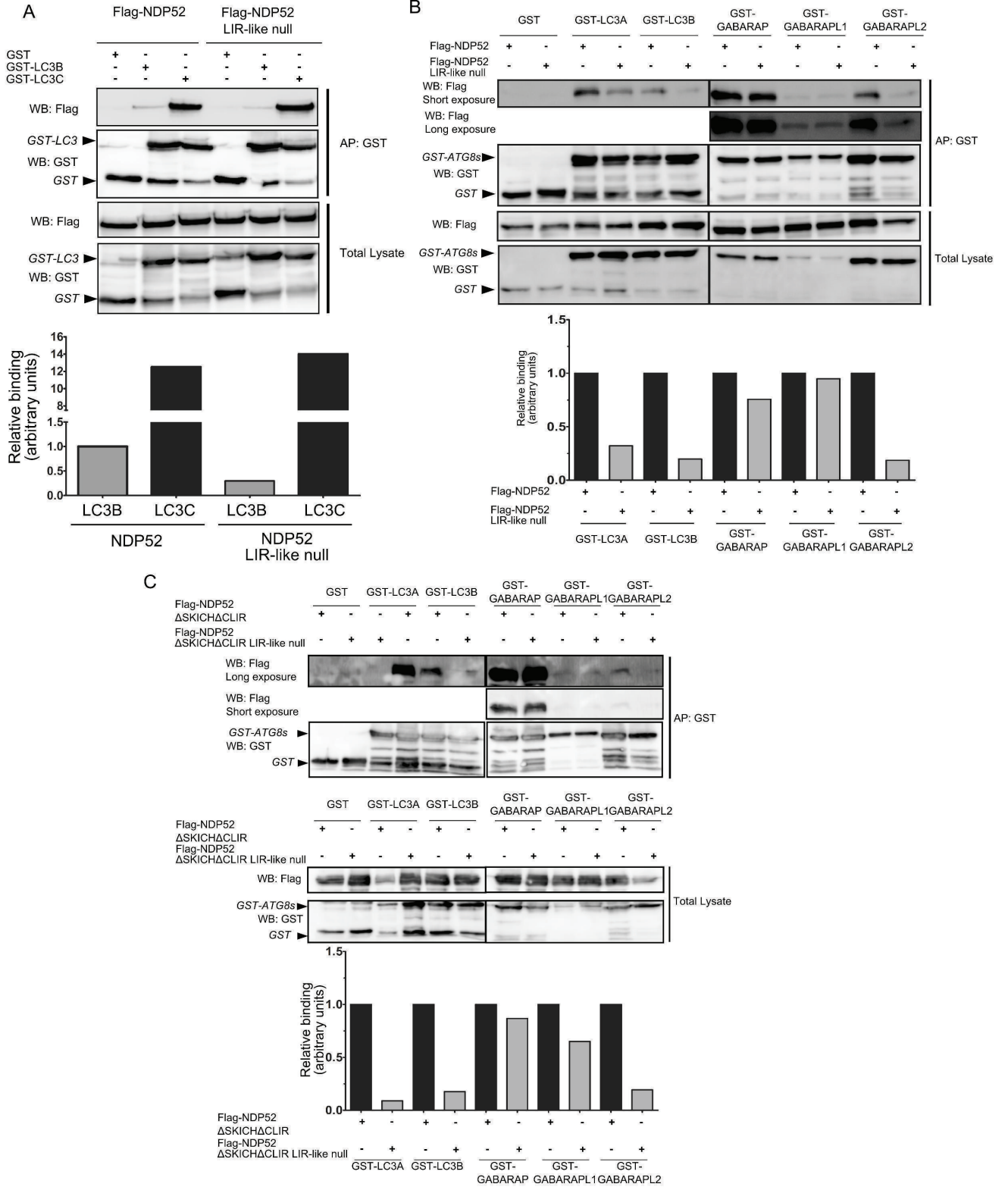
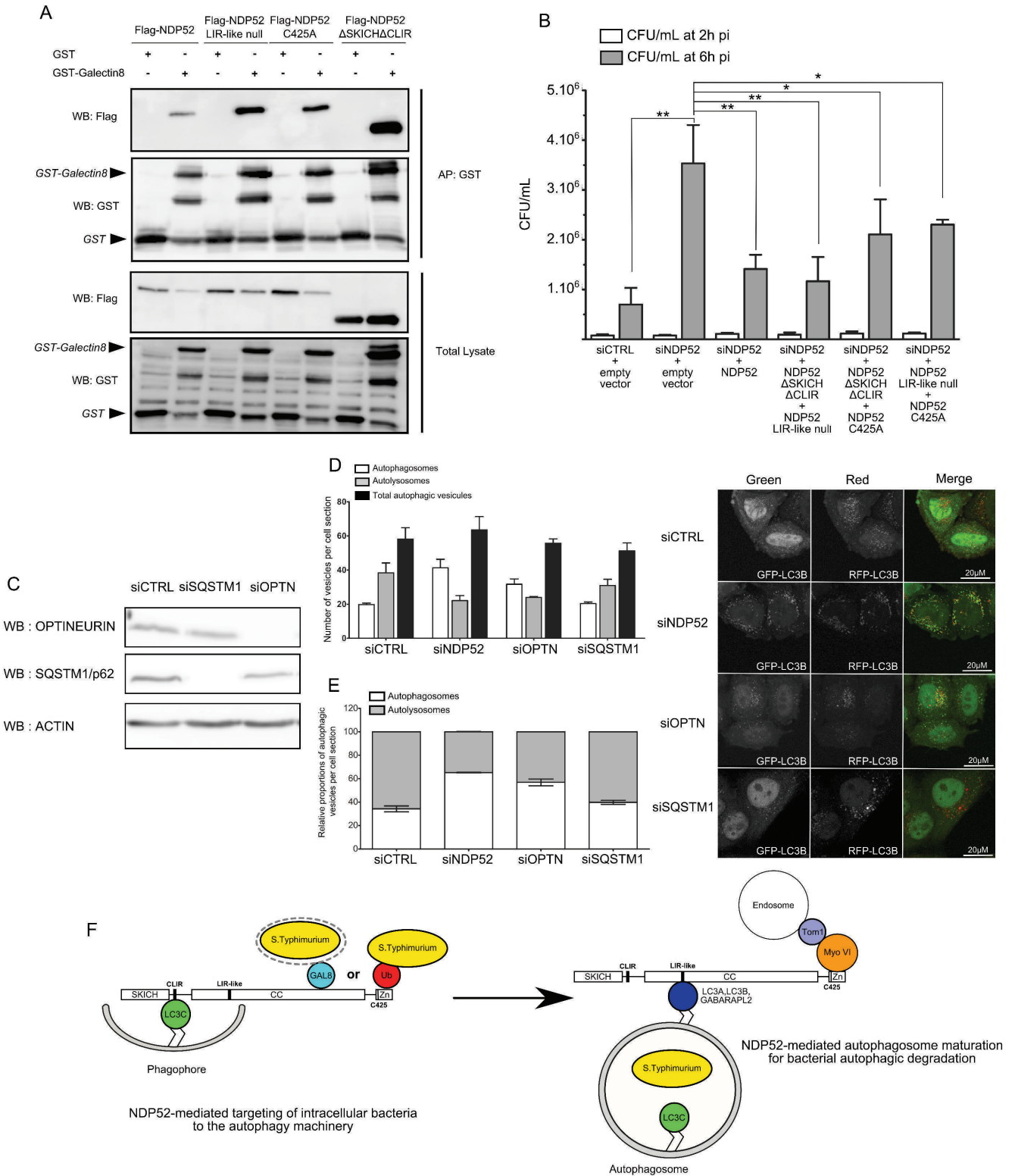




Figure S4





## 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  $\Delta$ SKICH $\Delta$ 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<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> dots) and autolysosomes (RFP<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup> 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup>GFP<sup>+</sup> dots) and autolysosomes (RFP<sup>+</sup>GFP<sup>-</sup> 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<sup>+</sup> 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 $\mu$ 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  $2.5 \times 10^5$  cells per well in 6 well-plates. Twenty-four hours later, cells were transfected with 1  $\mu$ g/well of plasmid encoding the GST-tagged genes and 1  $\mu$ 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 numerated.

### **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 $\mu$ L of this culture diluted in 180 $\mu$ 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'-

GGTGTTTCCTGGTACAGCT-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.

## **2.2 Rôle de RNF11 dans la maturation des autophagosomes (résultats supplémentaires, non publiés)**

Notre équipe et d'autres avons donc démontré que des récepteurs autophagiques assurent deux fonctions cruciales durant la xénophagie : le ciblage du pathogène mais aussi sa dégradation. Ces récepteurs/adaptateurs ou mSLRs sont pour l'instant au nombre de trois : NDP52, Optineurine et T6BP (Tumbarello et al., 2012, 2015; Verlhac et al., 2015). Dans le cas de NDP52, mon travail de thèse a montré que les partenaires moléculaires ainsi que les domaines de liaison impliqués ne sont pas les mêmes pour ces deux fonctions. Cependant, la proximité entre ces domaines suggère que tous les partenaires de NDP52 ne peuvent s'y lier simultanément. De plus, mes résultats semblent indiquer que dans le cas de NDP52 les affinités de liaison du CLIR et du pseudo-LIR diffèrent. Enfin, l'absence de l'une ou l'autre fonction de NDP52 profite grandement à *Salmonella* (Tumbarello et al., 2015; Verlhac et al., 2015). Il apparaît donc que ces fonctions, spatio-temporellement éloignées, devraient être coordonnées durant la xénophagie afin d'assurer une protection efficace à la cellule.

Nous avons donc supposé l'existence d'un mécanisme de régulation moléculaire des deux fonctions de ces récepteurs. Parmi les mécanismes de régulation possibles, il a été montré précédemment que les modifications post-traductionnelles des protéines peuvent moduler leurs affinités de liaison, ce qui pourrait favoriser ou inhiber une fonction par rapport à une autre. Pour identifier une ou des protéines pouvant être impliquées dans cette régulation nous avons criblé les bases de données d'interactions protéiques avec pour critères l'interaction avec les mSLRs NDP52, Optineurine et T6BP (les mSLRs étant acteurs de la maturation). Le deuxième critère retenu fut l'absence d'interaction avec SQSTM1 (un SLR ne participant pas à la maturation). Ainsi, nous avons identifié une protéine : RNF11 pour RING (Really Interesting New Gene) Finger protein 11 (Colland et al., 2004).

RNF11 est une protéine régulant l'activité d'E3-ubiquitine ligases comme ITCH ou SMURF2 (Li and Seth, 2004; Santonico et al., 2015). De plus, RNF11 est impliquée dans des fonctions cellulaires participant au contrôle de l'inflammation via A20 ou encore dans la régulation du trafic vésiculaire (Kostaras et al., 2013; Santonico et al., 2015; Shembade et al., 2009). Nous avons donc étudié l'implication potentielle de RNF11 dans l'autophagie et la xénophagie ainsi que ses interactions avec les récepteurs autophagiques. Le matériel et les méthodes utilisées sont détaillés en annexe de ce manuscrit.

### **2.2.1 Interaction de RNF11 avec des protéines de l'autophagie**

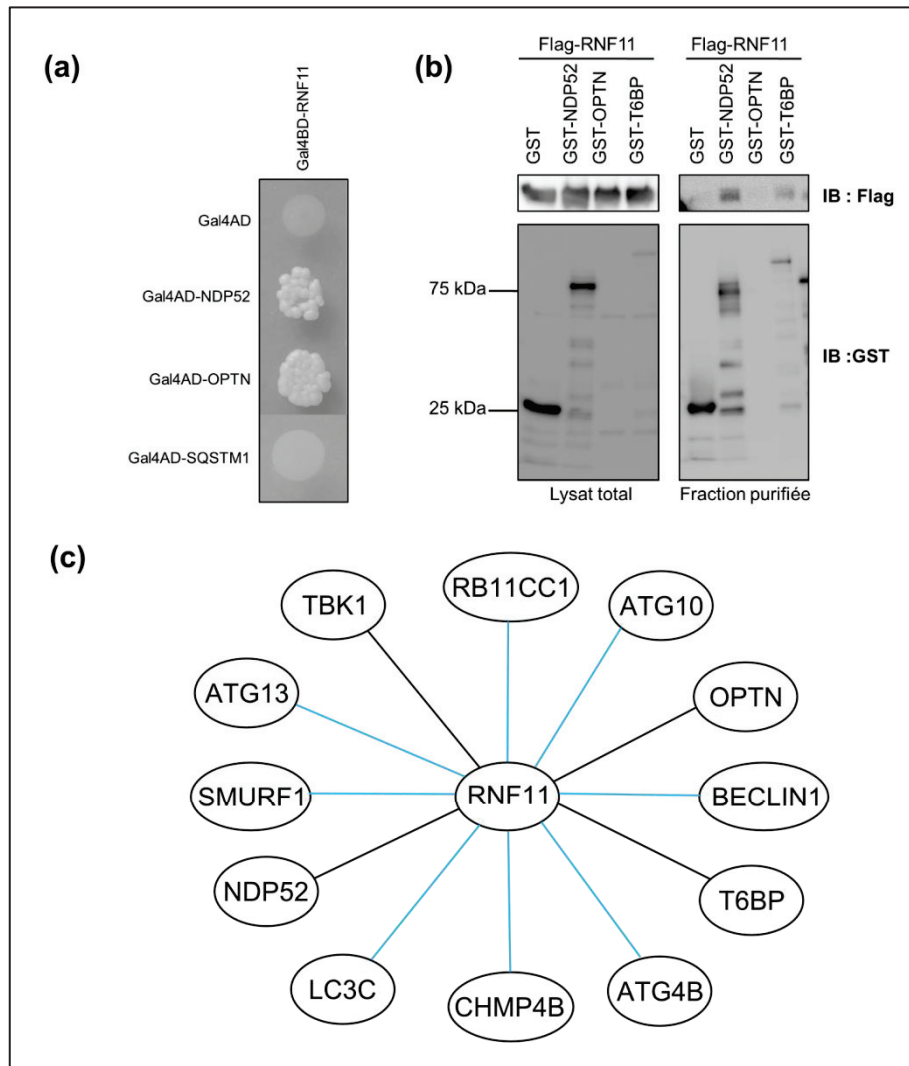
Nous avons tout d'abord confirmé les résultats précédents rapportant que RNF11 interagit avec NDP52, Optineurine et T6BP (Colland et al., 2004; Shembade et al., 2009). Les

interactions de RNF11 ont tout d'abord été testées en crible double hybride en levure contre NDP52, Optineurine et SQSTM1 (T6BP n'a à ce jour pas été testé avec cette approche). Nous avons ainsi confirmé par double hybride en levure que RNF11 interagit avec NDP52 et Optineurine mais pas avec SQSTM1 (Figure 14a). Afin de vérifier ces interactions en cellules mammifères, les interactions potentielles entre RNF11 et NDP52, Optineurine et T6BP ont été testées par purification par affinité sur sépharose. Les récepteurs portant une étiquette GST sont co-exprimés avec RNF11 portant une étiquette Flag, et les lysats cellulaires sont purifiés sur sépharose pour ne retenir que les protéines associées à la GST (Figure 14b). Ainsi nous copurifions RNF11 avec NDP52 et T6BP mais pas avec Optineurine, indiquant que RNF11 peut interagir avec NDP52 et T6BP. L'absence d'interaction avec Optineurine peut être expliquée par le faible taux d'expression du plasmide et cette interaction reste à vérifier.

Afin d'obtenir une image globale des interactions potentielles de RNF11 avec les protéines de l'autophagie, nous avons criblé la matrice des 55 protéines de l'autophagie disponible au laboratoire avec RNF11 comme appât en double hybride. Les 55 protéines associées à l'autophagie ont été sélectionnées sur la base de leur implication dans ce processus cellulaire : leur absence ou leur surexpression ont été rapportées dans la littérature pour moduler le niveau d'autophagie. Sont également incluses dans cette matrice des protéines décrites pour réguler l'autophagie lors d'infections, virales ou bactériennes. Ainsi nous montrons que RNF11 interagit aussi potentiellement avec 9 autres protéines de la matrice autophagique dont SMURF1 (Figure 14c), une E3-ubiquitine ligase impliquée dans l'autophagie sélective (Orvedahl et al., 2011).

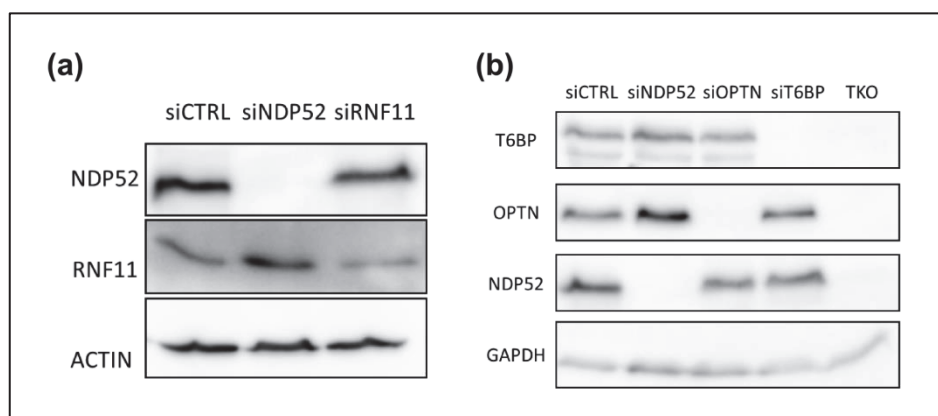
Ces résultats confirment ceux obtenus précédemment mais démontrent aussi que RNF11 peut potentiellement interagir avec au moins une E3-ubiquitine ligase impliquée dans l'autophagie sélective. Nous avons donc voulu déterminer si RNF11 pouvait avoir un rôle dans un modèle d'autophagie sélective, lors de l'infection par *Salmonella*.





**Figure 14 : Interactions de RNF11 avec les protéines de l'autophagie**

(a) Des levures sont co-transformées avec RNF11 lié au domaine de liaison (BD) du facteur de transcription Gal4 et avec domaine d'activation (AD) du facteur de transcription Gal4 seul ou lié aux récepteurs autophagiques. La sélection se fait sur milieu sans histidine, où la pousse des levures indique la reconstitution du facteur de transcription Gal4. (b) Des cellules 293T ont été transfectées avec des plasmides permettant l'expression des constructions indiquées. Après 48h les cellules ont été lysées et le lysat purifié sur sépharose. Les résultats sont analysés par western blot avec les anticorps indiqués. (c) Représentation des interactions identifiées pour RNF11. En bleu : interactions nouvellement identifiées en double hybride. En noir : interactions déjà décrites dans la littérature et confirmées ici. Les résultats sont représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes.



**Figure 15 : Validation des siRNAs**

(a, b) Des cellules HeLa ont été transfectées avec les siRNA indiqués puis lysées après 48h. L'efficacité d'extinction est vérifiée par western blot.

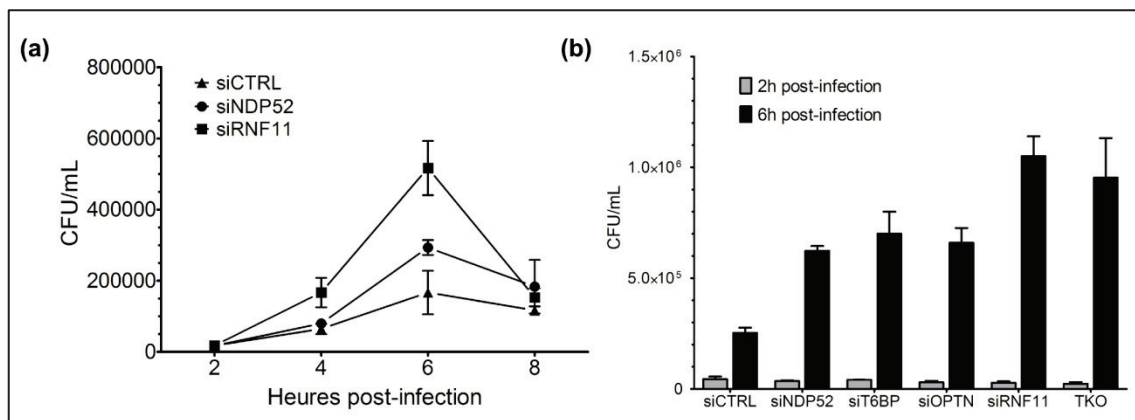
Les résultats présentés sont une expérience représentative d'au moins 3 expériences indépendantes. CTRL : contrôle, OPTN : Optineurine, TKO : siNDP52+siOPTN+siT6BP

### 2.2.2 RNF11 régule la prolifération de *Salmonella* Typhimurium

Nous avons ensuite évalué l'impact de l'absence de RNF11 sur le déroulement de la xénophagie durant l'infection de cellules HeLa par *Salmonella* Typhimurium. Après transfection par des ARN interférents (siRNA) spécifiques de RNF11 et de NDP52 comme contrôle (Figure 15a), les cellules ont été infectées par *Salmonella* Typhimurium et la prolifération bactérienne mesurée toutes les 2h par Colony Forming Unit (CFU) sur LB agar comme décrit précédemment (Verlhac et al., 2015). Comme attendu, l'absence de NDP52 augmente la prolifération de *Salmonella* au cours du temps (Figure 16a). De manière intéressante, l'absence de RNF11 favorise la prolifération bactérienne dès 4h post-infection et ce de manière plus importante que l'absence du seul récepteur NDP52 (environ 2 fois plus à 6h post-infection, Figure 16a).

Etant donné que RNF11 peut potentiellement interagir avec NDP52, Optineurine et T6BP, nous avons donc comparé l'effet de l'absence de RNF11 seul à l'absence concomitante des trois récepteurs NDP52, Optineurine et T6BP (TKO, Figure 15b) sur la prolifération de la bactérie entre 2h et 6h post-infection (Figure 16b). L'absence individuelle de ces récepteurs augmente la prolifération bactérienne d'environ 3 fois par rapport au siRNA contrôle, et ce comme montré précédemment (Tumbarello et al., 2015; Verlhac et al., 2015; Wild et al., 2011). Cependant l'absence simultanée de ces récepteurs ou l'absence de RNF11 augmentent toutes deux la prolifération bactérienne à des niveaux équivalents à 6 fois ceux du contrôle (Figure 16b). Il semblerait donc qu'enlever RNF11 ait une conséquence similaire sur la prolifération de la bactérie qu'enlever les 3 mSLRs. Une hypothèse attrayante expliquant ce résultat serait que RNF11 régule la fonction des mSLRs lors de la xénophagie. Néanmoins, l'augmentation de la prolifération de *Salmonella* en l'absence de RNF11 peut s'expliquer par

deux mécanismes ; soit la bactérie n'est pas adressée vers les autophagosomes soit ces derniers ne mûrent pas.

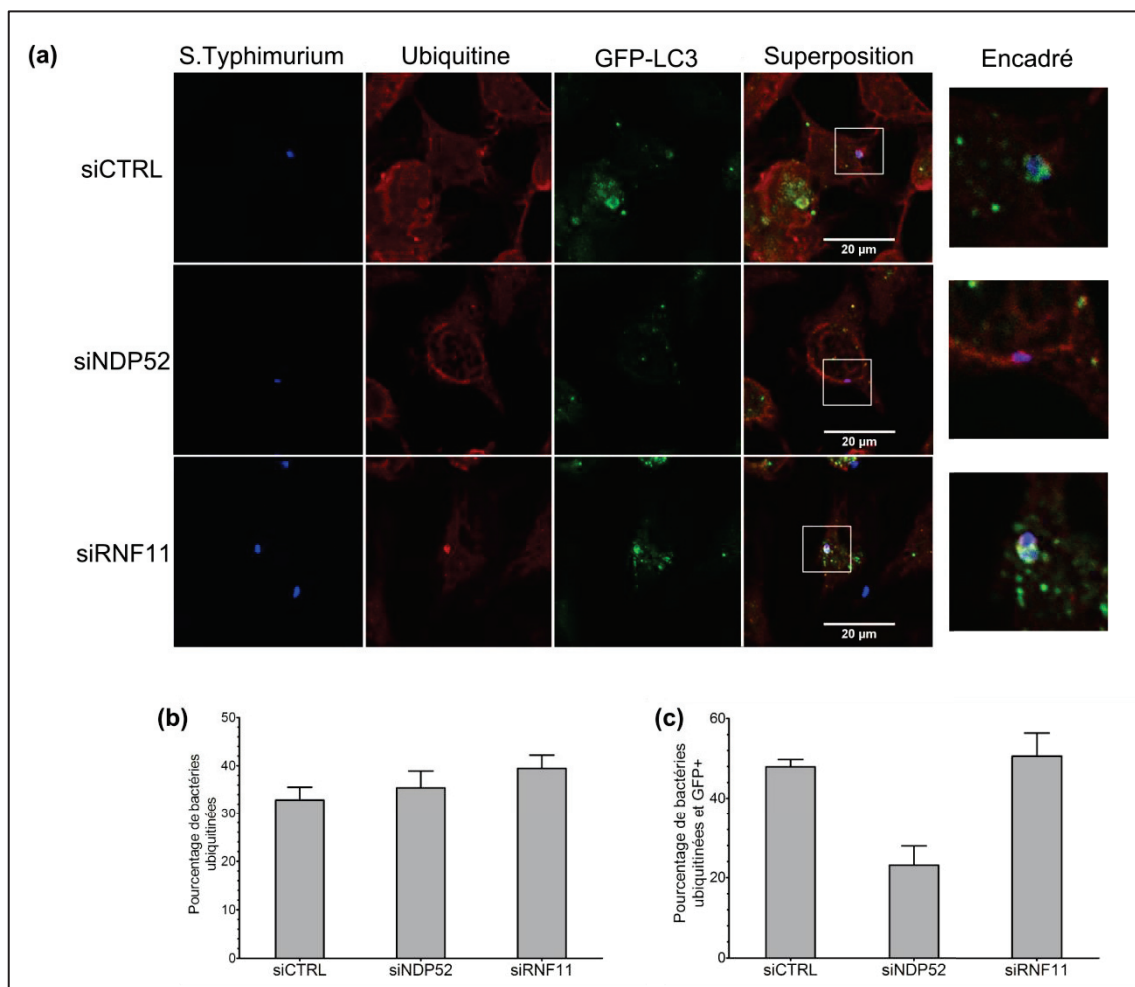


**Figure 16 : L'absence de RNF11 ou des mSLRs augmente la prolifération de *Salmonella***

(a, b) Des cellules HeLa ont été transfectées avec les siRNAs indiqués pendant 48h puis infectées par *Salmonella Typhimurium* et la prolifération bactérienne suivie par CFU. Les résultats sont la moyenne des triplicats d'une expérience représentative de deux expériences indépendantes  $\pm$  écart type. CTRL : contrôle, OPTN : Optineurine, TKO : siNDP52+siOPTN+siT6BP

### 2.2.3 L'absence de RNF11 ne module pas le ciblage de *Salmonella* vers l'autophagie

Nous avons donc évalué la localisation des bactéries ubiquitinées après 1h d'infection dans des cellules HeLa exprimant la GFP-LC3, après inhibition de l'expression de RNF11, ou de NDP52 comme contrôle de défaut d'adressage (Figure 17). LC3 étant la seule protéine restant conjuguée à la membrane interne de l'autophagosome, celle-ci nous permet de révéler la formation d'autophagosomes en microscopie confocale. Tout d'abord le niveau d'ubiquitination des bactéries semble être comparable dans toutes les conditions (environ 30-35% des bactéries totales). Cependant, en l'absence de NDP52 le taux de bactéries ubiquitinées co-localisant avec la GFP-LC3 est divisé par 2 par rapport au contrôle comme montré précédemment (Thurston et al., 2009; Verlhac et al., 2015). De manière intéressante, l'absence de RNF11 ne semble avoir aucun impact sur la co-localisation entre les bactéries ubiquitinées et les vésicules GFP-LC3 positives. Ce résultat suggère que RNF11 ne joue pas de rôle significatif dans la reconnaissance et le ciblage de *Salmonella* vers l'autophagie opérés par les SLRs (Figure 17). RNF11 semble néanmoins prépondérant pour le contrôle de la prolifération des bactéries (Figure 16a). Il semblerait donc que RNF11 puisse participer à la maturation des autophagosomes et ce possiblement via un contrôle des mSLRs NDP52, Optineurine et T6BP. Nous avons donc cherché à déterminer si RNF11 contribue en effet à la régulation de la maturation des autophagosomes.

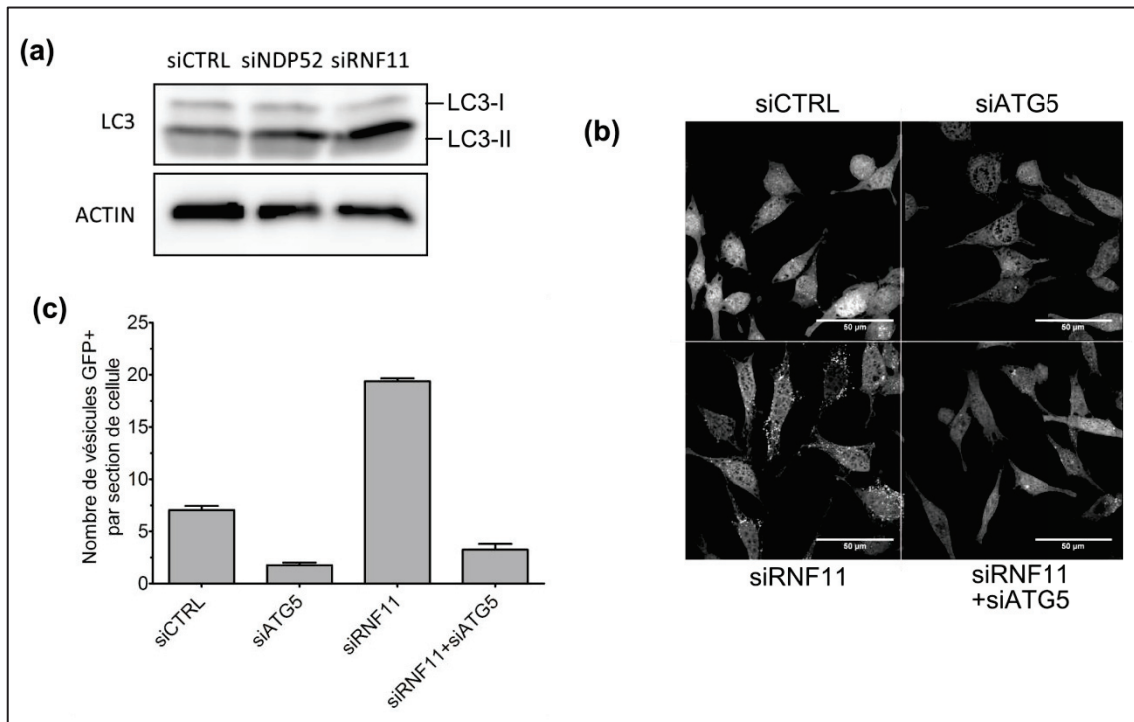


**Figure 17 : L'absence de RNF11 ne module pas le ciblage de *Salmonella* vers l'autophagie**  
 (a, b, c) Des cellules HeLa ont été transfectées avec les siRNAs indiqués pendant 48h puis infectées par *Salmonella Typhimurium* et fixées 1h après. Les bactéries et l'ubiquitine sont révélées par immunofluorescence avec un anticorps anti-LPS et FK2, respectivement. (b) Le pourcentage de bactéries ubiquitinées parmi les bactéries totales a été déterminé avec ImageJ pour chaque condition. (c) Le pourcentage de bactéries positives pour la GFP-LC3 parmi les bactéries ubiquitinées a été déterminé avec ImageJ pour chaque condition. (b, c) Les résultats sont la moyenne des triplicats d'une expérience  $\pm$  écart type. CTRL : contrôle.  
 Barre d'échelle : 20 $\mu$ m.

#### 2.2.4 L'absence de RNF11 régule négativement la maturation des autophagosomes

Nous avons évalué l'effet de l'absence de RNF11 sur l'autophagie dans des cellules non infectées en mesurant la conversion de LC3 par western blot. Cette méthode permet de séparer la forme cytosolique de LC3 nommée LC3-I de sa forme lipidée LC3-II. Une augmentation de LC3-II reflète ainsi une augmentation du nombre d'autophagosomes. Nous avons observé que la lipidation de LC3 est augmentée en l'absence de RNF11, tout comme en l'absence de NDP52, ce qui suggère que RNF11 module l'autophagie basale (Figure 18a). Afin de vérifier que ces vésicules sont bien des autophagosomes issus de l'autophagie canonique nous avons suivi la formation de vésicules positives pour GFP-LC3 après co-transfection de

siRNAs ciblant ATG5 et RNF11 (Figure 18b, c). En l'absence de RNF11 nous observons une accumulation de vésicules GFP-LC3 que nous n'observons plus en l'absence simultanée de RNF11 et d'ATG5 (Figure 18b, c). L'absence de RNF11 provoque donc une augmentation du nombre d'autophagosomes via un processus nécessitant ATG5.

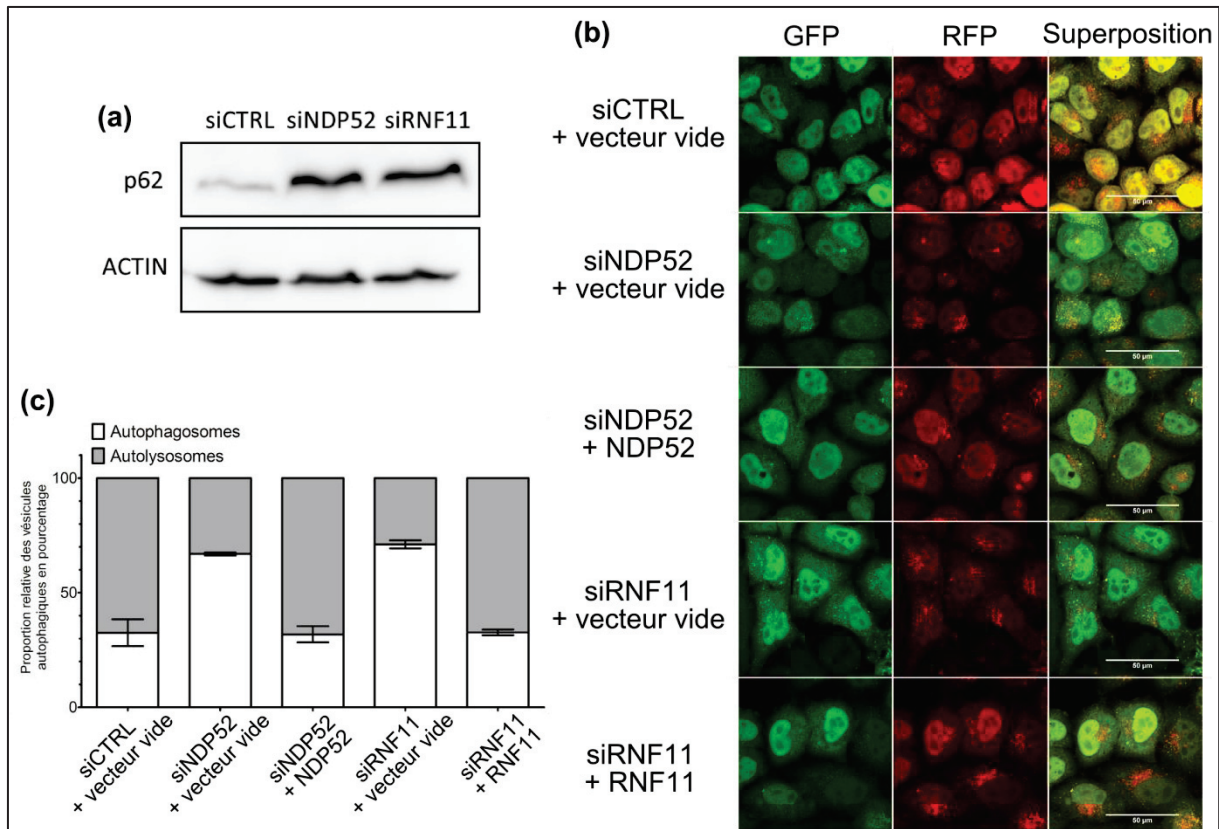


**Figure 18 : L'absence de RNF11 module l'autophagie basale**

(a) Des cellules HeLa ont été transfectées avec les siRNAs indiqués et lysées après 48h puis analysées par western blot avec les anticorps indiqués. Les images sont représentatives de 4 expériences indépendantes. (b, c) Des cellules HeLa GFP-LC3 ont été transfectées avec les siRNAs indiqués et fixées après 48h pour analyse par microscopie confocale. (c) Le nombre d'autophagosomes a été déterminé sur au moins 100 cellules par condition. Les résultats sont la moyenne d'une expérience en duplicat représentative de deux expériences indépendantes  $\pm$  écart type. Barre d'échelle 50  $\mu$ m

Afin d'établir si cette augmentation est due à une augmentation du flux ou à un blocage de la maturation, nous avons mesuré le niveau d'expression de SQSTM1 en l'absence de RNF11, avec NDP52 comme contrôle interne. SQSTM1 est une protéine à longue durée de vie majoritairement dégradée par l'autophagie. L'accumulation de SQSTM1 est ainsi grandement liée à un défaut du flux autophagique (Klionsky et al., 2016). Comme montré précédemment l'absence de NDP52 entraîne l'accumulation de SQSTM1 (Figure 19a et Verlhac et al., 2015). En l'absence de RNF11 nous avons aussi mesuré une accumulation de SQSTM1 ce qui suggère un blocage de sa dégradation et donc un blocage de la maturation autophagique (Figure 19a). Afin de confirmer ces résultats, nous avons utilisé des HeLa exprimant le tandem RFP-GFP-LC3 qui permet la distinction entre autophagosomes (GFP et RFP positifs) et autolysosomes (RFP positifs mais GFP négatifs, la GFP étant sensible au pH

acide) en microscopie confocale (Klionsky et al., 2016). De manière intéressante, l'absence de RNF11 comme celle de NDP52 entraîne l'accumulation d'autophagosomes non acides et cet effet peut être compensé par l'expression *de novo* de RNF11 (Figure 19b, c). Nous avons donc montré jusqu'ici que RNF11 semble réguler la maturation des autophagosomes durant la xénophagie et l'autophagie basale et ce potentiellement en amont des SLRs impliqués dans la maturation. Dès lors, nous nous sommes attachés à identifier quel(s) mécanisme(s) moléculaire(s) opère(nt) cette régulation.



**Figure 19 : L'absence de RNF11 régule négativement la maturation des autophagosomes**  
 (a) Des cellules HeLa ont été transfectées avec les siRNAs indiqués et lysées après 48h pour un western blot avec les anticorps indiqués. Les images sont représentatives de 4 expériences indépendantes (b,c) Des cellules HeLa mRFP-GFP-LC3 ont été transfectées avec les siRNAs indiqués et fixées après 48h pour analyse par microscopie confocale. (c) La proportion de chaque type de vésicules autophagiques a été déterminée sur 100 cellules par condition. Les résultats sont la moyenne d'une expérience en duplicat représentative de deux expériences indépendantes  $\pm$  écart type.  
 Barre d'échelle 50  $\mu$ m

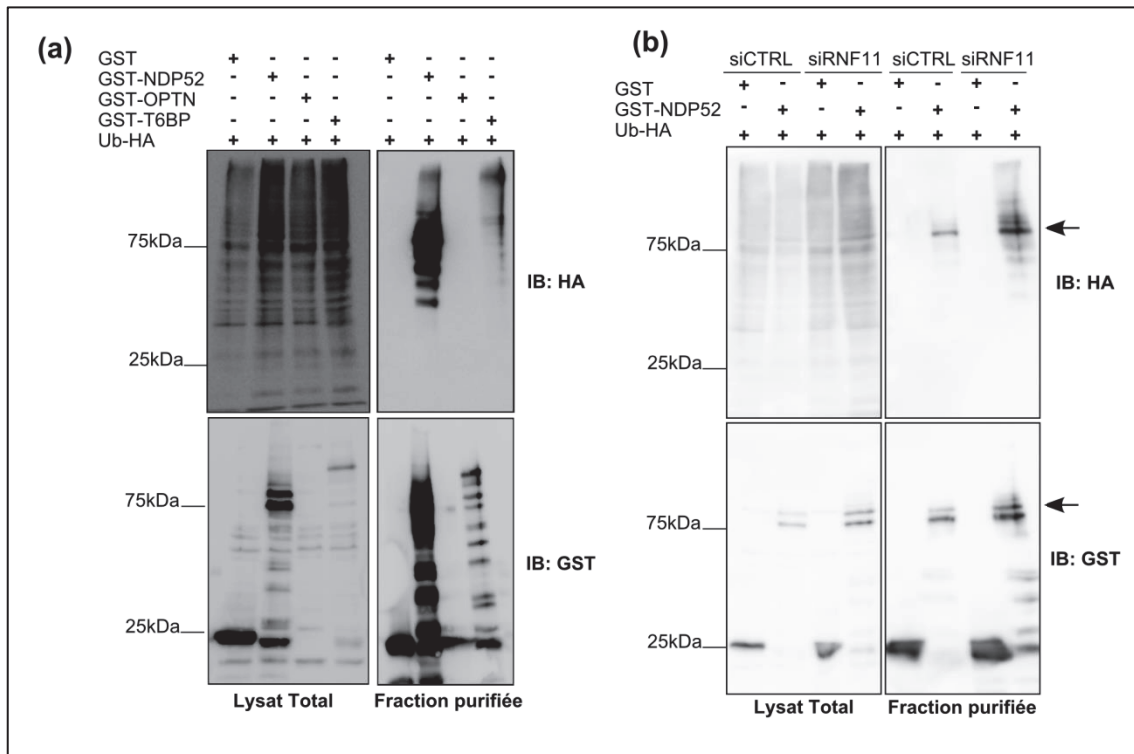
### 2.2.5 L'absence de RNF11 module l'ubiquitination de NDP52

RNF11 est décrite pour réguler de l'activité de plusieurs E3-ubiquitine ligases impliquées dans le trafic vésiculaire ou la régulation de l'inflammation (Li and Seth, 2004; Santonico et al., 2015). Nous nous sommes donc demandé si RNF11 pourrait fonctionner sur un modèle similaire durant la maturation des autophagosomes. Nous avons donc d'abord

vérifié si les mSLRs impliqués dans la maturation peuvent être ubiquitinés. A cette fin, des cellules 293T ont donc été co-transfectées avec les SLRs portant une étiquette GST ou la GST seule et un plasmide permettant l'expression de l'ubiquitine avec une étiquette HA. Après purification sur sépharose, la présence de l'ubiquitine a été révélée par western blot. Dans le cas de la GST seule, aucun signal correspondant à l'ubiquitine n'a été détecté (Figure 20a). Dans le cas de NDP52 et T6BP l'ubiquitine est co-purifiée avec les récepteurs (Figure 20a). Optineurine n'étant que très peu exprimé, nous ne pouvons conclure sur son ubiquitination (Figure 20a). Cependant il a déjà été montré par spectrométrie de masse que certains résidus d'Optineurine sont ubiquitinés (Kim et al., 2011b). Concernant NDP52, nous avons vérifié par spectrométrie de masse son ubiquitination et avons identifié 9 lysines ubiquitinées sur NDP52 (données non montrées).

Ces résultats suggèrent donc que les SLRs impliqués dans la maturation sont potentiellement ubiquitinables. Etant donné que nous avons détaillé le mécanisme moléculaire impliquant NDP52 dans la maturation, nous nous sommes concentrés sur ce récepteur afin de déterminer le mécanisme éventuel liant RNF11, NDP52 et maturation (Verlhac et al., 2015). Nous avons voulu tester si cette ubiquitination est dépendante de RNF11. Pour cela nous avons réalisé la même expérience que précédemment sur NDP52 en présence de siRNA contre RNF11. En l'absence de RNF11, nous observons une ubiquitination plus importante de NDP52, avec un ratio favorisant la forme ubiquitinée de NDP52 à la non-ubiquitinée (Figure 20b). Ces résultats suggèrent que RNF11 régulerait négativement l'ubiquitination de NDP52. Il est à noter que l'absence de RNF11 ne modifie pas le niveau d'expression de NDP52 endogène (Figure 15a) ; il semblerait donc que cette ubiquitination accrue n'entraîne pas une augmentation de la dégradation de NDP52, ni sa stabilisation.

Ainsi, ces résultats préliminaires nous amène à supposer l'existence d'un mécanisme dépendant de RNF11 permettant de réguler l'ubiquitination des SLRs et ainsi de favoriser leur rôle dans la maturation.



**Figure 20 : L'absence de RNF11 module l'ubiquitination de NDP52**

(a) Des cellules 293T ont été transfectées avec des plasmides permettant l'expression des constructions indiquées. Après 48h les cellules ont été lysées et les lysats purifiés sur sépharose. (b) Des cellules 293T ont été transfectées avec un siRNA contrôle ou spécifique de RNF11 puis transfectées avec des plasmides permettant l'expression des constructions indiquées. Après 48h les cellules ont été lysées et le lysat purifié sur sépharose.

Les résultats sont analysés par western blot avec les anticorps indiqués et représentatifs d'au moins trois expériences indépendantes. Les flèches notent la position de la bande correspondant à la forme ubiquitinée de NDP52.





## **Chapitre 3 Discussion**



### 3.1 Les récepteurs autophagiques, quels rôles durant l'autophagie ?

Mes travaux de thèse ont permis de démontrer qu'un récepteur autophagique, NDP52, participe à la maturation des autophagosomes en les liant aux endosomes. En effet, NDP52 interagit avec les LC3s côté autophagosomal et avec la Myosine VI côté endosomal. De manière intéressante, ce rôle de NDP52 est crucial non seulement pour la dégradation des bactéries capturées lors de la xénophagie mais aussi pour le bon déroulement du flux autophagique dans des cellules non infectées. De plus, ce rôle semble pouvoir être étendu à deux autres membres de la famille des SLRs qui interagissent eux aussi avec la Myosine VI, Optineurine et T6BP. Ainsi au moins trois SLRs, NDP52, Optineurine et T6BP, partagent deux fonctions : le ciblage de substrats vers l'autophagie et la maturation des autophagosomes. Pour plus de clarté, nous désignerons mSLRs (m pour maturation) cette sous famille des SLRs impliquée dans la maturation des autophagosomes. Enfin, bien que les SLRs aient des fonctions similaires durant le ciblage de *Salmonella*, il semblerait que ces fonctions ne soient pas redondantes.

En effet, SQSTM1 et NDP52 sont recrutés sur des domaines distincts d'une même bactérie lors de la xénophagie dirigée contre *Salmonella* (Cemma et al., 2011). Ceci peut s'expliquer par le fait que NDP52 peut reconnaître la galectine 8 en plus de l'ubiquitine sur la bactérie, alors que le seul signal reconnu par SQSTM1 sur la bactérie est l'ubiquitine (Thurston et al., 2012; Zheng et al., 2009). Cependant, la conjugaison de l'ubiquitine permet la construction de chaînes variées dont les structures et fonctions diffèrent (pour une revue détaillée, voir Dikic et al., 2009). Les ou les substrats bactériens ubiquitinés durant l'infection sont encore mal connus ; il est alors possible d'imaginer que plusieurs types de chaînes d'ubiquitine soient construits à la surface de la bactérie sur différents substrats. Ceci créerait des micro-domaines à la surface de la bactérie offrant une variété de ligands pour les récepteurs autophagiques. De plus, les domaines de reconnaissance de l'ubiquitine diffèrent sensiblement entre ces SLRs : NDP52 possède un domaine organisé en zinc finger alors que l'UBA de SQSTM1 est organisé en hélices alpha (Ciani et al., 2003; Xie et al., 2015). Il est donc envisageable que SQSTM1 et NDP52 ne reconnaissent pas les mêmes chaînes d'ubiquitine et donc ne s'associent pas aux mêmes micro-domaines bactériens. Ainsi, la multiplication des chaînes d'ubiquitine et des récepteurs les reconnaissant pourrait offrir un répertoire de signaux d'adressage vers l'autophagie varié. Cette variété serait cruciale pour lutter contre des pathogènes capables de modifier les voies d'ubiquitination cellulaire comme *Salmonella* (Fiskin et al., 2016).

Si les récepteurs autophagiques ne sont pas redondants mais complémentaires durant le ciblage des bactéries, il se peut qu'il en soit de même de leurs rôles durant la maturation des autophagosomes. On peut donc se demander quels sont les rôles particuliers de ces récepteurs

durant la maturation autophagique. En effet, l'absence individuelle de NDP52, Optineurine ou T6BP suffit à bloquer le flux autophagique (Tumbarello et al., 2015; Verlhac et al., 2015). Ces résultats suggèrent que ces mSLRs ne peuvent se substituer l'un à l'autre et exerceraient donc des fonctions non redondantes. De plus, des données de l'équipe suggèrent que les récepteurs autophagiques ont aussi des fonctions différentielles durant l'infection par le virus de la rougeole. Ce virus induit et utilise un flux complet d'autophagie pour favoriser sa réplication (Grégoire et al., 2011; Richetta et al., 2013). De manière intéressante, l'absence de NDP52 ou T6BP réduit la réplication du virus (Petkova, 2015). De plus, l'absence simultanée des deux récepteurs inhibe synergiquement la réplication du virus (Petkova, 2015). Cet impact des récepteurs NDP52 et T6BP sur la réplication virale est dépendant de leur régulation de la maturation des autophagosomes (Petkova, 2015). Enfin, plusieurs protéines virales interagissent avec NDP52 et T6BP (Petkova, 2015). Ensemble, des résultats suggèrent que ces deux récepteurs agissent indépendamment au moins dans le cas de l'infection par le virus de la rougeole. Etant donné que ce virus a besoin de la maturation pour se répliquer, il se peut qu'il détourne de manière différentielle les autophagosomes via ces deux récepteurs (Richetta et al., 2013). Ainsi, ceci suggérerait que tous les autophagosomes ne mûrissent pas selon les mêmes voies moléculaires, c'est-à-dire en n'utilisant pas le ou les mêmes récepteurs. La distinction pourrait venir soit de la nature du substrat à dégrader soit du lieu de formation du phagophore qui pourrait induire une composition lipidique et protéique particulière favorisant l'utilisation de l'un ou l'autre des récepteurs autophagiques pour compléter la maturation de l'autophagosome.

Enfin, il reste encore de nombreuses inconnues sur comment les substrats sont ciblés vers l'autophagie. Certaines données suggèrent qu'un phagophore est formé *de novo* autour du substrat ciblé et là encore les SLRs joueraient un rôle central. En effet, il a été montré que sans la liaison NDP52-LC3C, il n'y a pas de recrutement des autres LC3s autour de la bactérie. Ceci suggère un rôle pour NDP52 dans la formation de l'autophagosome autour de la bactérie (von Muhlinen et al., 2012). Par ailleurs, durant la mitophagie il semblerait que les récepteurs NDP52 et Optineurine soient nécessaires pour le recrutement d'ULK1 et de DFCP1 sur les mitochondries à éliminer (Lazarou et al., 2015). Ces deux protéines fonctionnent en amont des LC3s et sont nécessaires à la biogénèse des autophagosomes. De plus, l'absence simultanée des trois récepteurs impliqués dans la maturation, NDP52, Optineurine et T6BP, au-delà de provoquer un blocage de la maturation, semble aussi être associée à un défaut de la biogénèse des autophagosomes dans des cellules non infectées (Tumbarello et al., 2012). Ces observations semblent arguer en faveur d'un rôle des récepteurs dans la formation *de novo* d'un phagophore autour du substrat. Cependant, ce ou ces rôles restent encore à définir.

Ainsi, si mes travaux de thèse ont permis de révéler une fonction des récepteurs autophagiques durant la maturation des autophagosomes, il se peut que d'autres fonctions

soient découvertes notamment dans les étapes précoces de formation de l'autophagosome autour du substrat.

### 3.2 Un récepteur à deux fonctions : quelles régulations ?

Il apparaît donc que certains SLRs assurent au moins deux fonctions durant l'autophagie sélective contre *Salmonella Typhimurium*. Ainsi, NDP52, Optineurine et T6BP peuvent non seulement reconnaître la bactérie et l'amener vers l'autophagie mais aussi assurer sa dégradation en promouvant la maturation de l'autophagosome la contenant. Dans le cas de NDP52, mes travaux ont montré que les domaines et partenaires moléculaires impliqués dans ces deux processus sont distincts (Verlhac et al., 2015). Cependant, la proximité du domaine de reconnaissance de l'ubiquitine et de la Myosine VI sur NDP52 nous amène à supposer que ces interactions sont mutuellement exclusives. De même, ces deux fonctions, ciblage et maturation autophagique, sont temporellement et spatialement éloignées. Ainsi il semble peu probable que la même molécule de NDP52 puisse assurer ces deux fonctions. Nous avons alors supposé que l'implication des mSLRs dans le ciblage et la maturation autophagique soit optimisée par des modifications post-traductionnelles des mSLRs.

En effet, il a déjà été montré que les SLRs subissent des modifications post-traductionnelles qui optimisent leur fonctionnement. Ainsi, les SLRs SQSTM1, Optineurine, NDP52 et T6BP sont tous phosphorylables par la kinase TBK1 (Richter et al., 2016). Dans le cas d'Optineurine, son interaction avec TBK1 est cruciale pour le bon déroulement de la mitophagie. En effet, la phosphorylation d'Optineurine par TBK1 sur ses domaines LIR et UBAN permet d'augmenter l'affinité de liaison d'Optineurine non seulement avec LC3 mais aussi avec les chaînes d'ubiquitine présentes sur la mitochondrie (Richter et al., 2016). Un mécanisme semblable avait déjà été décrit durant la xénophagie contre *Salmonella* reconnue également par Optineurine (Wild et al., 2011). Concernant les autres SLRs phosphorylés par TBK1, il n'y a pour l'instant que des données concernant les domaines ciblés : les domaines UBA et LIR de SQSTM1, les domaines SKICH de T6BP et NDP52 (proches de leurs domaines LIR et CLIR respectifs). Les effets de ces phosphorylations sur l'activité de ces SLRs restent encore inconnus, cependant nous pouvons supposer un mode d'action semblable à celui décrit pour Optineurine à savoir une optimisation de la liaison autophagosome-récepteur-substrat favorisant la séquestration de ce dernier.

Par analogie avec ce mécanisme, nous avons exploré la possibilité qu'une modification post-traductionnelle participe à l'optimisation du rôle de NDP52, Optineurine et T6BP dans la maturation des autophagosomes. Ainsi, nous avons identifié l'ubiquitination de NDP52 comme mécanisme pouvant participer à la maturation des autophagosomes. Cette ubiquitination est possiblement régulée par RNF11 (voir paragraphe 2.2), une protéine RING Finger régulant l'activité d'E3-ubiquitine ligase impliquées dans le contrôle de l'inflammation

et le trafic vésiculaire (Kostaras et al., 2013; Li and Seth, 2004; Santonico et al., 2015; Shembade et al., 2009). En effet, nos résultats montrent qu'en absence de RNF11, le niveau d'ubiquitination de NDP52 augmente et que cela corrèle avec un blocage de la maturation des autophagosomes. Ces résultats sont en accord avec des données existantes sur le mode d'action de RNF11 ; celle-ci inhibe l'activité de l'E3-ubiquitine ligase ITCH ce qui entraîne une diminution de l'ubiquitination des substrats de cette enzyme (Santonico et al., 2015). Nous pouvons donc supposer que durant la maturation RNF11 inhiberait l'activité ubiquitine ligase d'une E3 encore non identifiée. Ceci diminuerait l'ubiquitination de NDP52 et permettrait la maturation autophagique. De plus, une étude très récente montre que la Myosine VI peut lier des chaînes d'ubiquitine sur les récepteurs autophagiques et que cette liaison stabilise grandement l'interaction récepteur-Myosine VI (He et al., 2016). Ainsi, une régulation de la maturation par l'ubiquitination des récepteurs autophagiques est une hypothèse particulièrement attractive que nous discuterons plus loin.

Ainsi les données de mon travail confrontées à celles de la littérature indiquent que les activités des récepteurs autophagiques puissent être régulées par des modifications post-traductionnelles. La phosphorylation par TBK1 optimise la liaison des récepteurs autophagiques à leurs substrats et l'ubiquitination par RNF11 participerait à la maturation des autophagosomes. Il est intéressant de noter il n'y a qu'un régulateur en amont des SLRs pour leur phosphorylation. A ce jour, nos données semblent indiquer qu'il pourrait en être de même pour l'ubiquitination avec RNF11 en amont des mSLRs NDP52, Optineurine et T6BP. Néanmoins, il se peut que chaque SLR soit individuellement ubiquitiné par une E3-ubiquitine ligase spécifique.

### **3.3 A quelle étape de la maturation interviennent les récepteurs autophagiques ?**

Une question cruciale qui reste encore au moins partiellement en suspens est l'identification de l'étape de la maturation autophagique durant laquelle interviennent les mSLRs NDP52, Optineurine et T6BP. La maturation d'un autophagosome peut être organisée en 3 étapes ; mouvement et rencontre des vésicules, attache et rapprochement des membranes et enfin remodelage et fusion membranaire.

Pour ce qui est du transport des endosomes, il semble assuré par la Myosine VI (Tumbarello et al., 2012). En effet, les récepteurs autophagiques sont eux localisés au niveau des autophagosomes (Tumbarello et al., 2012; Verlhac et al., 2015). De plus, la co-localisation entre la Myosine VI et les mSLRs ne semble se faire qu'au niveau des autophagosomes (Tumbarello et al., 2012). La fonction des mSLRs NDP52, Optineurine et T6BP pourrait donc plutôt s'exercer du côté autophagosomal même si une présence côté endosomal n'est pas à exclure.

Etant donné l'absence de domaines permettant l'ancrage membranaire chez ces SLRs, il est peu probable qu'ils aient un rôle direct dans le remodelage et la fusion membranaire.

Il reste donc le rapprochement et l'attache des membranes à fusionner, un rôle qui pourrait correspondre aux SLRs qui sont des plateformes d'interactions protéiques ancrant des macro-complexes ensemble. En effet, les vésicules étant en mouvement dans le cytoplasme, il est probable que leur arrêt ou leur ralentissement soit nécessaire afin que les membranes des vésicules soient en contact et fusionnent. Les SLRs présents sur l'autophagosome via LC3 pourraient remplir ce rôle en se liant à la Myosine VI localisée elle sur l'endosome ; ceci pourrait stabiliser spatialement les deux vésicules et ainsi optimiser leur fusion.

De plus la question de savoir où et quand interviennent précisément les récepteurs autophagiques durant la maturation s'inscrit dans une question plus vaste : comment se déroule la maturation ? En effet, la maturation est un processus complexe hautement régulé afin d'optimiser la dégradation de substrats potentiellement délétères. Il serait alors intéressant d'étudier l'implication des mSLRs dans la maturation des autophagosomes vis-à-vis des autres protéines déjà identifiées comme LC3. Mes travaux de thèse suggèrent que la liaison entre NDP52 et LC3 via le domaine pseudo-LIR est cruciale pour la maturation (Verlhac et al., 2015), indiquant que LC3 est nécessaire pour la fonction des SLRs dans la maturation. Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle les mSLRs interviennent avant la fusion puisque celle-ci requiert l'absence de LC3 sur la membrane externe de l'autophagosome (Yu et al., 2012).

Cependant, une fois l'autophagosome fermé ATG4 déconjugue rapidement toutes les protéines sur la face externe de l'autophagosome mature ce qui permet la fusion avec les vésicules endo-lysosomales (Yu et al., 2012). Comment alors est-il possible d'utiliser LC3 et les récepteurs comme point d'ancrage pour la maturation ? Deux hypothèses peuvent répondre à cette question. Soit l'ancrage des endosomes se fait durant l'élongation du phagophore, donc avant sa fermeture : la déconjugaison déclencherait alors la maturation. Cette hypothèse est soutenue par l'observation en microscopie électronique de phagophores en contact direct avec des endosomes ou des lysosomes (Biazik et al., 2015). Cependant, un tel mécanisme laisserait possible la fusion entre une structure autophagosomale immature et une vésicule endo-lysosomale. Un évènement trop précoce comme celui-ci serait contre-productif pour la cellule puisqu'il ne permettrait pas la dégradation des substrats de l'autophagie. La deuxième hypothèse est que la fermeture de l'autophagosome laisserait une « cicatrice » de LC3 au site de fission sur la membrane, ce qui permettrait alors l'ancrage très localisé des mSLRs. Cette possibilité est appuyée par le fait que la lipidation de LC3 se fait majoritairement sur les domaines hautement courbés du phagophore, c'est-à-dire aux extrémités (Nath et al., 2014). Si la conjugaison de LC3 à majoritairement lieu aux extrémités, il est possible que cela laisse



une « cicatrice » de LC3 sur l'autophagosome après la fission de ses extrémités. Cette « cicatrice » de LC3 pourrait suffire aux mSLRs pour se lier à l'autophagosome et ainsi favoriser l'ancrage des vésicules endo-lysosomales.

Enfin, nos résultats et ceux d'autres équipes ont décrit le rôle de la Myosine VI et des mSLRs dans la fusion entre autophagosomes et endosomes. En effet, il a été montré que la Myosine VI permet le recrutement des endosomes pour la maturation via Tom1 (Tumbarello et al., 2012). Cependant, la place des lysosomes dans ce processus reste à être clarifiée. Il est généralement supposé que la formation d'amphisomes résultant de la fusion autophagosomes-endosomes est une étape facultative de la maturation des autophagosomes. Cependant, la mutation du domaine de liaison de la Myosine VI avec Tom1 bloque la maturation des autophagosomes (Tumbarello et al., 2012). Comme nous l'avons montré, les domaines de liaison de NDP52 avec la Myosine VI ou les LC3s sont également nécessaires à la maturation des autophagosomes (Verlhac et al., 2015). Deux hypothèses peuvent rendre compte de ces observations : soit la fusion de l'autophagosome avec un endosome est un prérequis indispensable pour la fusion avec un lysosome (à minima dans les lignées étudiées), soit la fusion avec un lysosome dépend aussi de la Myosine VI et/ou de NDP52. Il serait intéressant d'étudier ces hypothèses afin de mieux comprendre le déroulement du flux autophagique.

En conclusion, la maturation des autophagosomes reste encore un processus mal décrit. Cependant mes travaux apportent une compréhension moléculaire du rôle nouveau de NDP52 dans cette étape. De plus, d'autres SLRs participent eux-aussi à la maturation autophagique, ouvrant des perspectives de travail intéressantes concernant leurs fonctions durant l'autophagie.

## **Chapitre 4 Perspectives et Conclusion**



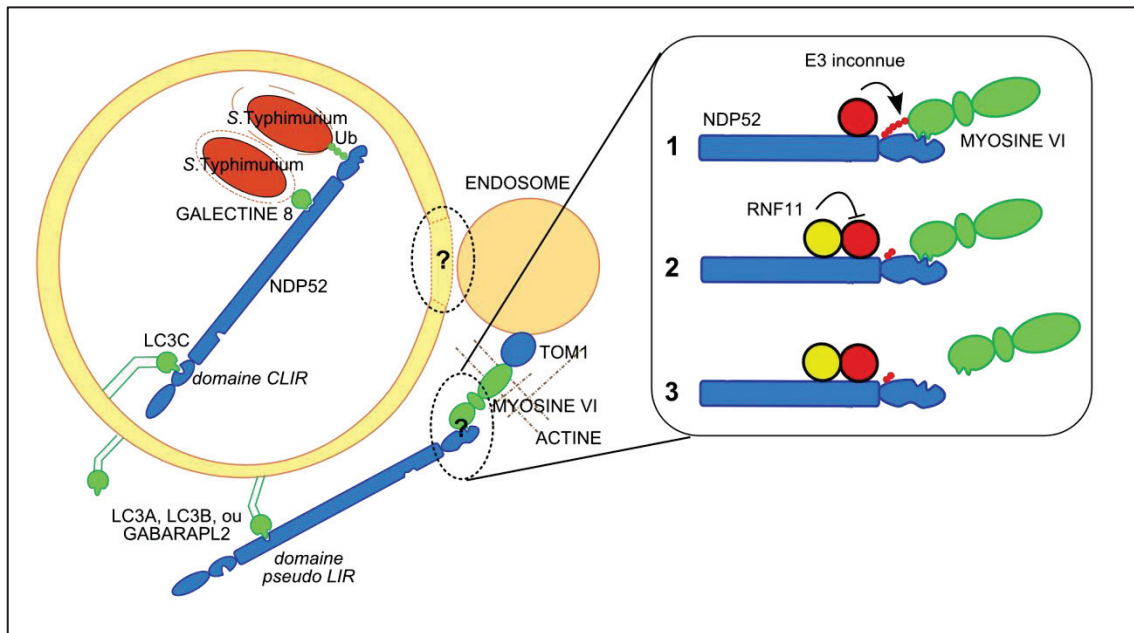
## 4.1 L'implication des SLRs dans la maturation autophagique

Les mSLRs NDP52, Optineurine et T6BP participent donc au ciblage de substrats vers l'autophagie mais aussi à la maturation des autophagosomes. Ces deux fonctions sont cruciales pour le bon déroulement de l'autophagie sélective et il serait donc intéressant de mieux les caractériser au niveau moléculaire. Il est aussi capital d'identifier les éventuels mécanismes de régulation de ces fonctions, notamment pour la maturation où très peu de données sont disponibles.

Une perspective de travail intéressante concernant le rôle des récepteurs autophagiques dans la maturation des autophagosomes serait de pouvoir les placer dans le flux autophagique par rapport à d'autres régulateurs moléculaires connus de la maturation autophagique. Ceci permettrait de mieux caractériser le ou les rôles exacts des mSLRs dans la maturation des autophagosomes. En effet, nous avons discuté la possibilité que les mSLRs participent à la maturation autophagique en servant de plateforme d'arrêt pour les vésicules (Figure 21). Il serait intéressant de tester cette hypothèse en suivant dynamiquement la formation d'un autophagosome, le recrutement des effecteurs de la maturation et des SLRs et enfin la fusion avec les endosomes. Ceci pourrait être réalisé grâce à l'utilisation de la microscopie confocale time-lapse. Parmi les effecteurs à suivre, il faudrait sélectionner un représentant de chaque étape de la maturation afin d'identifier où se place temporellement et spatialement les mSLRs. Ainsi, il serait intéressant de suivre le recrutement des SLRs au niveau des autophagosomes vis-à-vis de celui de Rab7, une Rab GTPase qui permet de recruter des effecteurs de la maturation autophagique aussi bien sur les autophagosome que sur les lysosomes. D'autres facteurs intéressants à étudier pourraient être le facteur d'attache membranaire TECPR1 mais aussi la protéine de fusion Syntaxine-17 qui marque deux étapes clés de la maturation : l'attache des membranes et leur fusion, respectivement. Une alternative serait d'évaluer le recrutement de ces effecteurs de la maturation autophagique sur des autophagosomes accumulés en absence de NDP52, Optineurine ou T6BP. Cette approche permettrait d'identifier quelle étape de la maturation autophagique est bloquée en l'absence de ces mSLRs. La microscopie confocale à haute résolution ou encore la microscopie électronique seraient des techniques envisageables pour répondre à cette question.

Pour mieux comprendre le double rôle des récepteurs autophagiques, il nous faut aussi mieux comprendre comment les deux fonctions sont régulées au niveau moléculaire. La régulation de la fonction des SLRs dans le ciblage des substrats est régulée par l'activité kinase de TBK1. Pour l'implication des mSLRs NDP52, Optineurine et T6BP dans la maturation, il n'y a encore aucune donnée publiée sur une potentielle régulation post-traductionnelle. De manière intéressante, il existe des exemples de processus de fusion/scission mitochondriale régulée par l'ubiquitination des protéines impliquées. En effet, l'ubiquitination de DRP1, une

protéine impliquée dans la division mitochondriale, régule son assemblage ou son désassemblage à la surface de la mitochondrie (Karbowski et al., 2007). L'hypothèse d'une régulation par ubiquitination via RNF11 nous paraît alors prometteuse, d'autant plus avec les résultats déjà obtenus (voir paragraphe 2.2). Afin de caractériser le mécanisme impliqué, nous avons identifié par spectrométrie de masse sur NDP52 un dizaine de lysines ubiquitinées. Des travaux futurs viseront à muter ces lysines afin d'abolir l'ubiquitination et d'évaluer l'impact que cela pourrait avoir sur la maturation, la prolifération de *Salmonella* mais aussi la liaison avec la Myosine VI. En effet, une étude récente montre que la Myosine VI peut lier des chaînes d'ubiquitine présentes sur les SLRs (He et al., 2016). Nous pouvons alors envisager le mécanisme suivant : l'ubiquitination de NDP52 par une E3-ubiquitine ligase permettrait une liaison de forte affinité avec la Myosine VI et donc le rapprochement entre autophagosome et endosome (Figure 21). Ceci permettrait la liaison de RNF11 apportée par l'endosome avec NDP52 et l'inhibition de l'E3-ubiquitine ligase. L'ubiquitination de NDP52 diminuerait ce qui libérerait la Myosine VI et permettrait la fusion autrement impossible du fait de l'encombrement stérique de cette plateforme d'interactions. Ce mécanisme reste à confirmer, notamment par l'identification de l'E3-ubiquitine ligase impliquée. Nous avons pour l'instant au moins 3 candidates interagissant avec RNF11: SMURF1, SMURF2 et ITCH. Il serait important de tester si l'absence de l'une de ces E3 entraîne un blocage de la maturation.



**Figure 21 : Rôles de NDP52 dans la xénophagie contre *Salmonella***

Parmi les 3 SLRs participant à la maturation, NDP52 est celui dont le mécanisme moléculaire est le mieux décrit. Pour cibler les bactéries, NDP52 possède deux domaines permettant de reconnaître *Salmonella* via la galectine 8 mais aussi l'ubiquitine (Ub) mais aussi un domaine LIR non canonique (CLIR) liant exclusivement LC3C. Durant la maturation, NDP52 lie côté autophagosome LC3A, LC3B et/ou GABARAPL2 via un domaine « LIR-like » ou pseudo-LIR. Côté endosomal, NDP52 peut se lier à la Myosine VI, elle-même liée à l'endosome via TOM1. Il reste encore des inconnues dans ce mécanisme, à savoir si l'autophagosome est complètement formé ou non et comment est régulée la liaison NDP52-Myosine VI. Mes travaux et la littérature suggèrent une hypothèse de travail basée sur l'ubiquitination de NDP52 par une E3 encore inconnue. (1) Les chaînes d'ubiquitine seraient reconnues par la Myosine VI et stabiliseraient l'interaction avec NDP52. (2) RNF11 pourrait inhiber cette E3 et ainsi diminuer l'ubiquitination de NDP52, (3) ce qui libérerait la Myosine VI et permettrait la maturation.

#### 4.2 Les SLRs dans l'autophagie canonique et non canonique

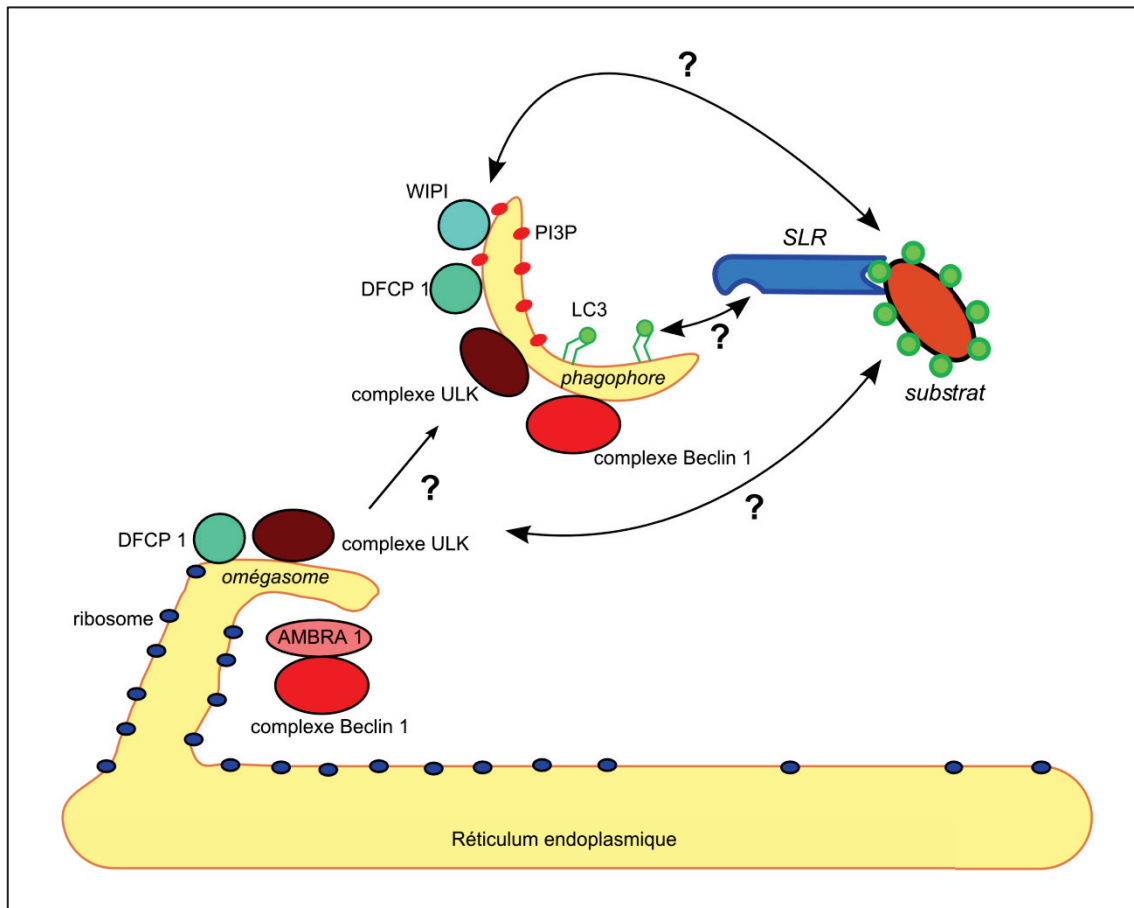
L'implication des mSLRs NDP52, Optineurine et T6BP dans la maturation autophagique a été montrée durant l'autophagie basale mais aussi durant la xénophagie contre *Salmonella* pour NDP52 et T6BP. Cependant, il n'y a pas de données sur l'importance de ces SLRs durant la maturation autophagique au cours de la mitophagie, ou d'autres formes d'autophagie canonique. Il est aussi possible que les SLRs participent à d'autres étapes de l'autophagie, en amont de la maturation. Enfin, une possible implication des SLRs durant la phagocytose associée à LC3 reste encore à être étudiée.

Il est intéressant de noter les grandes similitudes entre la xénophagie contre les bactéries et la mitophagie ; les substrats sont ubiquitinés, les mêmes récepteurs sont impliqués. Par analogie, il serait possible que les récepteurs autophagiques participent aussi à la maturation des autophagosomes contenant des mitochondries et que les mécanismes soient conservés. Cependant, les SLRs impliqués dans la maturation semblent avoir des rôles certes similaires mais non redondants. Il serait alors possible que les récepteurs autophagiques soient

différentiellement impliqués dans les différentes formes d'autophagie, sélective ou non. En effet, il existe une grande variété de stress pouvant induire l'autophagie ; il serait intéressant de tester si l'absence d'un ou plusieurs mSLRs bloque aussi la maturation durant l'autophagie induite par le manque d'acides aminés, l'hypoxie...

De plus, il convient d'explorer plus avant les potentiels autres rôles des SLRs dans les étapes précoces de formation de l'autophagosome autour de son substrat par exemple (Figure 22). Il est possible que les SLRs puissent interagir avec des acteurs moléculaires en amont des LC3s ce qui conduirait à la formation d'un complexe d'initiation autour du récepteur et de son substrat. En effet, il a été montré que l'absence de NDP52 ou d'Optineurine durant la mitophagie entraîne un défaut de recrutement de protéines de l'initiation en amont de LC3 ; DFPC1 et WIPI (Lazarou et al., 2015). Il serait intéressant de vérifier si les SLRs peuvent interagir avec DFPC1 et WIPI mais aussi avec les protéines des complexes d'initiation comme FIP200, ULK1 ou encore Beclin 1. Si tel est le cas, cela ouvrirait de nouvelles pistes de travail sur l'implication des SLRs dans la formation du phagophore autour du substrat.

Enfin, une autre piste intéressante à explorer serait celle de la phagocytose médiée par LC3 (LAP). Cette forme de phagocytose est considérée comme de l'autophagie non canonique car elle implique des protéines de l'autophagie, parmi lesquelles LC3, durant la phagocytose (voir paragraphe 1.4.4). Un détail fascinant du mécanisme du LAP est la nécessaire conjugaison de LC3 sur la face externe du LAPosome pour la fusion avec la voie endosomale. Il serait alors possible de faire le parallèle avec le mécanisme décrit pour la maturation des autophagosomes par les SLRs. Il serait intéressant d'étudier si les mSLRs impliqués dans la maturation des autophagosomes sont aussi impliqués dans la maturation du LAPosome. Si tel est le cas, une autre piste à explorer serait la potentielle conservation des mécanismes moléculaires de cette maturation. Il se pourrait que certains des partenaires moléculaires des mSLRs diffèrent entre maturation du LAPosome et de l'autophagosome tout comme cela est le cas avec les complexes d'initiation de ces deux mécanismes. Enfin, si le rôle des mSLRs NDP52, Optineurine et T6BP est conservé entre maturation de l'autophagosome et maturation du LAPosome, cela ouvrirait sur une question plus vaste ; est-ce que la fusion entre une vésicule et un endosome nécessite la conjugaison de LC3, les SLRs et la Myosine VI ?



**Figure 22 : Les SLRs et l'initiation de l'autophagie sélective**

Les récepteurs autophagiques NDP52, Optineurine et T6BP participent tous au ciblage de bactéries vers l'autophagie mais de nouveaux rôles apparaissent cruciaux pour le bon déroulement de l'autophagie et de la xénophagie. Mes travaux démontrent que ces récepteurs participent aussi à la maturation en liant autophagosomes et endosomes via LC3 et la Myosine VI. Cependant il semblerait que les SLRs participent aussi à la formation de l'autophagosome autour du substrat. Ce rôle pourrait soit dépendre la liaison des SLRs avec les LC3s soit dépendre de facteurs en amont comme DFCP1, WIPI ou encore les complexes ULK et Beclin 1.

### 4.3 NDP52 et la maladie de Crohn

Mes travaux sur NDP52 ont été réalisés dans un modèle cellulaire et ont permis de décrire le mécanisme moléculaire l'impliquant dans la maturation des autophagosomes. Les perspectives de travail présentées jusqu'ici sont elles aussi centrées sur des aspects moléculaires de l'autophagie. Cependant, à l'échelle de l'organisme l'autophagie est aussi impliquée dans le développement de plusieurs pathologies humaines. Il serait alors intéressant d'étendre les résultats de mes travaux à un contexte plus physiologique : j'ai ici choisi l'exemple de la maladie de Crohn.

La maladie de Crohn est un syndrome inflammatoire chronique des intestins caractérisé par des phases de crises entrecoupées de phases de rémission. Les zones atteintes



de l'intestin sont le plus souvent l'iléon et le côlon. C'est une maladie relativement rare, on estime qu'il y a 15 à 20 nouveaux cas par an en France pour un total d'environ 200 000 patients, mais cependant elle est aussi grandement incapacitante. Les facteurs exacts contribuant au développement de la maladie sont mal connus; mais y sont inclus des facteurs environnementaux, immunologiques et génétiques. Parmi ces derniers, plusieurs polymorphismes génétiques liés à des gènes de l'autophagie ont été identifiés comme facteurs de risques comme ATG16L1 ou IRGM (Hoefkens et al., 2013). Il a aussi été montré que le microbiote intestinal des patients atteints de Crohn est perturbé avec une prévalence d'*Escherichia Coli Adhérente Invasive* (AIEC) (Darfeuille-Michaud et al., 2004). Cette bactérie est éliminée par xénophagie et l'absence d'ATG16L1 ou d'IRGM empêche cette élimination (Lapaquette et al., 2010). Il est donc probable qu'un défaut de xénophagie associé à une invasion et une prolifération accrue de microorganismes comme AIEC contribuent au développement de la maladie (Figure 23).

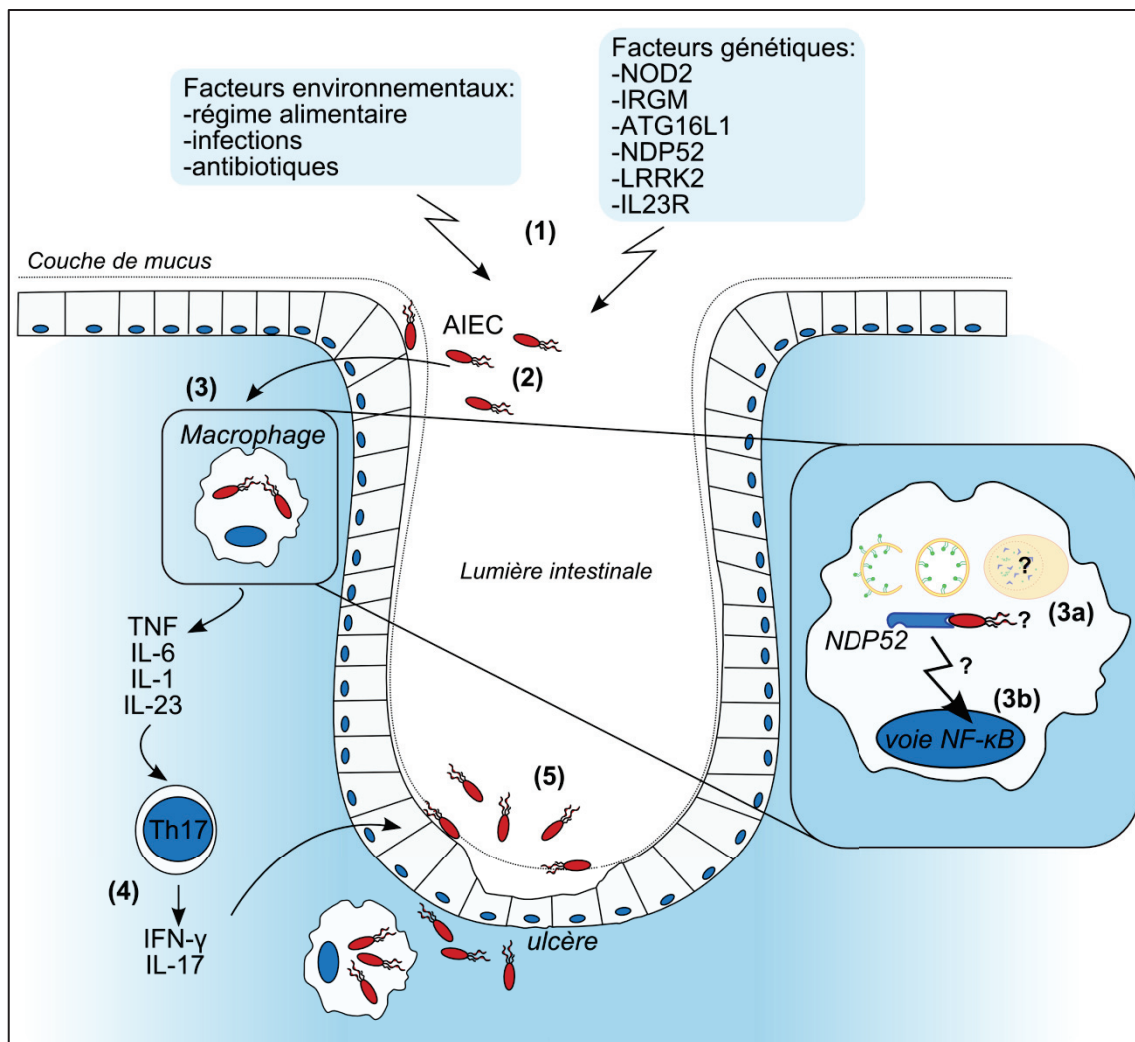
Comme nous l'avons montré certains SLRs dont NDP52 sont cruciaux pour le bon déroulement de la xénophagie, du ciblage de la bactérie à sa dégradation. Il serait intéressant d'explorer si ces SLRs peuvent aussi participer à la maturation des autophagosomes durant l'élimination d'AIEC. Cette hypothèse est attrayante dans la mesure où un polymorphisme de NDP52 a été identifié associé à des patients atteints de Crohn (Ellinghaus et al., 2013). Ce variant est par ailleurs corrélé à un risque accru de péritonite bactérienne chez des patients atteints de cirrhose hépatique alcoolique (Lutz et al., 2016). De manière intéressante, ce variant présente une mutation ponctuelle modifiant la valine 248 de NDP52 pour une alanine. Ce site est proche de plusieurs lysines ubiquitinées que nous avons identifiées (Lys 244 et Lys 246). Il serait intéressant d'évaluer si cette mutation de NDP52 a un effet sur le ciblage des bactéries dans les autophagosomes ou sur la maturation autophagique. Un défaut d'une de ces fonctions pourrait participer à l'envahissement des tissus par AIEC et être un facteur de développement de la maladie (Figure 23). Si ce variant de NDP52 est bien associé à une xénophagie perturbée, il serait intéressant de vérifier si des polymorphismes touchent les autres SLRs chez les patients atteints de Crohn.

Cependant, dans le cas de la maladie de Crohn il faut aussi tenir compte de l'implication de NDP52 dans l'activation de la voie NF- $\kappa$ B (Figure 23). En effet, parmi les mécanismes moléculaires et cellulaires participant à la pathologie de la maladie de Crohn on trouve non seulement l'autophagie mais aussi un dérèglement des réponses inflammatoires avec une réponse Th17 prééminente (Díaz Peña et al., 2015). Or, il a été montré que la mutation en position 248 de NDP52 provoque une forte activation de la voie NF- $\kappa$ B (Ellinghaus et al., 2013). Par ailleurs, T6BP et Optineurine sont aussi impliquées dans cette voie de signalisation, notamment dans le cadre d'infections virales (Journo et al., 2009). Il faut aussi ajouter que des macrophages issus de patients ont non seulement une élimination

d'AIEC diminuée mais aussi un profil de cytokines sécrétées perturbé avec une forte sécrétion de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 (Vazeille et al., 2015). Enfin, des patients Crohn ayant un profil de sécrétion de TNF- $\alpha$  bas ont aussi un taux d'Optineurine diminué (Smith et al., 2015). De plus, des souris KO pour Optineurine produisent moins de TNF- $\alpha$  et d'IL-6 durant l'infection bactérienne (Chew et al., 2015). Enfin, il faut aussi tenir compte de la potentielle implication de RNF11 dans ces voies de signalisation ; en effet RNF11 module la voie NF- $\kappa$ B via T6BP (Shembade et al., 2009). Il se peut donc que NDP52 et les mSLRs soient impliqués dans le développement de la maladie de Crohn via leurs fonctions dans les voies de signalisation de l'immunité, de manière directe ou indirecte via RNF11.

Ainsi, plusieurs facteurs liés à NDP52 pourraient participer au développement de la maladie de Crohn : un défaut de ciblage des bactéries, un défaut de maturation des autophagosomes, une signalisation NF- $\kappa$ B accrue. Ces hypothèses ne sont pas mutuellement exclusives, ces facteurs pourraient agir de manière indépendante ou synergique mais avec la même conséquence : une augmentation de l'inflammation des tissus et la formation d'ulcères intestinaux (Figure 23).

Dans le cadre de la maladie de Crohn, plusieurs facteurs participent au développement de la maladie ; parmi eux une prolifération d'AIEC liée à une inflammation anormale des tissus. L'évènement déclencheur reste inconnu mais pourrait être un facteur environnemental lié au mode de vie du patient. Le rôle de l'autophagie et des SLRs dans la maladie de Crohn est encore mal caractérisé mais pourrait concerner aussi bien l'élimination d'AIEC que la réponse inflammatoire (Figure 23).



**Figure 23 : Implications de NDP52 dans la maladie de Crohn**

Le développement de la maladie de Crohn est un processus complexe encore mal défini. (1) Des facteurs environnementaux mais aussi génétiques peuvent participer à son déclenchement. (2) Les patients atteints par la maladie de Crohn montrent une dysbiose de la flore intestinale avec une surreprésentation d'AIEC qui envahit les tissus épithéliaux. (3) AIEC peut aussi envahir les macrophages mais n'est pas correctement éliminée. Cette accumulation provoque une réponse inflammatoire anormale des macrophages chez les patients. (3a) L'accumulation d'AIEC dans les macrophages pourrait être provoquée par un défaut de la xénophagie dû au variant de NDP52, soit au niveau de l'adressage, soit au niveau de la maturation des autophagosomes. (3b) La suractivation de la réponse inflammatoire pourrait aussi être provoquée par NDP52 via la voie NF- $\kappa$ B par exemple. (4) Cette réponse inflammatoire à profil Th17 entraîne une inflammation excessive des tissus. (5) Cette inflammation favorise l'invasion par AIEC et provoque la formation d'ulcères.

#### **4.4 Conclusion**

Mes travaux de thèse ont permis de caractériser un rôle nouveau pour le récepteur autophagique NDP52, qui est sa participation à la maturation des autophagosomes. De plus, deux autres SLRs, Optineurine et T6BP semblent aussi participer à ce processus. Il apparaît donc que durant la xénophagie ces SLRs assurent deux rôles indispensables et complémentaires; le ciblage des pathogènes vers la machinerie autophagique et leur dégradation en assurant la maturation des autophagosomes. De manière intéressante, les partenaires moléculaires et domaines de NDP52 impliqués dans les deux processus divergent ce qui nous a amené à supposer l'existence d'un mécanisme de régulation de ces fonctions. Les premiers résultats obtenus semblent confirmer cette hypothèse à travers l'ubiquitination des SLRs impliqués dans la maturation dépendante de la protéine RNF11. Ces résultats offrent des perspectives de travail intéressantes non seulement pour mieux connaître le fonctionnement moléculaire de l'autophagie à travers l'étude des rôles des récepteurs autophagiques dans les différentes formes d'autophagie, mais aussi éventuellement pour mieux comprendre les implications physiopathologiques de l'autophagie dans les maladies inflammatoires de l'intestin comme la maladie de Crohn.

# Références bibliographiques

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.

Altman, D., Goswami, D., Hasson, T., Spudich, J.A., and Mayor, S. (2007). Precise positioning of myosin VI on endocytic vesicles in vivo. *PLoS Biol.* 5, e210.

Aplin, A., Jasionowski, T., Tuttle, D.L., Lenk, S.E., and Dunn, W.A. (1992). Cytoskeletal elements are required for the formation and maturation of autophagic vacuoles. *J. Cell. Physiol.* 152, 458–466.

Araki, Y., Ku, W.-C., Akioka, M., May, A.I., Hayashi, Y., Arisaka, F., Ishihama, Y., and Ohsumi, Y. (2013). Atg38 is required for autophagy-specific phosphatidylinositol 3-kinase complex integrity. *J. Cell Biol.* 203, 299–313.

Aschenbrenner, L., Naccache, S.N., and Hasson, T. (2004). Uncoated endocytic vesicles require the unconventional myosin, Myo6, for rapid transport through actin barriers. *Mol. Biol. Cell* 15, 2253–2263.

Ashford, T.P., and Porter, K.R. (1962). Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. *J. Cell Biol.* 12, 198–202.

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.

Baca, O.G., Li, Y.-P., and Kumar, H. (1994). Survival of the Q fever agent *Coxiella burnetii* in the phagolysosome. *Trends in Microbiology* 2, 476–480.

Bach, M., Larance, M., James, D.E., and Ramm, G. (2011). The serine/threonine kinase ULK1 is a target of multiple phosphorylation events. *Biochem. J.* 440, 283–291.

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 MIT1 clone of Group A *Streptococcus* evades autophagy for intracellular replication. *Cell Host Microbe* 14, 675–682.

Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., Dauguet, C., Axler-Blin, C., Vezinet-Brun, F., Rouzioux, C., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220, 868–871.

- Bartolomeo, S.D., 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. *The Journal of Cell Biology* *191*, 155.
- 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.
- 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.
- Bhuin, T., and Roy, J.K. (2014). Rab proteins: The key regulators of intracellular vesicle transport. *Experimental Cell Research* *328*, 1–19.
- Biazik, J., Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Eskelinen, E.-L. (2015). Ultrastructural relationship of the phagophore with surrounding organelles. *Autophagy* *11*, 439–451.
- Birgisdottir, Á.B., Lamark, T., and Johansen, T. (2013). The LIR motif - crucial for selective autophagy. *J. Cell. Sci.* *126*, 3237–3247.
- Birmingham, C.L., Canadien, V., Kaniuk, N.A., Steinberg, B.E., Higgins, D.E., and Brumell, J.H. (2008). Listeriolysin O allows *Listeria monocytogenes* replication in macrophage vacuoles. *Nature* *451*, 350–354.
- Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, 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.
- Cao, Y., and Klionsky, D.J. (2007). Atg26 is not involved in autophagy-related pathways in *Saccharomyces cerevisiae*. *Autophagy* *3*, 17–20.
- Cemma, M., Kim, P.K., and Brumell, J.H. (2011). The ubiquitin-binding adaptor proteins p62/SQSTM1 and NDP52 are recruited independently to bacteria-associated microdomains to target *Salmonella* to the autophagy pathway. *Autophagy* *7*, 341–345.
- Chauhan, S., Mandell, M.A., and Deretic, V. (2015). IRGM Governs the Core Autophagy Machinery to Conduct Antimicrobial Defense. *Molecular Cell* *58*, 507–521.
- Chaumorcel, M., Lussignol, M., Mouna, L., Cavnignac, 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. *Molecular Cell* 45, 629.
- Chew, T.S., O'Shea, N.R., Sewell, G.W., Oehlers, S.H., Mulvey, C.M., Crosier, P.S., Godovac-Zimmermann, J., Bloom, S.L., Smith, A.M., and Segal, A.W. (2015). Optineurin deficiency in mice contributes to impaired cytokine secretion and neutrophil recruitment in bacteria-driven colitis. *Dis Model Mech* 8, 817–829.
- Chiang, H.L., and Dice, J.F. (1988). Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal. *J. Biol. Chem.* 263, 6797–6805.
- Chibalina, M.V., Seaman, M.N.J., Miller, C.C., Kendrick-Jones, J., and Buss, F. (2007). Myosin VI and its interacting protein LMTK2 regulate tubule formation and transport to the endocytic recycling compartment. *J Cell Sci* 120, 4278–4288.
- Ciani, B., Layfield, R., Cavey, J.R., Sheppard, P.W., and Searle, M.S. (2003). Structure of the ubiquitin-associated domain of p62 (SQSTM1) and implications for mutations that cause Paget's disease of bone. *J. Biol. Chem.* 278, 37409–37412.
- Clark, S.L. (1957). Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol* 3, 349–362.
- 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.
- Colland, F., Jacq, X., Trouplin, V., Mouglin, C., Groizeleau, C., Hamburger, A., Meil, A., Wojcik, J., Legrain, P., and Gauthier, J.-M. (2004). Functional Proteomics Mapping of a Human Signaling Pathway. *Genome Res.* 14, 1324–1332.
- Corbeil, J., and Richman, D.D. (1995). Productive infection and subsequent interaction of CD4-gp120 at the cellular membrane is required for HIV-induced apoptosis of CD4+ T cells. *J. Gen. Virol.* 76 ( Pt 3), 681–690.
- Cottam, E.M., Maier, H.J., Manifava, M., Vaux, L.C., Chandra-Schoenfelder, P., Gerner, W., Britton, P., Ktistakis, N.T., and Wileman, T. (2011). Coronavirus nsp6 proteins generate autophagosomes from the endoplasmic reticulum via an omegasome intermediate. *Autophagy* 7, 1335–1347.
- Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science* 273, 501–503.

Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (2000). Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic 1*, 570–583.

Darfeuille-Michaud, A., Boudeau, J., Bulois, P., Neut, C., Glasser, A.-L., Barnich, N., Bringer, M.-A., Swidsinski, A., Beaugerie, L., and Colombel, J.-F. (2004). High prevalence of adherent-invasive *Escherichia coli* associated with ileal mucosa in Crohn's disease. *Gastroenterology 127*, 412–421.

De Duve, C. (1963). The lysosome. *Sci. Am.* 208, 64–72.

De Duve, C., and Wattiaux, R. (1966). Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* 28, 435–492.

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 520*, 563.

Díaz Peña, R., Valdés, E., Cofré, C., and Castro-Santos, P. (2015). Th17 response and autophagy--main pathways implicated in the development of inflammatory bowel disease by genome-wide association studies. *Rev Esp Enferm Dig 107*, 559–565.

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.

Dikic, I., Wakatsuki, S., and Walters, K.J. (2009). Ubiquitin-binding domains — from structures to functions. *Nat Rev Mol Cell Biol 10*, 659–671.

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.

Dubouloz, F., Deloche, O., Wanke, V., Cameroni, E., and De Virgilio, C. (2005). The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Mol. Cell 19*, 15–26.

Dunn, W.A. (1994). Autophagy and related mechanisms of lysosome-mediated protein degradation. *Trends Cell Biol.* 4, 139–143.

Dupont, N., Lacas-Gervais, S., Bertout, J., Paz, I., Freche, B., Van Nhieu, G.T., van der Goot, F.G., Sansonetti, P.J., and Lafont, F. (2009). *Shigella* Phagocytic Vacuolar Membrane Remnants Participate in the Cellular Response to Pathogen Invasion and Are Regulated by Autophagy. *Cell Host & Microbe 6*, 137–149.

Egan, D., Kim, J., Shaw, R.J., and Guan, K.-L. (2011). The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy 7*, 643–644.



- 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.* *15*, 2286–2287.
- English, L., Chemali, M., Duron, J., Rondeau, C., Laplante, A., Gingras, D., Alexander, D., Leib, D., Norbury, C., Lippé, R., 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.
- Epple, U.D., Suriapranata, I., Eskelinen, E.L., and Thumm, M. (2001). Aut5/Cvt17p, a putative lipase essential for disintegration of autophagic bodies inside the vacuole. *J. Bacteriol.* *183*, 5942–5955.
- Eskelinen, E.-L., Schmidt, C.K., Neu, S., Willenborg, M., Fuertes, G., Salvador, N., Tanaka, Y., Lüllmann-Rauch, R., Hartmann, D., Heeren, J., et al. (2004). Disturbed Cholesterol Traffic but Normal Proteolytic Function in LAMP-1/LAMP-2 Double-deficient Fibroblasts. *Mol. Biol. Cell* *15*, 3132–3145.
- Eskelinen, E.-L., Reggiori, F., Baba, M., Kovács, A.L., and Seglen, P.O. (2011). Seeing is believing: the impact of electron microscopy on autophagy research. *Autophagy* *7*, 935–956.
- 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.G., Mestre, M.B., and Colombo, M.I. (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochim. Biophys. Acta* *1793*, 1901–1916.
- Feng, Y., Press, B., and Wandinger-Ness, A. (1995). Rab 7: an important regulator of late endocytic membrane traffic. *J Cell Biol* *131*, 1435–1452.
- Fimia, G.M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., et al. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* *447*, 1121–1125.
- Fiskin, E., Bionda, T., Dikic, I., and Behrends, C. (2016). Global Analysis of Host and Bacterial Ubiquitinome in Response to Salmonella Typhimurium Infection. *Mol. Cell*.

- Florey, O., Kim, S.E., Sandoval, C.P., Haynes, C.M., and Overholtzer, M. (2011). Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nat. Cell Biol.* *13*, 1335–1343.
- Ganley, I.G., Lam, D.H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* *284*, 12297–12305.
- Ganley, I.G., Wong, P.-M., Gammoh, N., and Jiang, X. (2011). Distinct Autophagosomal-Lysosomal Fusion Mechanism Revealed by Thapsigargin-Induced Autophagy Arrest. *Molecular Cell* *42*, 731–743.
- 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.
- Geisler, S., Holmström, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J., and Springer, W. (2010). PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.* *12*, 119–131.
- Gordon, P.B., and Seglen, P.O. (1988). Prelysosomal convergence of autophagic and endocytic pathways. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *151*, 40–47.
- Granato, M., Santarelli, R., Farina, A., Gonnella, R., Lotti, L.V., Faggioni, A., and Cirone, M. (2014). Epstein-barr virus blocks the autophagic flux and appropriates the autophagic machinery to enhance viral replication. *J. Virol.* *88*, 12715–12726.
- 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.
- 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. *Cellular Microbiology* *7*, 981–993.
- Gwinn, D.M., Shackelford, D.B., Egan, D.F., Mihaylova, M.M., Mery, A., Vasquez, D.S., Turk, B.E., and Shaw, R.J. (2008). AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol. Cell* *30*, 214–226.
- 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.

Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S.-I., 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.

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.

He, F., Wollscheid, H.-P., Nowicka, U., Biancospino, M., Valentini, E., Ehlinger, A., Acconcia, F., Magistrati, E., Polo, S., and Walters, K.J. (2016). Myosin VI Contains a Compact Structural Motif that Binds to Ubiquitin Chains. *Cell Rep* *14*, 2683–2694.

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.

Hoefkens, E., Nys, K., John, J.M., Van Steen, K., Arijs, I., Van der Goten, J., Van Assche, G., Agostinis, P., Rutgeerts, P., Vermeire, S., et al. (2013). Genetic association and functional role of Crohn disease risk alleles involved in microbial sensing, autophagy, and endoplasmic reticulum (ER) stress. *Autophagy* *9*, 2046–2055.

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.

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.

Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., et al. (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* *408*, 488–492.

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

Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T., and Mizushima, N. (2014). The HOPS complex mediates autophagosome–lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Molecular Biology of the Cell* *25*, 1327.

- Jo, C., Gundemir, S., Pritchard, S., Jin, Y.N., Rahman, I., and Johnson, G.V.W. (2014). Nrf2 reduces levels of phosphorylated tau protein by inducing autophagy adaptor protein NDP52. *Nat Commun* 5, 3496.
- Johansen, T., and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 7, 279–296.
- Johansson, M., Rocha, N., Zwart, W., Jordens, I., Janssen, L., Kuijl, C., Olkkonen, V.M., and Neefjes, J. (2007). Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7–RILP–p150Glued, ORP1L, and the receptor  $\beta$ III spectrin. *J Cell Biol* 176, 459–471.
- 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.
- Journo, C., Filipe, J., About, F., Chevalier, S.A., Afonso, P.V., Brady, J.N., Flynn, D., Tangy, F., Israël, A., Vidalain, P.-O., et al. (2009). NRP/Optineurin Cooperates with TAX1BP1 to Potentiate the Activation of NF- $\kappa$ B by Human T-Lymphotropic Virus Type 1 Tax Protein. *PLOS Pathog* 5, e1000521.
- Judith, D., Mostowy, S., Bourai, M., Gangneux, N., Lelek, M., Lucas-Hourani, M., Cayet, N., Jacob, Y., Prévost, M.-C., Pierre, P., et al. (2013). Species-specific impact of the autophagy machinery on Chikungunya virus infection. *EMBO Rep.* 14, 534–544.
- Jung, C.H., Jun, C.B., Ro, S.-H., Kim, Y.-M., Otto, N.M., Cao, J., Kundu, M., and Kim, D.-H. (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell* 20, 1992–2003.
- Jung, C.H., Ro, S.-H., Cao, J., Otto, N.M., and Kim, D.-H. (2010). mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters* 584, 1287.
- Juris, L., Montino, M., Rube, P., Schlotterhose, P., Thumm, M., and Krick, R. (2015). PI3P binding by Atg21 organises Atg8 lipidation. *EMBO J.* 34, 955–973.
- Kabeya, Y., Kawamata, T., Suzuki, K., and Ohsumi, Y. (2007). Cisl/Atg31 is required for autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356, 405–410.
- Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M., and Klionsky, D.J. (2009a). Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev. Cell* 17, 98–109.

- Kanki, T., Wang, K., Baba, M., Bartholomew, C.R., Lynch-Day, M.A., Du, Z., Geng, J., Mao, K., Yang, Z., Yen, W.-L., et al. (2009b). A genomic screen for yeast mutants defective in selective mitochondria autophagy. *Mol. Biol. Cell* 20, 4730–4738.
- Kanninen, K., White, A.R., Koistinaho, J., and Malm, T. (2011). Targeting Glycogen Synthase Kinase-3 $\beta$  for Therapeutic Benefit against Oxidative Stress in Alzheimer's Disease: Involvement of the Nrf2-ARE Pathway. *Int J Alzheimers Dis* 2011, 985085.
- Karbowski, M., Neutzner, A., and Youle, R.J. (2007). The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J. Cell Biol.* 178, 71–84.
- Kaushik, S., and Cuervo, A.M. (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends Cell Biol* 22, 407–417.
- Kawamata, T., Kamada, Y., Suzuki, K., Kuboshima, N., Akimatsu, H., Ota, S., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (2005). Characterization of a novel autophagy-specific gene, ATG29. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 338, 1884–1889.
- Kawamata, T., Kamada, Y., Kabeya, Y., Sekito, T., and Ohsumi, Y. (2008). Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation. *Mol. Biol. Cell* 19, 2039–2050.
- 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.
- Kihara, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Beclin–phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network. *EMBO Rep* 2, 330–335.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011a). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat. Cell Biol.* 13, 132–141.
- Kim, J.-Y., Zhao, H., Martinez, J., Doggett, T.A., Kolesnikov, A.V., Tang, P.H., Ablonczy, Z., Chan, C.-C., Zhou, Z., Green, D.R., et al. (2013). Noncanonical autophagy promotes the visual cycle. *Cell* 154, 365–376.
- Kim, S., Lee, D., Song, J.C., Cho, S.-J., Yun, S.-M., Koh, Y.H., Song, J., Johnson, G.V.W., and Jo, C. (2014). NDP52 associates with phosphorylated tau in brains of an Alzheimer disease mouse model. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 454, 196–201.
- Kim, W., Bennett, E.J., Huttlin, E.L., Guo, A., Li, J., Possemato, A., Sowa, M.E., Rad, R., Rush, J., Comb, M.J., et al. (2011b). Systematic and quantitative assessment of the ubiquitin-modified proteome. *Mol. Cell* 44, 325–340.

- Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct. Funct.* 33, 109–122.
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J. Cell Biol.* 147, 435–446.
- 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.
- Kissová, 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.
- Klionsky, D.J., Abdelmohsen, K., Abe, A., Abedin, M.J., Abeliovich, H., Arozena, A.A., Adachi, H., Adams, C.M., Adams, P.D., Adeli, K., et al. (2016). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy*.
- Knorr, R.L., Lipowsky, R., and Dimova, R. (2015). Autophagosome closure requires membrane scission. *Autophagy* 11, 2134–2137.
- Kobayashi, T., Suzuki, K., and Ohsumi, Y. (2012). Autophagosome formation can be achieved in the absence of Atg18 by expressing engineered PAS-targeted Atg2. *FEBS Lett.* 586, 2473–2478.
- Köchli, R., Hu, X.W., Chan, E.Y.W., and Tooze, S.A. (2006). Microtubules Facilitate Autophagosome Formation and Fusion of Autophagosomes with Endosomes. *Traffic* 7, 129–145.
- Kostaras, E., Sflomos, G., Pedersen, N.M., Stenmark, H., Fotsis, T., and Murphy, C. (2013). SARA and RNF11 interact with each other and ESCRT-0 core proteins and regulate degradative EGFR trafficking. *Oncogene* 32, 5220–5232.
- Kovács, A.L., Réz, G., Pálfi, Z., and Kovács, J. (2000). Autophagy in the epithelial cells of murine seminal vesicle in vitro. Formation of large sheets of nascent isolation membranes, sequestration of the nucleus and inhibition by wortmannin and 3-ethyladenine. *Cell Tissue Res.* 302, 253–261.
- Koyano, F., Okatsu, K., Kosako, H., Tamura, Y., Go, E., Kimura, M., Kimura, Y., Tsuchiya, H., Yoshihara, H., Hirokawa, T., et al. (2014). Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* 510, 162–166.

- Krejebich-Trotot, P., Gay, B., Li-Pat-Yuen, G., Hoarau, J.-J., Jaffar-Bandjee, M.-C., Briant, L., Gasque, P., and Denizot, M. (2011). Chikungunya triggers an autophagic process which promotes viral replication. *Virology* 432.
- 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.
- Lang, T., Schaeffeler, E., Bernreuther, D., Bredschneider, M., Wolf, D.H., and Thumm, M. (1998). Aut2p and Aut7p, two novel microtubule-associated proteins are essential for delivery of autophagic vesicles to the vacuole. *EMBO J*. 17, 3597–3607.
- 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.
- 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.
- Leber, R., Silles, E., Sandoval, I.V., and Mazón, M.J. (2001). Yol082p, a novel CVT protein involved in the selective targeting of aminopeptidase I to the yeast vacuole. *J. Biol. Chem.* 276, 29210–29217.
- Li, H., and Seth, A. (2004). An RNF11: SMURF2 complex mediates ubiquitination of the AMSH protein. *Oncogene* 23, 1801–1808.
- Liang, C., Lee, J., Inn, K., Gack, M.U., Li, Q., Roberts, E.A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., et al. (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat. Cell Biol.* 10, 776–787.
- Liang, X.H., Kleeman, L.K., Jiang, H.H., Gordon, G., Goldman, J.E., Berry, G., Herman, B., and Levine, B. (1998). Protection against Fatal Sindbis Virus Encephalitis by Beclin, a Novel Bcl-2-Interacting Protein. *J Virol* 72, 8586–8596.
- Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 402, 672–676.
- Loubéry, S., Delevoye, C., Louvard, D., Raposo, G., and Coudrier, E. (2012). Myosin VI regulates actin dynamics and melanosome biogenesis. *Traffic* 13, 665–680.
- Lu, Q., Yang, P., Huang, X., Hu, W., Guo, B., Wu, F., Lin, L., Kovács, A.L., Yu, L., and Zhang, H. (2011). The WD40 Repeat PtdIns(3)P-Binding Protein EPG-6 Regulates Progression of Omegasomes to Autophagosomes. *Developmental Cell* 21, 343–357.

- 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.
- Lutz, P., Krämer, B., Kaczmarek, D.J., Hübner, M.P., Langhans, B., Appenrodt, B., Lammert, F., Nattermann, J., Hoerauf, A., Strassburg, C.P., et al. (2016). A variant in the nuclear dot protein 52kDa gene increases the risk for spontaneous bacterial peritonitis in patients with alcoholic liver cirrhosis. *Dig Liver Dis* *48*, 62–68.
- Lv, L., Li, D., Zhao, D., Lin, R., Chu, Y., Zhang, H., Zha, Z., Liu, Y., Li, Z., Xu, Y., et al. (2011). Acetylation targets the M2 isoform of pyruvate kinase for degradation through chaperone-mediated autophagy and promotes tumor growth. *Mol. Cell* *42*, 719–730.
- Macri, C., Wang, F., Tasset, I., Schall, N., Page, N., Briand, J.-P., Cuervo, A.M., and Muller, S. (2015). Modulation of deregulated chaperone-mediated autophagy by a phosphopeptide. *Autophagy* *11*, 472–486.
- 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.
- Mao, K., Wang, K., Liu, X., and Klionsky, D.J. (2013). The scaffold protein Atg11 recruits fission machinery to drive selective mitochondria degradation by autophagy. *Dev. Cell* *26*, 9–18.
- Markovitz, N.S., Baunoch, D., and Roizman, B. (1997). The range and distribution of murine central nervous system cells infected with the gamma(1)34.5- mutant of herpes simplex virus 1. *J. Virol.* *71*, 5560–5569.
- Martinez, J., Almendinger, J., Oberst, A., Ness, R., Dillon, C.P., Fitzgerald, P., Hengartner, M.O., and Green, D.R. (2011). Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *108*, 17396–17401.
- 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.
- Martinez, J., Cunha, L.D., Park, S., Yang, M., Lu, Q., Orchard, R., Li, Q.-Z., Yan, M., Janke, L., Guy, C., et al. (2016). Noncanonical autophagy inhibits the autoinflammatory, lupus-like response to dying cells. *Nature*.



- Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Kaushik, S., Massey, A.C., Mazzulli, J., Mosharov, E.V., Hodara, R., Fredenburg, R., Wu, D.-C., Follenzi, A., et al. (2008). Dopamine-modified alpha-synuclein blocks chaperone-mediated autophagy. *J. Clin. Invest.* *118*, 777–788.
- Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C.A., Sou, Y.-S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., et al. (2010). PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy. *J. Cell Biol.* *189*, 211–221.
- 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.
- Matsuura, A., Tsukada, M., Wada, Y., and Ohsumi, Y. (1997). Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* *192*, 245–250.
- 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. *Molecular Cell* *57*, 39–54.
- 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.
- Meiling-Wesse, K., Barth, H., Voss, C., Eskelinen, E.-L., Epple, U.D., and Thumm, M. (2004). Atg21 Is Required for Effective Recruitment of Atg8 to the Preautophagosomal Structure during the Cvt Pathway. *J. Biol. Chem.* *279*, 37741–37750.
- Ménétreay, J., Bahloul, A., and Houdusse, A. (2006). Une myosine à contre-sens. *M/S: médecine sciences* *22*, 120–122.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998a). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* *395*, 395–398.
- Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (1998b). A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* *273*, 33889–33892.
- Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *EMBO J.* *18*, 3888–3896.

- 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.
- 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.
- Mostowy, S., Sancho-Shimizu, V., Hamon, M.A., Simeone, R., Brosch, R., Johansen, T., and Cossart, P. (2011). p62 and NDP52 proteins target intracytosolic *Shigella* and *Listeria* to different autophagy pathways. *J. Biol. Chem.* 286, 26987–26995.
- Motley, A.M., Nuttall, J.M., and Hetteima, E.H. (2012). Pex3-anchored Atg36 tags peroxisomes for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 31, 2852–2868.
- 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.
- Narendra, D., Kane, L.A., Hauser, D.N., Fearnley, I.M., and Youle, R.J. (2010a). p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* 6, 1090–1106.
- Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.-F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., and Youle, R.J. (2010b). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 8, e1000298.
- 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.
- Nemoto, T., Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Minematsu-Ikeguchi, N., Yokota, M., Ohsumi, M., Ueno, T., and Kominami, E. (2003). The mouse APG10 homologue, an E2-like enzyme for Apg12p conjugation, facilitates MAP-LC3 modification. *J. Biol. Chem.* 278, 39517–39526.
- Newman, A.C., Scholefield, C.L., Kemp, A.J., Newman, M., McIver, E.G., Kamal, A., and Wilkinson, S. (2012). TBK1 Kinase Addiction in Lung Cancer Cells Is Mediated via Autophagy of Tax1bp1/NDP52 and Non-Canonical NF- $\kappa$ B Signalling. *PLOS ONE* 7, e50672.
- Newton, H.J., Kohler, L.J., McDonough, J.A., Temoche-Diaz, M., Crabill, E., Hartland, E.L., and Roy, C.R. (2014). A Screen of *Coxiella burnetii* Mutants Reveals Important Roles for Dot/Icm Effectors and Host Autophagy in Vacuole Biogenesis. *PLoS Pathog* 10.
- Nice, D.C., Sato, T.K., Stromhaug, P.E., Emr, S.D., and Klionsky, D.J. (2002). Cooperative binding of the cytoplasm to vacuole targeting pathway proteins, Cvt13 and Cvt20, to

phosphatidylinositol 3-phosphate at the pre-autophagosomal structure is required for selective autophagy. *J. Biol. Chem.* 277, 30198–30207.

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.

Novikoff, A.B. (1959). The proximal tubule cell in experimental hydronephrosis. *J Biophys Biochem Cytol* 6, 136–138.

Novikoff, A.B., and Essner, E. (1962). Cytolysosomes and mitochondrial degeneration. *J. Cell Biol.* 15, 140–146.

Novikoff, P.M., Novikoff, A.B., Quintana, N., and Hauw, J.J. (1971). Golgi apparatus, GERL, and lysosomes of neurons in rat dorsal root ganglia, studied by thick section and thin section cytochemistry. *J. Cell Biol.* 50, 859–886.

Nowag, H., Guhl, B., Thriene, K., Romao, S., Ziegler, U., Dengjel, J., and Münz, C. (2014). Macroautophagy Proteins Assist Epstein Barr Virus Production and Get Incorporated Into the Virus Particles. *EBioMedicine* 1, 116–125.

Obara, K., Sekito, T., Niimi, K., and Ohsumi, Y. (2008). The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *J. Biol. Chem.* 283, 23972–23980.

Ogawa, M., Yoshimori, T., Suzuki, T., Sagara, H., Mizushima, N., and Sasakawa, C. (2005). Escape of Intracellular *Shigella* from Autophagy. *Science* 307, 727–731.

Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Kobayashi, T., Mimuro, H., Fukumatsu, M., Kiga, K., Piao, Z., Ashida, H., Yoshida, M., Kakuta, S., et al. (2011). A Tecpr1-Dependent Selective Autophagy Pathway Targets Bacterial Pathogens. *Cell Host & Microbe* 9, 376–389.

Okatsu, K., Saisho, K., Shimanuki, M., Nakada, K., Shitara, H., Sou, Y.-S., Kimura, M., Sato, S., Hattori, N., Komatsu, M., et al. (2010). p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes Cells* 15, 887–900.

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.
- Orvedahl, A., Sumpter, R., Xiao, G., Ng, A., Zou, Z., Tang, Y., Narimatsu, M., Gilpin, C., Sun, Q., Roth, M., et al. (2011). Image-Based Genome-Wide siRNA Screen Identifies Selective Autophagy Factors. *Nature* 480, 113–117.
- 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., Øvervatn, 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.
- Papinski, D., Schuschnig, M., Reiter, W., Wilhelm, L., Barnes, C.A., Maiolica, A., Hansmann, I., Pfaffenwimmer, T., Kijanska, M., Stoffel, I., et al. (2014). Early steps in autophagy depend on direct phosphorylation of Atg9 by the Atg1 kinase. *Mol. Cell* 53, 471–483.
- 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.
- Pebody, R.G., Andrews, N., Brown, D., Gopal, R., Melker, H. de, François, G., Gatcheva, N., Hellenbrand, W., Jokinen, S., Klavs, I., et al. (2004). The seroepidemiology of herpes simplex virus type 1 and 2 in Europe. *Sex Transm Infect* 80, 185–191.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E.F., Meijer, A.J., and Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* 275, 992–998.
- Petkova, D. (2015). Étude du rôle de récepteurs autophagiques lors de l'infection par le virus de la rougeole (Lyon 1).
- Pfeifer, U. (1977). Inhibition by insulin of the physiological autophagic breakdown of cell organelles. *Acta Biol. Med. Ger.* 36, 1691–1694.
- Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M., and Spang, A. (2010). Identification of the Switch in Early-to-Late Endosome Transition. *Cell* 141, 497–508.
- Prentice, E., Jerome, W.G., Yoshimori, T., Mizushima, N., and Denison, M.R. (2004). Coronavirus replication complex formation utilizes components of cellular autophagy. *J. Biol. Chem.* 279, 10136–10141.

- Proikas-Cezanne, T., and Robenek, H. (2011). Freeze-fracture replica immunolabelling reveals human WIPI-1 and WIPI-2 as membrane proteins of autophagosomes. *J. Cell. Mol. Med.* *15*, 2007–2010.
- 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., Takacs, Z., Dönnies, P., and Kohlbacher, O. (2015). WIPI proteins: essential PtdIns3P effectors at the nascent autophagosome. *J Cell Sci* *128*, 207–217.
- Pryor, P.R., Mullock, B.M., Bright, N.A., Lindsay, M.R., Gray, S.R., Richardson, S.C.W., Stewart, A., James, D.E., Piper, R.C., and Luzio, J.P. (2004). Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events. *EMBO Rep* *5*, 590–595.
- Puri, C., Renna, M., Bento, C.F., Moreau, K., and Rubinsztein, D.C. (2013). Diverse Autophagosome Membrane Sources Coalesce in Recycling Endosomes. *Cell* *154*, 1285–1299.
- Radtke, A.L., and O’Riordan, M.X.D. (2008). Homeostatic maintenance of pathogen-containing vacuoles requires TBK1-dependent regulation of aquaporin-1. *Cell. Microbiol.* *10*, 2197–2207.
- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., and Rubinsztein, D.C. (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* *12*, 747–757.
- Reggiori, F., Tucker, K.A., Stromhaug, P.E., and Klionsky, D.J. (2004). The Atg1-Atg13 Complex Regulates Atg9 and Atg23 Retrieval Transport from the Pre-Autophagosomal Structure. *Developmental Cell* *6*, 79–90.
- Reggiori, F., Monastyrska, I., Verheije, M.H., Cali, T., Ulasli, M., Bianchi, S., Bernasconi, R., de Haan, C.A.M., and Molinari, M. (2010). Coronaviruses Hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. *Cell Host Microbe* *7*, 500–508.
- Renna, M., Schaffner, C., Winslow, A.R., Menzies, F.M., Peden, A.A., Floto, R.A., and Rubinsztein, D.C. (2011). Autophagic substrate clearance requires activity of the syntaxin-5 SNARE complex. *J Cell Sci* *124*, 469–482.
- Réz, G., and Meldolesi, J. (1980). Freeze-fracture of drug-induced autophagocytosis in the mouse exocrine pancreas. *Lab. Invest.* *43*, 269–277.

- Richetta, C., Grégoire, I.P., Verlhac, P., Azocar, O., Baguet, J., Flacher, M., Tangy, F., Roubardin-Combe, C., and Faure, M. (2013). Sustained Autophagy Contributes to Measles Virus Infectivity. *PLoS Pathog* 9, e1003599.
- Richter, B., Sliter, D.A., Herhaus, L., Stolz, A., Wang, C., Beli, P., Zaffagnini, G., Wild, P., Martens, S., Wagner, S.A., et al. (2016). Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*
- Roberts, P., Moshitch-Moshkovitz, S., Kvam, E., O'Toole, E., Winey, M., and Goldfarb, D.S. (2003). Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* 14, 129–141.
- Rocha, N., Kuijl, C., Kant, R. van der, Janssen, L., Houben, D., Janssen, H., Zwart, W., and Neefjes, J. (2009). Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7–RILP–p150Glued and late endosome positioning. *J Cell Biol* 185, 1209–1225.
- Romano, P.S., Gutierrez, M.G., Berón, W., Rabinovitch, M., and Colombo, M.I. (2007). The autophagic pathway is actively modulated by phase II *Coxiella burnetii* to efficiently replicate in the host cell. *Cellular Microbiology* 9, 891–909.
- Russell, R.C., Tian, Y., Yuan, H., Park, H.W., Chang, Y.-Y., Kim, J., Kim, H., Neufeld, T.P., Dillin, A., and Guan, K.-L. (2013). ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat. Cell Biol.* 15, 741–750.
- Rusten, T.E., and Stenmark, H. (2009). How do ESCRT proteins control autophagy? *Journal of Cell Science* 122, 2179–2183.
- 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.
- Sakai, Y., Koller, A., Rangell, L.K., Keller, G.A., and Subramani, S. (1998). Peroxisome degradation by microautophagy in *Pichia pastoris*: identification of specific steps and morphological intermediates. *J. Cell Biol.* 141, 625–636.
- Sakoh-Nakatogawa, M., Matoba, K., Asai, E., Kirisako, H., Ishii, J., Noda, N.N., Inagaki, F., Nakatogawa, H., and Ohsumi, Y. (2013). Atg12-Atg5 conjugate enhances E2 activity of Atg3 by rearranging its catalytic site. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 433–439.
- Sancak, Y., Peterson, T.R., Shaul, Y.D., Lindquist, R.A., Thoreen, C.C., Bar-Peled, L., and Sabatini, D.M. (2008). The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science* 320, 1496–1501.

- Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M. (2010). Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids. *Cell* *141*, 290–303.
- 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.
- Santonico, E., Mattioni, A., Panni, S., Belleudi, F., Mattei, M., Torrisi, M.R., Cesareni, G., and Castagnoli, L. (2015). RNF11 is a GGA protein cargo and acts as a molecular adaptor for GGA3 ubiquitination mediated by ITCH. *Oncogene* *34*, 3377–3390.
- Sato, M., and Sato, K. (2011). Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science* *334*, 1141–1144.
- Schweers, R.L., Zhang, J., Randall, M.S., Loyd, M.R., Li, W., Dorsey, F.C., Kundu, M., Opferman, J.T., Cleveland, J.L., Miller, J.L., et al. (2007). NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *104*, 19500–19505.
- Scott, S.V., Guan, J., Hutchins, M.U., Kim, J., and Klionsky, D.J. (2001). Cvt19 is a receptor for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway. *Mol. Cell* *7*, 1131–1141.
- Seglen, P.O., Gordon, P.B., and Holen, I. (1990). Non-selective autophagy. *Semin. Cell Biol.* *1*, 441–448.
- Shembade, N., Parvatiyar, K., Harhaj, N.S., and Harhaj, E.W. (2009). The ubiquitin-editing enzyme A20 requires RNF11 to downregulate NF-kappaB signalling. *EMBO J.* *28*, 513–522.
- Shintani, T., Mizushima, N., Ogawa, Y., Matsuura, A., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). Apg10p, a novel protein-conjugating enzyme essential for autophagy in yeast. *EMBO J.* *18*, 5234–5241.
- 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.
- Smith, A.M., Sewell, G.W., Levine, A.P., Chew, T.S., Dunne, J., O’Shea, N.R., Smith, P.J., Harrison, P.J., Macdonald, C.M., Bloom, S.L., et al. (2015). Disruption of macrophage pro-inflammatory cytokine release in Crohn’s disease is associated with reduced optineurin expression in a subset of patients. *Immunology* *144*, 45–55.
- Strømhaug, P.E., Reggiori, F., Guan, J., Wang, C.-W., and Klionsky, D.J. (2004). Atg21 Is a Phosphoinositide Binding Protein Required for Efficient Lipidation and Localization of Atg8 during Uptake of Aminopeptidase I by Selective Autophagy. *Mol Biol Cell* *15*, 3553–3566.

- Sun, Q., Westphal, W., Wong, K.N., Tan, I., and Zhong, Q. (2010). Rubicon controls endosome maturation as a Rab7 effector. *PNAS* *107*, 19338–19343.
- Suzuki, K., Kondo, C., Morimoto, M., and Ohsumi, Y. (2010). Selective transport of alpha-mannosidase by autophagic pathways: identification of a novel receptor, Atg34p. *J. Biol. Chem.* *285*, 30019–30025.
- Sweeney, H.L., and Houdusse, A. (2010). Myosin VI rewrites the rules for myosin motors. *Cell* *141*, 573–582.
- Tabata, K., Matsunaga, K., Sakane, A., Sasaki, T., Noda, T., and Yoshimori, T. (2010). Rubicon and PLEKHM1 Negatively Regulate the Endocytic/Autophagic Pathway via a Novel Rab7-binding Domain. *Molecular Biology of the Cell* *21*, 4162.
- Takikita, S., Myerowitz, R., Zaal, K., Raben, N., and Plotz, P.H. (2009). Murine muscle cell models for Pompe disease and their use in studying therapeutic approaches. *Mol. Genet. Metab.* *96*, 208–217.
- Tallóczy, Z., Herbert Virgin, I., and Levine, B. (2006). PKR-Dependent Xenophagic 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.L., Blanz, J., von Figura, K., and Saftig, P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature* *406*, 902–906.
- Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Ueno, T., and Kominami, E. (2001). The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J. Biol. Chem.* *276*, 1701–1706.
- Tanida, I., Tanida-Miyake, E., Komatsu, M., Ueno, T., and Kominami, E. (2002). Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3, and facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p. *J. Biol. Chem.* *277*, 13739–13744.
- Tanida, I., Ueno, T., and Kominami, E. (2004). Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *J. Biol. Chem.* *279*, 47704–47710.
- Tattoli, I., Sorbara, M.T., Yang, C., Tooze, S.A., Philpott, D.J., and Girardin, S.E. (2013). *Listeria* phospholipases subvert host autophagic defenses by stalling pre-autophagosomal structures. *EMBO J.* *32*, 3066–3078.



- Teter, S.A., Eggerton, K.P., Scott, S.V., Kim, J., Fischer, A.M., and Klionsky, D.J. (2001). Degradation of lipid vesicles in the yeast vacuole requires function of Cvt17, a putative lipase. *J. Biol. Chem.* 276, 2083–2087.
- Thompson, L.M., Aiken, C.T., Kaltenbach, L.S., Agrawal, N., Illes, K., Khoshnan, A., Martinez-Vincente, M., Arrasate, M., O'Rourke, J.G., Khashwji, H., et al. (2009). IKK phosphorylates Huntingtin and targets it for degradation by the proteasome and lysosome. *J. Cell Biol.* 187, 1083–1099.
- 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.
- Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333, 169–174.
- Tucker, K.A., Reggiori, F., Dunn, W.A., and Klionsky, D.J. (2003). Atg23 is essential for the cytoplasm to vacuole targeting pathway and efficient autophagy but not pexophagy. *J. Biol. Chem.* 278, 48445–48452.
- 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.
- Vander Haar, E., Lee, S.-I., Bandhakavi, S., Griffin, T.J., and Kim, D.-H. (2007). Insulin signalling to mTOR mediated by the Akt/PKB substrate PRAS40. *Nat. Cell Biol.* 9, 316–323.
- Vasselon, T., Mounier, J., Hellio, R., and Sansonetti, P.J. (1992). Movement along actin filaments of the perijunctional area and de novo polymerization of cellular actin are required for *Shigella flexneri* colonization of epithelial Caco-2 cell monolayers. *Infect. Immun.* 60, 1031–1040.
- Vazeille, E., Buisson, A., Bringer, M.-A., Goutte, M., Ouchchane, L., Hugot, J.-P., de Vallée, A., Barnich, N., Bommelaer, G., and Darfeuille-Michaud, A. (2015). Monocyte-derived macrophages from Crohn's disease patients are impaired in the ability to control intracellular

adherent-invasive *Escherichia coli* and exhibit disordered cytokine secretion profile. *J Crohns Colitis* 9, 410–420.

Velikkakath, A.K.G., Nishimura, T., Oita, E., Ishihara, N., and Mizushima, N. (2012). Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol. Biol. Cell* 23, 896–909.

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.

Vives-Bauza, C., Zhou, C., Huang, Y., Cui, M., de Vries, R.L.A., Kim, J., May, J., Tocilescu, M.A., Liu, W., Ko, H.S., et al. (2010). PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 378–383.

Wang, X., Gao, Y., Tan, J., Devadas, K., Ragupathy, V., Takeda, K., Zhao, J., and Hewlett, I. (2012). HIV-1 and HIV-2 infections induce autophagy in Jurkat and CD4+ T cells. *Cellular Signalling* 24, 1414–1419.

Wang, Y., Martinez-Vicente, M., Krüger, U., Kaushik, S., Wong, E., Mandelkow, E.-M., Cuervo, A.M., and Mandelkow, E. (2009). Tau fragmentation, aggregation and clearance: the dual role of lysosomal processing. *Hum. Mol. Genet.* 18, 4153–4170.

Warnecke, D., Erdmann, R., Fahl, A., Hube, B., Müller, F., Zank, T., Zähringer, U., and Heinz, E. (1999). Cloning and functional expression of UGT genes encoding sterol glucosyltransferases from *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida albicans*, *Pichia pastoris*, and *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 274, 13048–13059.

Wartosch, L., Günesdogan, U., Graham, S.C., and Luzio, J.P. (2015). Recruitment of VPS33A to HOPS by VPS16 Is Required for Lysosome Fusion with Endosomes and Autophagosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)* 16, 727.

Watanabe, Y., Kobayashi, T., Yamamoto, H., Hoshida, H., Akada, R., Inagaki, F., Ohsumi, Y., and Noda, N.N. (2012). Structure-based analyses reveal distinct binding sites for Atg2 and phosphoinositides in Atg18. *J. Biol. Chem.* 287, 31681–31690.

Wei, Y., Pattingre, S., Sinha, S., Bassik, M., and Levine, B. (2008). JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy. *Mol. Cell* 30, 678–688.

Wells, A.L., Lin, A.W., Chen, L.Q., Safer, D., Cain, S.M., Hasson, T., Carragher, B.O., Milligan, R.A., and Sweeney, H.L. (1999). Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* 401, 505–508.

- 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.
- Winchell, C.G., Graham, J.G., Kurten, R.C., and Voth, D.E. (2014). *Coxiella burnetii* Type IV Secretion-Dependent Recruitment of Macrophage Autophagosomes. *Infect Immun* 82, 2229–2238.
- Wurmser, A.E., and Emr, S.D. (2002). Novel PtdIns(3)P-binding protein Etf1 functions as an effector of the Vps34 PtdIns 3-kinase in autophagy. *J. Cell Biol.* 158, 761–772.
- Xie, X., Li, F., Wang, Y., Wang, Y., Lin, Z., Cheng, X., Liu, J., Chen, C., and Pan, L. (2015). Molecular basis of ubiquitin recognition by the autophagy receptor CALCOCO2. *Autophagy* 11, 1775–1789.
- Yang, Z., Huang, J., Geng, J., Nair, U., and Klionsky, D.J. (2006). Atg22 recycles amino acids to link the degradative and recycling functions of autophagy. *Mol. Biol. Cell* 17, 5094–5104.
- Yao, Z., Delorme-Axford, E., Backues, S.K., and Klionsky, D.J. (2015). Atg41/Icy2 regulates autophagosome formation. *Autophagy* 11, 2288–2299.
- Yen, W.-L., Legakis, J.E., Nair, U., and Klionsky, D.J. (2007). Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9. *Mol. Biol. Cell* 18, 581–593.
- Yen, W.-L., Shintani, T., Nair, U., Cao, Y., Richardson, B.C., Li, Z., Hughson, F.M., Baba, M., and Klionsky, D.J. (2010). The conserved oligomeric Golgi complex is involved in double-membrane vesicle formation during autophagy. *J. Cell Biol.* 188, 101–114.
- 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., and Klionsky, D.J. (2005). Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *Mol. Biol. Cell* 16, 1593–1605.
- 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.
- Young, A.R.J., Chan, E.Y.W., Hu, X.W., Köchl, R., Crawshaw, S.G., High, S., Hailey, D.W., Lippincott-Schwartz, J., and Tooze, S.A. (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J. Cell. Sci.* 119, 3888–3900.

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.

Zalckvar, E., Berissi, H., Mizrachy, L., Idelchuk, Y., Koren, I., Eisenstein, M., Sabanay, H., Pinkas-Kramarski, R., and Kimchi, A. (2009). DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO Rep.* 10, 285–292.

Zhao, Z., Thackray, L.B., Miller, B.C., Lynn, T.M., Becker, M.M., Ward, E., Mizushima, N.N., Denison, M.R., and Virgin, H.W., 4th (2007). Coronavirus replication does not require the autophagy gene ATG5. *Autophagy* 3, 581–585.

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.

Zhirnov, O.P., and Klenk, H.D. (2013). Influenza A virus proteins NS1 and hemagglutinin along with M2 are involved in stimulation of autophagy in infected cells. *J. Virol.* 87, 13107–13114.

Zhirnov, O.P., Konakova, T.E., Wolff, T., and Klenk, H.-D. (2002). NS1 protein of influenza A virus down-regulates apoptosis. *J. Virol.* 76, 1617–1625.

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, Z., Jiang, X., Liu, D., Fan, Z., Hu, X., Yan, J., Wang, M., and Gao, G.F. (2009). Autophagy is involved in influenza A virus replication. *Autophagy* 5, 321–328.

WHO | Global update on the health sector response to HIV, 2014.



# **Annexes**



# Annexe I

Matériel et méthodes correspondant à la partie résultats « Rôle de RNF11 dans la maturation des autophagosomes (résultats supplémentaires, non publiés) »

## Cellules

Des cellules HeLa et 293T ont été cultivées en DMEN supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal. Les lignées HeLa exprimant LC3 fusionnée à la GFP ou au tandem GFP-RFP ont été cultivées en DMEN supplémenté avec 10% de sérum de veau foetal ainsi que de 50µg/mL de généticine.

## siRNA

Les siRNAs suivant ont été obtenus chez Life Technologie (référence 1299001): siCTRL (Negative Control MED GC#3, référence12935-113), siNDP52 (HSS115635); siRNF11 (HSS 178260). Les siRNAs suivant ont été obtenus chez Dharmacon: si OPTN (L-016269-00-0005) et siSQSTM1 (L-010230-00-0005). Les transfections ont été réalisées avec la Lipofectamine RNAi max de chez Life Technologies en suivant les instructions du fabricant.

## Anticorps

Les anticorps primaires utilisés sont : anti-Flag (F1804), anti-GST (A7340), anti-NDP52 (HPA023195), anti-LC3B (L7543), anti-actin (A2066) de chez Sigma-Aldrich, anti-Ubiquitine (clone FK2 Millipore, 04-263), anti-SQSTM1/p62 (Santa Cruz, sc-28359), anti-RNF11 (Abcam ab154831) et anti-Salmonella (Thermo Scientific PA1 7244). Les anticorps secondaires utilisés sont : anti-souris conjugué à la Peroxydase (A2304) de chez Sigma-Aldrich et anti-lapin conjugué à la Peroxydase (NA9340) de chez GE Healthcare pour les westerns blots et anti-lapin conjugué à Alexa Fluor 568 (A11011), anti-souris conjugué à Alexa Fluor 568 (A11031), anti-souris conjugué à Alexa Fluor 488 (A21202) and anti-lapin conjugué à Alexa Fluor 647 (A31573) de chez Molecular Probes pour la microscopie confocale.

## Crible double hydride

Le criblage des interactions moléculaires est effectué dans des levures suivant le protocole Yeastmaker Yeast Transformation System 2 (Clontech). Une première transformation par la méthode TE/LiAC/PEG de levures Y2H Gold permet l'intégration du plasmide pACT2-RNF11. Ces levures sont ensuite transformées par un plasmide pGBKT7 de la banque de protéines de l'autophagie. L'intégration des plasmides pGBKT7 est vérifiée par culture des levures sur milieu solide SD/-W. La visualisation des interactions entre la protéine RNF11 et ses proies se fait sur milieu SD/-L-W-H.

## Microscopie confocale

Toutes les images sont acquises sur un confocal Zeiss LSM710 avec un objectif plan apochromat x40. Les quantifications et analyses sont effectuées avec ImageJ.

## Infection avec *Salmonella* Typhimurium

Les infections sont réalisées comme précédemment décrit (Verlhac et al., 2015).

## Purification sur sépharose par co-affinité

Les purifications sont réalisées comme précédemment décrit (Verlhac et al., 2015).



## **Annexe II**

Commentaire publié dans Autophagy

« Dual function of CALCOCO2 during xenophagy »

Pauline Verlhac, Christophe Viret & Mathias Faure



## Dual function of CALCOCO2/NDP52 during xenophagy

Pauline Verlhac, Christophe Viret & Mathias Faure

To cite this article: Pauline Verlhac, Christophe Viret & Mathias Faure (2015) Dual function of CALCOCO2/NDP52 during xenophagy, *Autophagy*, 11:6, 965-966, DOI: [10.1080/15548627.2015.1046672](https://doi.org/10.1080/15548627.2015.1046672)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2015.1046672>



Accepted author version posted online: 22 May 2015.  
Published online: 22 May 2015.



Submit your article to this journal [↗](#)



Article views: 332



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)



Citing articles: 1 View citing articles [↗](#)

## Dual function of CALCOCO2/NDP52 during xenophagy

Pauline Verlhac,<sup>1,2,3,4,5</sup> Christophe Viret,<sup>1,2,3,4,5</sup> and Mathias Faure<sup>1,2,3,4,5,\*</sup>

<sup>1</sup>CIRI; International Center for Infectiology Research; Université de Lyon; Lyon, France; <sup>2</sup>Inserm; U1111; Lyon, France; <sup>3</sup>CNRS, UMR5308; Lyon, France;

<sup>4</sup>Ecole Normale Supérieure de Lyon; Lyon, France; <sup>5</sup>Université Lyon 1; Centre International de Recherche en Infectiologie; Lyon, France

**D**uring xenophagy, pathogens are selectively targeted by autophagy receptors to the autophagy machinery for their subsequent degradation. In infected cells, the autophagy receptor CALCOCO2/NDP52 targets *Salmonella* Typhimurium to the phagophore membrane by concomitantly interacting with LC3C and binding to ubiquitinated cytosolic bacteria or to LGALS8/GALECTIN 8 adsorbed on damaged vacuoles that contain bacteria. We recently reported that in addition, CALCOCO2 is also necessary for the maturation step of *Salmonella* Typhimurium-containing autophagosomes. Interestingly, the role of CALCOCO2 in maturation is independent of its role in targeting, as these functions rely on distinct binding domains and protein partners. Indeed, to mediate autophagosome maturation CALCOCO2 binds on the one hand to LC3A, LC3B, or GABARAPL2, and on the other hand to MYO6/MYOSIN VI, whereas the interaction with LC3C is dispensable. Therefore, the autophagy receptor CALCOCO2 plays a dual function during xenophagy first by targeting bacteria to nascent autophagosomes and then by promoting autophagosome maturation in order to destroy bacteria.

Xenophagy is the process referring to the selective degradation of intracellular microorganisms by autophagy. Xenophagy is a very potent intrinsic cellular line of defense to fight pathogens and requires first the detection and targeting of microorganisms to growing phagophores prior to autophagosome maturation leading to microbial destruction. The targeting step can be achieved by cytosolic autophagy receptors, which bind on the one hand to

the pathogen and on the other hand to LC3, a phagophore membrane-anchored protein. Once entrapped within an autophagosome, bacteria can survive or escape, unless they are rapidly destroyed. Therefore, autophagosome maturation allows the discharge of lysosomal enzymes in autolysosomes, allowing destruction of the bacteria. It is, however, not well known how autophagosomes mature, especially in the context of xenophagy. Recently, the endosomal membrane-bound protein TOM1 and the dynein motor MYO6 have been both shown to be implicated in the transport of endosomes into the vicinity of autophagosomes in order to ensure fusion of autophagosomes with vesicles of the endo/lysosomal pathway. Moreover, the concomitant absence of 3 autophagy receptors, CALCOCO2, TAX1BP1/T6BP, and OPTN/OPTINEURIN, impairs autophagosome biogenesis and maturation. As CALCOCO2 was already shown to have a MYO6 binding domain, we wondered whether CALCOCO2 could also be implicated in autophagosome maturation per se to promote bacterial degradation.

We first observed that the binding site of CALCOCO2 to MYO6 was required for cells to control *Salmonella* Typhimurium intracellular growth. Nevertheless, when the binding of CALCOCO2 to MYO6 was abolished, bacteria were still efficiently targeted to autophagosomes, but yet still able to replicate to levels similar to the one observed in CALCOCO2-depleted cells. Strikingly, in noninfected cells the absence of CALCOCO2 perturbs the autophagy flux, resulting in a strong accumulation of autophagosomes, suggesting a positive role for CALCOCO2 in the autophagosome-lysosome fusion process. Surprisingly, we found that

\*Correspondence to: Mathias Faure; Email: mathias.faure@inserm.fr

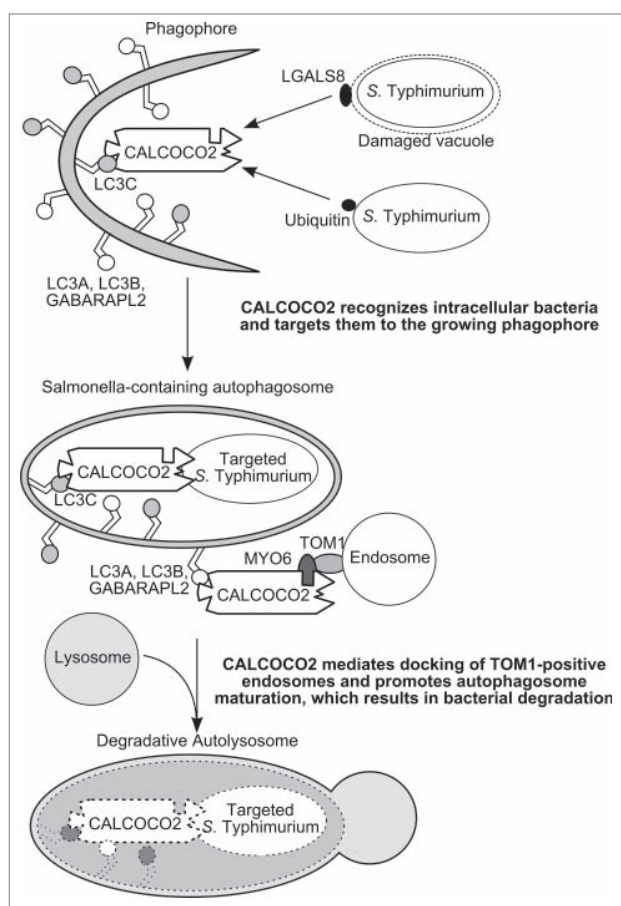
Submitted: 04/10/2015

Revised: 04/23/2015

Accepted: 04/27/2015

<http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2015.1046672>

Punctum to: Verlhac P, et al. Autophagy receptor NDP52 regulates pathogen-containing autophagosome maturation. *Cell Host Microbe* 2015; 17:515–25.



**Figure 1.** Schematic model for the dual role of CALCOCO2 in xenophagy. CALCOCO2 targets bacteria to the phagophore through its LC3C binding site (CLIR motif), and, independently, regulates autophagosome maturation through its LC3A, LC3B, or GABARAPL2 binding site (LIR-like motif) and its MYO6 interacting region.

CALCOCO2 binding to LC3C, through its noncanonical LC3 interacting region (CLIR), is not involved in the maturation of autophagosomes. Instead, we identified another motif in the primary sequence of CALCOCO2, which mediates binding to at least LC3A, LC3B, and GABARAPL2 (but not LC3C). We referred to this motif as “LIR-like” as it differs from the canonical LIR motif by the absence of a hydrophobic residue in position X<sub>3</sub>. This LIR-like motif was necessary for autophagosome maturation, along with the domain of CALCOCO2 responsible for its binding to MYO6. Eventually, mutation of this LIR-like motif also resulted in an increased *Salmonella* Typhimurium intracellular proliferation, whereas bacteria were still efficiently targeted within

nondegradative autophagosomes. Interestingly, the absence of the autophagy receptor OPTN also led to the accumulation of nondegradative autophagosomes, suggesting that other autophagy receptors could share CALCOCO2 dual functions in xenophagy.

Having autophagy receptors ensuring both targeting and degradation of pathogens could be an important evolutionary advantage against infections. Indeed, this mechanism could help to reduce the delay necessary for maturation, thus avoiding adaptation of the pathogen to its new environment (as proposed for *Coxiella burnetii*, *Listeria monocytogenes*, and *Legionella pneumophila*) or its escape from the autophagosome. Conversely, pathogens could avoid autophagy entrapment

or autophagic degradation by targeting CALCOCO2 or any other autophagy receptors, which could play similar roles. For instance Chikungunya virus was reported to target CALCOCO2 in human cells leading to increased virus replication. Nevertheless, redundancy among autophagy receptors could also ensure a selective immune advantage against pathogens targeting any one of these receptors.

Our results and those from others suggest for now that CALCOCO2 serves as a docking platform for MYO6-bound endosomes, thus facilitating autophagosome maturation (Fig. 1). How this action is coordinated with CALCOCO2 directing pathogens to the phagophore membranes remains unclear. During xenophagy against *Salmonella* Typhimurium, CALCOCO2 interaction first with LC3C is necessary to further recruit other ATG8 orthologs and ensure the final degradation of bacteria. Since the LIR-like motifs bind several ATG8s, whereas the CLIR motif only mediates binding to LC3C, it is possible that binding of CALCOCO2 to LC3C induces conformational changes and uncovers the LIR-like motif that can be then engaged with other ATG8 orthologs to trigger autophagosome maturation. Moreover, it is still unclear whether the action of CALCOCO2 in autophagosome maturation is coordinated with other partners, such as STX17/SYNTAXIN 17, which is recruited on the external membrane of autophagosomes and regulate fusion with lysosomes.

Our findings reveal a new role for the autophagy receptor CALCOCO2 in autophagosome maturation, unravelling another function for CALCOCO2 in cell autonomous defense against pathogens: CALCOCO2 not only targets pathogens to phagophore membranes, but also regulates subsequent maturation of pathogen-containing autophagosomes, thus assuring efficient degradation of autophagy-targeted pathogens.

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

## **Annexe III**

Commentaire publié dans Médecine Science

« NDP52, autophagie et pathogènes

*Et le combat cessa faute de combattants »*

**Pauline Verlhac, Christophe Viret & Mathias Faure**

## NDP52, autophagie et pathogènes

« Et le combat cessa faute de combattants »

Pauline Verlhac<sup>1-5</sup>, Christophe Viret<sup>1-5</sup>, Mathias Faure<sup>1-5\*</sup>

> Afin de lutter contre les microorganismes envahissant leur cytoplasme, les cellules sont dotées d'une arme de destruction sélective, l'autophagie. En effet, utilisée par la cellule pour éliminer et recycler ses propres constituants défectueux ou en fin d'activité biologique, l'autophagie cible également des pathogènes intracellulaires afin de les dégrader ; l'autophagie est ainsi indispensable non seulement pour éviter le développement de maladies infectieuses, mais également pour maintenir l'équilibre avec une flore commensale essentielle au développement et au fonctionnement de l'organisme. La compréhension moléculaire du contrôle des infections par l'autophagie progresse chaque jour, notamment avec l'identification de la protéine NDP52 (*nuclear dot protein 52 kDa*) qui contribue doublement à la lutte antimicrobienne : en acheminant sélectivement les bactéries vers l'autophagie et en promouvant leur destruction une fois piégées dans les autophagosomes. Dans les années 1960, Christian de Duve observe que des composants propres à la cellule sont capturés dans des vésicules à double membrane pour y être à terme dégradés [1]. Il nomme ces vésicules autophagosomes et le processus autophagie (littéralement « se manger »). La dégradation des composants emprisonnés dans l'autophagosome est assurée lorsque celui-ci fusionne avec une autre vésicule spécialisée, un lysosome (organite également découvert par C. de Duve en 1955). Plusieurs travaux décrivent par la suite l'importance de l'autophagie pour l'homéostasie

cellulaire, et, dans les années 1980, il est observé la formation d'autophagosomes lors de l'infection cellulaire par un micro-organisme, la bactérie *Rickettsia* [2]. La destruction par autophagie d'agents infectieux, ou xénophagie (« manger ce qui est étranger ») [3, 4], ne sera formellement démontrée qu'en 2004, à l'encontre de *Mycobacterium tuberculosis* et du streptocoque de groupe A, grâce à l'avènement d'outils moléculaires suffisamment précis pour l'étude fine de l'autophagie [5, 6].

### Les étapes du processus de macroautophagie : du phagophore à l'autolysosome

La macroautophagie, appelée communément autophagie, s'articule en trois phases majeures [3]. La première étape génère une membrane incurvée, le phagophore. Les extrémités de ce dernier s'étendent ensuite par l'ajout de petites vésicules membranaires. Lors de cette étape d'élongation, la vésicule autophagique en formation va attraper des composants cytosoliques, appelés cargos ou substrats, destinés au recyclage (Figure 1). Dans les conditions d'un stress ressenti de manière généralisée par la cellule, comme une absence de nutriments dans l'environnement, les cargos peuvent être séquestrés de manière aléatoire par l'autophagie. Cependant, lors de stress localisés au sein de la cellule, comme celui que représente la présence d'agents infectieux, les substrats autophagiques sont sélectivement séquestrés. Cette autophagie sélective est assurée par des protéines cytosoliques appelées

<sup>1</sup> CIRI, centre international de recherche en infectiologie, université de Lyon, 69007 Lyon, France ;

<sup>2</sup> Inserm U1111, 69007 Lyon, France ;

<sup>3</sup> CNRS, UMR5308, 69007 Lyon, France ;

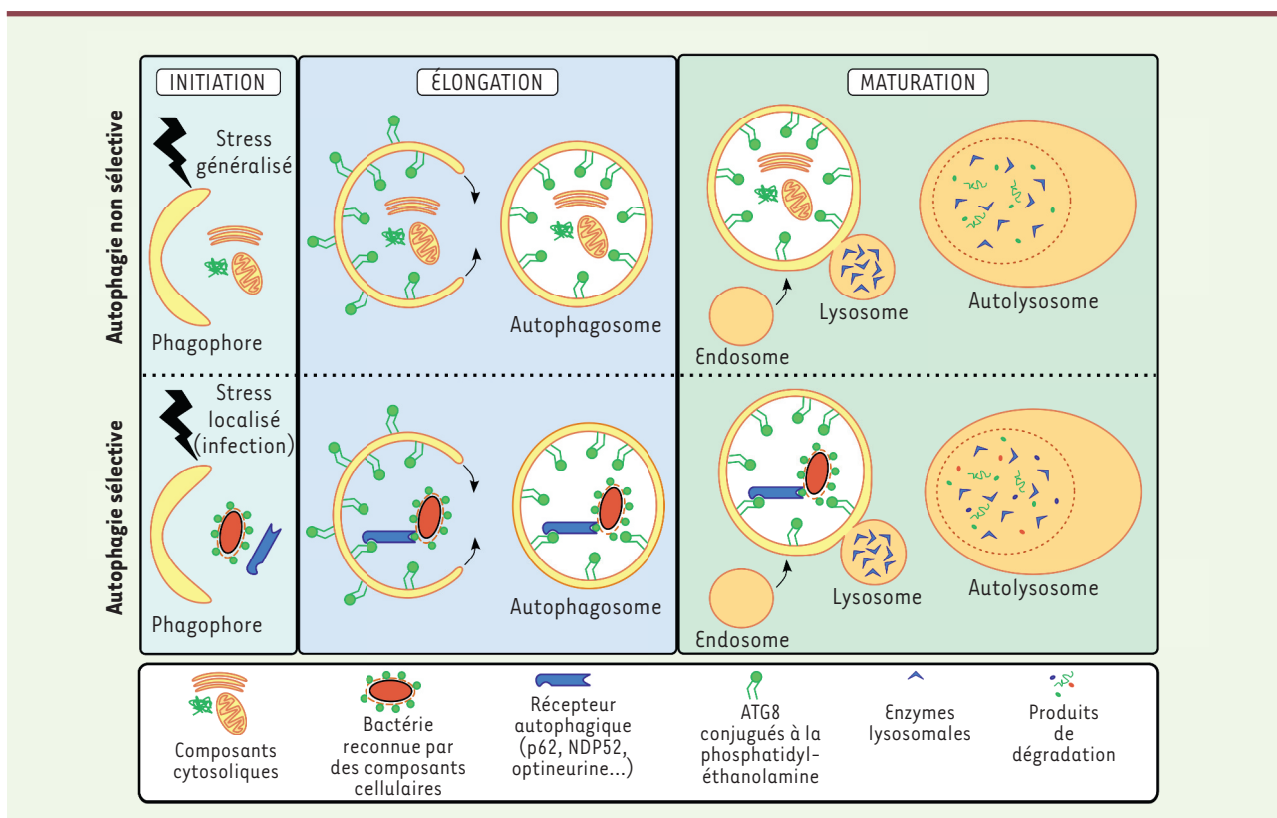
<sup>4</sup> École normale supérieure de Lyon, 69007 Lyon, France ;

<sup>5</sup> Université Lyon 1, Centre international de recherche en infectiologie, UCBL1, 21, avenue Tony Garnier, 69365 Lyon Cedex 07, France. [mathias.faure@inserm.fr](mailto:mathias.faure@inserm.fr)

récepteurs autophagiques [7]. Ces derniers reconnaissent, d'une part, l'élément destiné à la dégradation, et, d'autre part, un membre de la famille des protéines ATG8 (grâce à un domaine appelé LIR, *LC3-interacting region*). Ces facteurs, qui incluent les protéines LC3 (*light chain 3*) et GABARAP (*GABA-A receptor-associated protein*), sont enchâssés dans la membrane du phagophore en croissance. Les récepteurs autophagiques servent donc de pont moléculaire entre le substrat et la vésicule autophagique en formation. La phase d'élongation s'achève par la fusion des deux extrémités du phagophore, structurant un autophagosome. Celui-ci isole ainsi son substrat du reste de la cellule, mais la lumière autophagique n'étant ni acide, ni riche en enzymes actives, l'autophagosome *per se* ne peut dégrader son contenu. Afin d'assurer cette fonction, le processus autophagique se poursuit (on parle de flux autophagique) par la fusion de l'autophagosome avec une vésicule de la voie endolysosomale. Cette étape de maturation mène à la formation d'un autolysosome (fusion autophagosome-lysosome), qui peut être précédée par la formation d'un amphisome (fusion autophagosome-endosome) ; la maturation est indispensable car elle seule permet de dégrader ce qu'emprisonne la vésicule autophagique (Figure 1).

### NDP52 guide les bactéries vers l'autophagosome

NDP52 (*nuclear dot protein 52*) est l'un des récepteurs autophagiques qui permet de cibler des bactéries intracellulaires vers les



**Figure 1. Séquestration et dégradation de composants cytoplasmiques par l'autophagie.** Au-delà de son rôle d'élimination de composants obsolètes de la cellule, l'autophagie peut être induite en réponse à de nombreux stress perçus par la cellule. Trois étapes majeures orchestrent alors le flux autophagique : l'initiation, l'élongation et la maturation. Durant l'élongation, les cargos/substrats sont séquestrés dans l'autophagosome en formation : ces composants peuvent être séquestrés de manière aléatoire ou sélective (grâce à des récepteurs autophagiques), probablement selon l'origine, la nature et/ou l'intensité du stress. Durant la maturation, la fusion de l'autophagosome avec un lysosome peut être précédée d'une fusion avec un endosome.

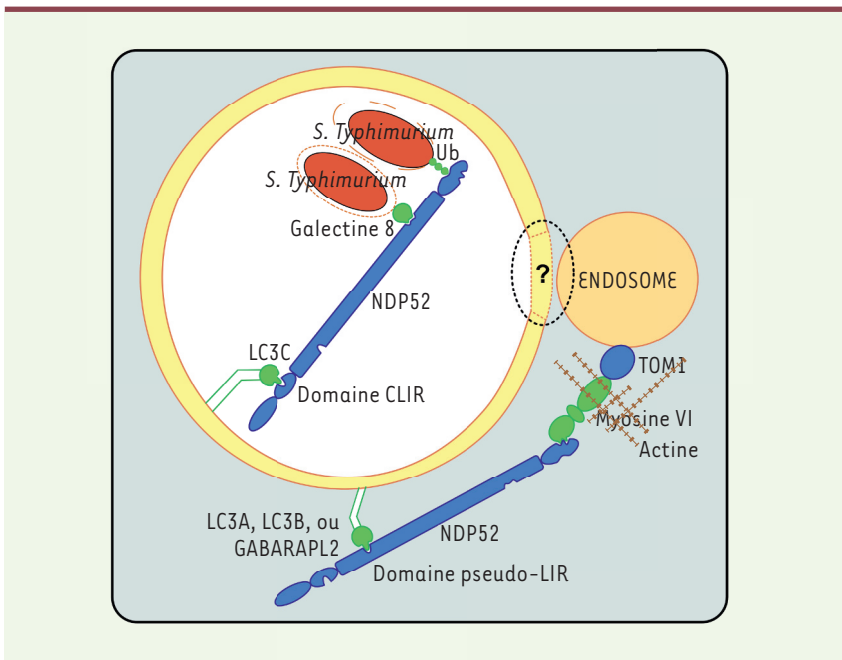
autophagosomes en formation (Figure 2). Pour cela, NDP52 possède un domaine de liaison à la galectine 8, une protéine qui reconnaît des sites glycosylés de protéines. Ces sucres sont d'ordinaire uniquement exposés à l'extérieur des cellules, car portés par les glycoprotéines de la membrane plasmique. Lors de l'internalisation de bactéries comme *Salmonella typhimurium*, *Listeria monocytogenes* ou *Shigella flexneri* dans des vésicules d'endocytose, les sucres protéiques se retrouvent dans la lumière des endosomes. La tentative de sortie des bactéries de ces vésicules endommage la membrane endosomale, exposant alors les protéines cellulaires glycosylées à une reconnaissance par la galectine 8 [8]. Ce détecteur moléculaire d'une anomalie intracellulaire lie dès lors NDP52 qui, grâce à un domaine de liaison spécifique

à la protéine LC3C (appelé domaine CLIR), concentre la vésicule endommagée avec la bactérie au sein d'un phagophore en croissance [9]. De plus, si les bactéries parviennent à s'échapper de l'endosome pour envahir le cytosol, leurs parois peuvent être rapidement recouvertes de petits peptides d'ubiquitine. NDP52, comme plusieurs autres récepteurs autophagiques, possède un domaine de liaison aux ubiquitines et peut ainsi à nouveau lier la bactérie et, en interagissant de manière concomitante avec LC3C, acheminer le microorganisme vers un autophagosome en formation [10].

#### **NDP52, un facteur déterminant pour la dégradation de bactéries prisonnières d'autophagosomes**

Une fois séquestrés dans l'autophagosome, les pathogènes peuvent utiliser

des subterfuges moléculaires pour, soit s'échapper de ce nouvel environnement, soit s'y adapter afin d'y proliférer. Cette adaptation peut passer par un ralentissement ou une inhibition de la maturation de l'autophagosome, afin d'éviter d'être la cible de l'activité lysosomale [3]. Il apparaît ainsi essentiel pour la cellule de rapidement et efficacement réguler la maturation de l'autophagosome contenant la bactérie, afin de la détruire. Nous avons montré que, indépendamment de sa fonction de récepteur autophagique, NDP52 a également la capacité de réguler la fusion entre l'autophagosome et un lysosome [11]. NDP52 possède deux domaines essentiels à la maturation des autophagosomes : un domaine de liaison à la myosine VI, et un autre capable de



**Figure 2. Modèle du double rôle joué par NDP52 dans la xénophagie.** NDP52 lie *S. Typhimurium* indirectement, grâce à des domaines de liaison qui recrutent des intermédiaires moléculaires, la galectine 8 ou des ubiquitines, associés respectivement aux membranes endosomales endommagées par la bactérie internalisée ou aux bactéries s'étant échappées dans le cytosol. Via une interaction avec LC3C, NDP52 cible alors la bactérie vers l'autophagosome. De plus, NDP52 contribue à la fusion des autophagosomes avec la voie endo/lysosomale grâce à deux interactions supplémentaires, avec la myosine VI et un membre de la famille ATG8. L'ensemble de ces interactions concourt à l'efficacité de l'élimination de *S. typhimurium* par l'autophagie. Le mécanisme précis de fusion reste à être compris.

lier quelques membres particuliers de la famille ATG8 (LC3A, LC3B ou GABARAPL2, mais pas LC3C) grâce à un nouveau domaine identifié (appelé pseudo-LIR). En liant la myosine VI, la seule myosine motrice permettant un mouvement rétrograde des endosomes via son interaction avec la protéine endosomale TOM-1 (*target of Myb1*) [12], NDP52 est physiquement associée à la voie endo-lysosomale. En liant un membre des ATG8, NDP52 connecte alors l'endosome à l'autophagosome et permet leur fusion, promouvant ainsi la maturation autophagique [11]. Ainsi, pour que la xénophagie de *S. typhimurium* soit complète, il faut non seulement que la bactérie soit isolée au sein d'un autophagosome, mais également qu'elle soit dégradée. En intervenant successivement lors de ces deux étapes clés, NDP52 contribue à l'efficacité du

contrôle d'une infection par l'autophagie. Il reste à déterminer avec précision comment NDP52 régule la fusion à proprement parler, et comment s'opère le lien fusionnel entre l'amphisome et le lysosome (Figure 2). Il est à noter que NDP52 régule également la maturation de l'autophagosome indépendamment d'infections bactériennes [11]. Dans la mesure où des dysfonctionnements de l'autophagie sont associés à de nombreuses pathologies [13], ces travaux, qui apportent des réponses sur les mécanismes moléculaires de l'autophagie, pourraient ouvrir de nouvelles perspectives pour la compréhension des processus pathologiques associés à des altérations de l'autophagie.

### Conclusion

Dans l'idée d'arriver, un jour prochain, au constat éclatant du vers célèbre de

Don Rodrigue<sup>1</sup> [14], il nous reste à comprendre si d'autres récepteurs autophagiques contribuent à l'efficacité de la xénophagie à la manière de NDP52 ; les (doubles ?) fonctions de ces récepteurs pourraient-elles être engagées de concert ou indépendamment ? Les autophagosomes en formation sont-ils prédestinés à accueillir de manière exclusive ou partagée des substrats apportés sélectivement par ces récepteurs ? Ces mécanismes sont-ils impliqués contre des microbes virulents et commensaux ? Mieux comprendre les liens étroits entre récepteurs autophagiques, pathogènes et maturation autophagique permettra de mieux lutter contre les agents infectieux, notamment ceux qui ciblent ces récepteurs pour en détourner la fonction. Avec ce qui pourrait apparaître comme un dilemme cornélien, assurer le ciblage des bactéries vers l'autophagie ou leur dégradation, nos travaux montrent l'efficacité de NDP52 pour ces deux fonctions de la xénophagie, permettant à la cellule de remporter des batailles contre des envahisseurs pathogènes ; « *Et le combat cessa faute de combattant* » [14]. ♦

**NDP52, autophagy and pathogens: "The war then ceased for lack of combatants"**

### LIENS D'INTÉRÊT

Les auteurs déclarent n'avoir aucun lien d'intérêt concernant les données publiées dans cet article.

### REMERCIEMENTS

Le travail de notre laboratoire sur l'autophagie est soutenu par l'Institut Universitaire de France (IUF), l'ANR et l'Association François Aupetit (AFA).

### RÉFÉRENCES

1. Codogno P. L'autophagie, dégrader plus pour vivre plus mais attention ! *Med Sci (Paris)* 2009 ; 25 : 323-4.
2. Rikihisa Y. Glycogen autophagosomes in polymorphonuclear leukocytes induced by rickettsiae. *Anat Rec* 1984 ; 208 : 319-27.
3. Joubert PE, Pombo Gregoire I, Meiffren G, et al. Autophagie et pathogènes. *Bon appétit Messieurs ! Med Sci (Paris)* 2011 ; 27 : 41-7.

<sup>1</sup> Le titre reprend la fin d'une tirade de Don Rodrigue [14] reçu triomphalement à la Cour et racontant au roi sa victoire éclatante contre les Maures.



## RÉFÉRENCES

- Levine B. Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. *Cell* 2005 ; 120 : 159-62.
- Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, et al. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 2004 ; 119 : 753-66.
- Nakagawa I, Amano A, Mizushima N, et al. Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*. *Science* 2004 ; 306 : 1037-40.
- Deretic V. Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Curr Opin Immunol* 2012 ; 24 : 21-31.
- Thurston T, Wandel M, von Muhlinen N, et al. Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* 2012 ; 482 : 414-8.
- Von Muhlinen N, Akutsu M, Ravenhill B, et al. LC3C, bound selectively by a noncanonical LIR motif in NDP52, is required for antibacterial autophagy. *Mol Cell* 2012 ; 48 : 329-42.
- Thurston TL, Ryzhakov G, Bloor S, et al. The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat Immunol* 2009 ; 10 : 1215-21.
- Verlhac P, Gregoire IP, Azocar O, et al. Autophagy receptor NDP52 regulates pathogen-containing autophagosome maturation. *Cell Host Microbe* 2015 ; 17 : 515-525.
- Tumbarello DA, Waxse BJ, Arden SD, 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 : 1024-35.
- Choi AM, Ryter SW, Levine B. Autophagy in human health and disease. *N Engl J Med* 2013 ; 368 : 1845-6.
- Corneille P. *Le Cid*. Paris : Éditions J'ai Lu, 2014 : 84 p.



## **Annexe IV**

Commentaire publié dans *Microbial Cell*

« Handcuffs for bacteria – NDP52 orchestrates  
xenophagy of intracellular *Salmonella* »

**Pauline Verlhac, Christophe Viret & Mathias Faure**

# Handcuffs for bacteria - NDP52 orchestrates xenophagy of intracellular *Salmonella*

Pauline Verlhac<sup>1,2,3,4,5</sup>, Christophe Viret<sup>1,2,3,4,5</sup> and Mathias Faure<sup>1,2,3,4,5,\*</sup>

<sup>1</sup> CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, 69007 Lyon, France.

<sup>2</sup> Inserm, U1111, 69007 Lyon, France.

<sup>3</sup> CNRS, UMR5308, 69007 Lyon, France.

<sup>4</sup> Ecole Normale Supérieure de Lyon, 69007 Lyon, France.

<sup>5</sup> Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, 69007 Lyon, France.

\* Corresponding Author: Mathias Faure, CIRI, INSERM U1111, CNRS UMR 5308, ENL-L, UCBL1 - 21, Avenue Tony Garnier; 69365 Lyon Cedex 07, France; Tel: +33 4 37 28 23 42; Fax: +33 4 37 28 23 41; E-mail: mathias.faure@inserm.fr

**Eukaryotic cells can selectively target and degrade intracellular pathogens using autophagy, a process referred to as xenophagy. This selectivity is controlled by proteins called autophagy receptors, which can recognise pathogens and address them to the autophagy machinery. Among them, NDP52 can recognise *Salmonella* Typhimurium on the one hand and the ATG8 family member LC3C on the other hand, thus allowing the docking of the bacteria to a growing autophagosome. Additionally, we recently reported that NDP52 is involved in the maturation of the bacteria-containing autophagosome and hence necessary for the ultimate degradation of the bacteria. These two functions of NDP52 are independent as they rely on distinct binding domains and protein partners. Therefore, NDP52 plays a dual role during xenophagy, first by targeting the bacteria to the autophagy machinery and then by regulating its degradation.**

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is a catabolic process, which allows eukaryotic cells to degrade and recycle many deleterious intracellular components by capturing them in a vesicle, the autophagosome. As the keeper of cellular homeostasis, autophagy is highly regulated and can be modulated by either external or internal stimuli such as lack of environmental nutrients or intracellular pathogens, respectively. Dysregulation of the autophagic process has often been associated with human pathologies, ranging from neurodegenerative to chronic inflammatory diseases, which highlights the need for a better understanding of the process. During the past dec-

ade, our understanding of the molecular mechanisms of autophagy and its involvement in the clearance of intracellular pathogens has greatly improved. Basically, autophagy starts with the formation of a curved membrane, the phagophore. This membrane is then elongated until fusion of both extremities to generate a double membrane vesicle called the autophagosome, which entraps cytosolic components. Finally, the autophagosome fuses with a lysosome to form a degradative autolysosome; this process can be preceded by the fusion of the autophagosome with an endosome, forming a so-called amphisome.

During the elongation process, the growing phagophore can selectively capture cytosolic cargo. This selectivity is ensured by the autophagy receptors that recognise elements to be degraded on the one hand and a member of the ATG8 family (LC3s or GABARAPs proteins) bound to the phagophore on the other hand, via a specific LC3-interacting Region (LIR) motif. Cargo may either consist of cellular components, such as protein aggregates or defective organelles, or pathogens in the course of an infection. NDP52 is one of the autophagy receptors engaged during *Salmonella* Typhimurium infection: it can recognise either GALECTINE8 bound to damaged vacuoles that contain *S. Typhimurium* or ubiquitin decorating cytosolic bacteria directly. Recently, it was shown that NDP52 binds to LC3C through a non-canonical LC3-interacting region (CLIR), what is crucial for the targeting of *S. Typhimurium* to the phagophore. However, the mechanisms driving autophagosome maturation for the ultimate degradation of cargo remain to be fully understood, especially in the context of infections.

Interestingly, the endosomal membrane protein TOM1

**MICROREVIEW** on: 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. *Cell Host Microbe*, 2015, V 17 p515-525. doi: 10.1016/j.chom.2015.02.008

doi: 10.15698/mic2015.06.208

Received 04.05.2015, Accepted 06.05.2015, Published 21.05.2015.

Keywords: autophagy, xenophagy, NDP52, bacteria.

		CLIR domain	
Homo sapiens (Q13137)	129	NEEDILVVTTQGEVEE	IEQHNK
Pan troglodytes (G2HF82)	129	NEEDILVVTTQGEVEE	IEQHNK
Pongo abelii (Q5R7H1)	129	NEEDILVVTTQGEVEE	IEQHNK
Macaca fascicularis (Q4R914)	129	NEEDILVVTTQGEVEE	IEQHNK
Mustela putorius furo (M3YV68)	174	NEEDILVVTTQGEVEE	IEQHNK
Rattus norvegicus (M0R8S9)	113	SEEDIMIVINKEKMEDEMLRE	
Mus musculus (A2A6M5)	124	PDEDIMVIVINKEKVEEMEQLSE	
		LIR-Like domain	
Homo sapiens (Q13137)	194	LELKVKEQKDYWETELLQLKE	
Pan troglodytes (G2HF82)	194	LELKVKEQKDYWETELLQLKE	
Pongo abelii (Q5R7H1)	194	LELKVKEQKDYWETELLQLKE	
Macaca fascicularis (Q4R914)	194	LELKVKEQKDYWETE-----	
Mustela putorius furo (M3YV68)	240	LEQLKLVQKDHWETELLQLKE	
Rattus norvegicus (M0R8S9)	171	LKSDLSEQKASWESEMLHLKE	
Mus musculus (A2A6M5)	182	LEHKVEE-KASWEKEKASWEE	

**Table 1.** Alignment of NDP52 region encompassing the so-called CLIR motif (required for bacteria targeting to autophagosomes), and LIR-like motif (required for bacteria-containing autophagosome maturation).

and dynein motor MYOSIN VI were recently shown to be implicated in endosome trafficking and subsequent autophagosome maturation in healthy cells. Moreover, the absence of all three autophagy receptors, meaning OPTINEURIN, T6BP and NDP52, seemingly triggered a defect in both autophagosome biogenesis and maturation. As NDP52 was reported to contain a MYOSIN VI binding domain, we hypothesised that NDP52 could also be involved in autophagosome maturation. We could corroborate this hypothesis, as we observed that the single absence of NDP52 in healthy cells resulted in immature autophagosome accumulation. We have shown that NDP52's MYOSIN VI binding domain as well as a newly identified LIR-like motif, which mediates its interaction with LC3A, LC3B or GABARAPL2 (but not LC3C) are both essential to perform NDP52-mediated autophagosome maturation. The LIR-like motif differs slightly from the canonical LIR motif by the absence of a hydrophobic residue in position X<sub>3</sub>. Importantly, we found that in human cells infected with *S. Typhimurium*, the MYOSIN VI binding domain and the LIR-like motif of NDP52 were both necessary to control the infection. By contrast, none of the interactions mediated by these domains were required to target bacteria to the autophagy machinery, which was exclusively restricted to the CLIR motif of NDP52.

Having the same protein addressing the pathogen to the autophagy machinery and ensuring its degradation could be an important evolutionary advantage against infections. This efficiency could help to reduce the delay necessary for maturation, thus avoiding escape of the pathogen from the autophagosome, or its adaptation to its new environment, which could lead to the establishment of a replicative niche. Of note, the conservation of both the CLIR and the LIR-Like motif of NDP52 among several primate species could suggest such a selective pressure. Indeed, beyond primates and among common animal models only ferrets seem to exhibit both CLIR and LIR-Like domains on NDP52 (see Table 1). Such differences could account for diverse responses of NDP52 towards stress or infection among animal species as already demonstrated for Chikungunya virus. Indeed, during Chikungunya virus

infection human NDP52 plays a pro-viral role while murine NDP52 does not play such a role. Thus, pathogens could easily counteract xenophagy at several steps by manipulating NDP52, or any other autophagy receptors, which would play similar roles; functional redundancy among autophagy receptors could however ensure a selective immune advantage against pathogens targeting one of these receptors. For instance, the mechanism we described could help reducing cellular collateral damage by focusing autophagic degradation exclusively on invading pathogens while improving antigen processing in antigen-presenting immune cells.

Our study sheds light on the mechanisms underlying autophagosome maturation in both infected and healthy cells. NDP52 appears as a crucial actor during xenophagy as it both addresses the pathogen to the phagophore and regulates subsequent autophagosome maturation thus ensuring proper degradation of invading pathogens. Among others, two important questions arise from this work: whether other autophagy receptors share the same double function and how this mechanism is coordinated with the fusion process.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Institut Universitaire de France (IUF), Ligue Contre le Cancer, ANR and Association François Aupetit.

#### CONFLICT OF INTEREST

The authors have no conflict of interest.

#### COPYRIGHT

© 2015 Verlhac *et al.* This is an open-access article released under the terms of the Creative Commons Attribution (CC BY) license, which allows the unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are acknowledged.

Please cite this article as: Pauline Verlhac, Christophe Viret and Mathias Faure (2015). Handcuffs for Bacteria - NDP52 orchestrates xenophagy of intracellular *Salmonella*. *Microbial Cell* 2(6): 214-215. doi: 10.15698/mic2015.06.208

## **Annexe V**

Article publié dans Plos Pathogens

« Sustained Autophagy Contributes to Measles Virus  
Infectivity »

Clémence Richetta, Isabel P. Grégoire, **Pauline Verlhac**,  
Olga Azocar, Joël Baguet, Monique Flacher, Frédéric  
Tanguy, Chantal Rabourdin-Combe, Mathias Faure

# Sustained Autophagy Contributes to Measles Virus Infectivity

Clémence Richetta<sup>1,2,3,4,5</sup>, Isabel P. Grégoire<sup>1,2,3,4,5</sup>, Pauline Verlhac<sup>1,2,3,4,5</sup>, Olga Azocar<sup>1,2,3,4,5</sup>, Joël Baguet<sup>1,2,3,4,5</sup>, Monique Flacher<sup>1,2,3,4,5</sup>, Frédéric Tangy<sup>6</sup>, Chantal Rabourdin-Combe<sup>1,2,3,4,5†</sup>, Mathias Faure<sup>1,2,3,4,5\*</sup>

**1** CIRI, International Center for Infectiology Research, Université de Lyon, Lyon, France, **2** Inserm, U1111, Lyon, France, **3** Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon, France, **4** Université Lyon 1, Centre International de Recherche en Infectiologie, Lyon, France, **5** CNRS, UMR5308, Lyon, France, **6** Unité de Génomique Virale et Vaccination, Institut Pasteur, CNRS URA-3015, Paris, France

## Abstract

The interplay between autophagy and intracellular pathogens is intricate as autophagy is an essential cellular response to fight against infections, whereas numerous microbes have developed strategies to escape this process or even exploit it to their own benefit. The fine tuned timing and/or selective molecular pathways involved in the induction of autophagy upon infections could be the cornerstone allowing cells to either control intracellular pathogens, or be invaded by them. We report here that measles virus infection induces successive autophagy signalings in permissive cells, *via* distinct and uncoupled molecular pathways. Immediately upon infection, attenuated measles virus induces a first transient wave of autophagy, *via* a pathway involving its cellular receptor CD46 and the scaffold protein GOPC. Soon after infection, a new autophagy signalling is initiated which requires viral replication and the expression of the non-structural measles virus protein C. Strikingly, this second autophagy signalling can be sustained overtime within infected cells, independently of the expression of C, but *via* a third autophagy input resulting from cell-cell fusion and the formation of syncytia. Whereas this sustained autophagy signalling leads to the autophagy degradation of cellular contents, viral proteins escape from degradation. Furthermore, this autophagy flux is ultimately exploited by measles virus to limit the death of infected cells and to improve viral particle formation. Whereas CD150 dependent virulent strains of measles virus are unable to induce the early CD46/GOPC dependent autophagy wave, they induce and exploit the late and sustained autophagy. Overall, our work describes distinct molecular pathways for an induction of self-beneficial sustained autophagy by measles virus.

**Citation:** Richetta C, Grégoire IP, Verlhac P, Azocar O, Baguet J, et al. (2013) Sustained Autophagy Contributes to Measles Virus Infectivity. *PLoS Pathog* 9(9): e1003599. doi:10.1371/journal.ppat.1003599

**Editor:** Vojto Deretic, University of New Mexico, United States of America

**Received:** January 4, 2013; **Accepted:** July 17, 2013; **Published:** September 26, 2013

**Copyright:** © 2013 Richetta et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was funded by grants from INSERM, UCBLyon-1, Institut universitaire de France (MF), fondation FINOVI and ANR-08-JCJC-0064-01. CR is the recipient of a fellowship from the Ministère de la Recherche and the Fondation ARC pour la Recherche sur le Cancer DOC 20120605239. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: mathias.faure@inserm.fr

† Deceased.

## Introduction

Measles is a highly infectious human disease caused by infection with measles virus (MeV), one of the most contagious human pathogens [1]. Measles infection takes place by the respiratory route and clinical symptoms include respiratory infection, fever, cough, coryza, conjunctivitis and the appearance of a generalized maculopapular rash, the hallmark of measles. Although MeV infection results in lifelong immunity, a transient but profound immunosuppression occurs by one to two weeks of infection and persists for several weeks [2]. MeV infection-induced complications essentially include secondary infections but also post-infectious encephalitis and subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) [3,4]. Despite the existence of an efficient vaccine based on attenuated MeV strains, recent measles outbreaks highlighted that this disease is still an important cause of mortality, especially among children in developing countries [1,5]. The understanding of the biological interplay between attenuated versus virulent MeV strains and cellular components remains a challenge if we aim at

developing tools to counter infection and use MeV as a vector for therapies.

MeV is a negative-stranded non-segmented RNA enveloped virus that belongs to the genus *Morbillivirus* of the *Paramyxoviridae* family [6]. Its genome encodes six structural proteins, the nucleoprotein MeV-N, a phosphoprotein MeV-P, an RNA polymerase MeV-L, the haemagglutinin MeV-H, the fusion protein MeV-F and the matrix protein MeV-M, and for two non-structural proteins not present within the virion, MeV-V and MeV-C. To date three different host-cell receptors for MeV-H attachment have been identified: CD46 which is expressed on all human nucleated somatic cells [7]; CD150 (also known as SLAMF), expressed on immature thymocytes, activated B and T lymphocytes, macrophages and mature dendritic cells [8], and NECTIN-4 expressed on epithelial cells [9,10]. Whereas MeV-H of clinical/virulent strains of MeV attach to CD150 or NECTIN-4, MeV-H of vaccine/attenuated-laboratory strains bind to either CD46, CD150 or NECTIN-4 [11]. Following attachment, conformational modification of the MeV-F protein leads to membrane fusion

## Author Summary

Autophagy is an evolutionarily conserved lysosomal dependent degradative pathway for recycling of long-lived proteins and damaged organelles. Autophagy is also an essential cellular response to fight infection by destroying infectious pathogens trapped within autophagosomes and plays a key role in the induction of both innate and adaptive immune responses. Numerous viruses have evolved strategies to counteract autophagy in order to escape from degradation or/and to inhibit immune signals. The kinetic and molecular pathways involved in the induction of autophagy upon infections might determine if cells would be able to control pathogens or would be invaded by them. We showed that measles virus (MeV) infection induces successive autophagy signalings in cells *via* distinct molecular pathways. A first autophagy wave is induced by the engagement of the MeV cellular receptor CD46 and the scaffold protein GOPC. A second wave is initiated after viral replication by the expression of the non-structural MeV protein C and is sustained overtime within infected cells thanks to the formation of syncytia. This sustained autophagy is exploited by MeV to limit the death of infected cells and to improve viral particle formation. We describe new molecular pathways by which MeV hijacks autophagy to promote its infectivity.

and virus entry at the host-cell plasma membrane, but also to syncytia formation, resulting from fusion of infected cells with uninfected cells [12]. Subsequently to fusion, the MeV ribonucleoprotein is delivered into the host-cell cytosol and viral mRNAs start to accumulate linearly as soon as 5 to 6 hours post infection before being exponentially increased until 24 hours [13]. MeV-V and MeV-C were shown to contribute to MeV replication by foiling innate antiviral immune responses [14], and newly generated ribonucleoproteins are assembled to bud from cell surfaces.

Among cell-host functions modulated upon MeV infection, we recently described macroautophagy, thereafter referred to as autophagy [15,16]. Autophagy is a catabolic process essential for the maintenance of cellular homeostasis, through the elimination of otherwise deleterious cytosolic components, and for the recycling of metabolites [17,18]. During autophagy, a cup-shaped isolated membrane, the phagophore, elongates within the cytosol up to generate an autophagosome vesicle that sequesters large portions of the cytoplasm. This content is ultimately degraded within autolysosomes, following maturation of autophagosome by fusion with a lysosome. At the molecular level, autophagy is a highly regulated process that involves numerous proteins including those encoded by autophagy-related (ATG) genes [19].

The autophagy machinery is used as a universal cell defence against intracellular microbes since it allows their delivery to degradative lysosomes [17]. Autophagy may also contribute to activate antiviral innate immunity [20,21], as well as adaptive immune response by delivering virus-derived peptides for presentation by major histocompatibility complex (MHC) molecules to T lymphocytes [22,23,24]. Although upon a wide range of viral infections autophagosome formation is observed, few molecular details of viral interaction with the autophagy machinery are known [21]. Nevertheless, numerous viruses have evolved molecular strategies to counteract autophagy in order to escape this process, or even to exploit it to improve their own infectivity [25]. We have previously reported that the binding of an attenuated strain of MeV on CD46 induces the flux of autophagy. This induction relies on the molecular connection of one isoform

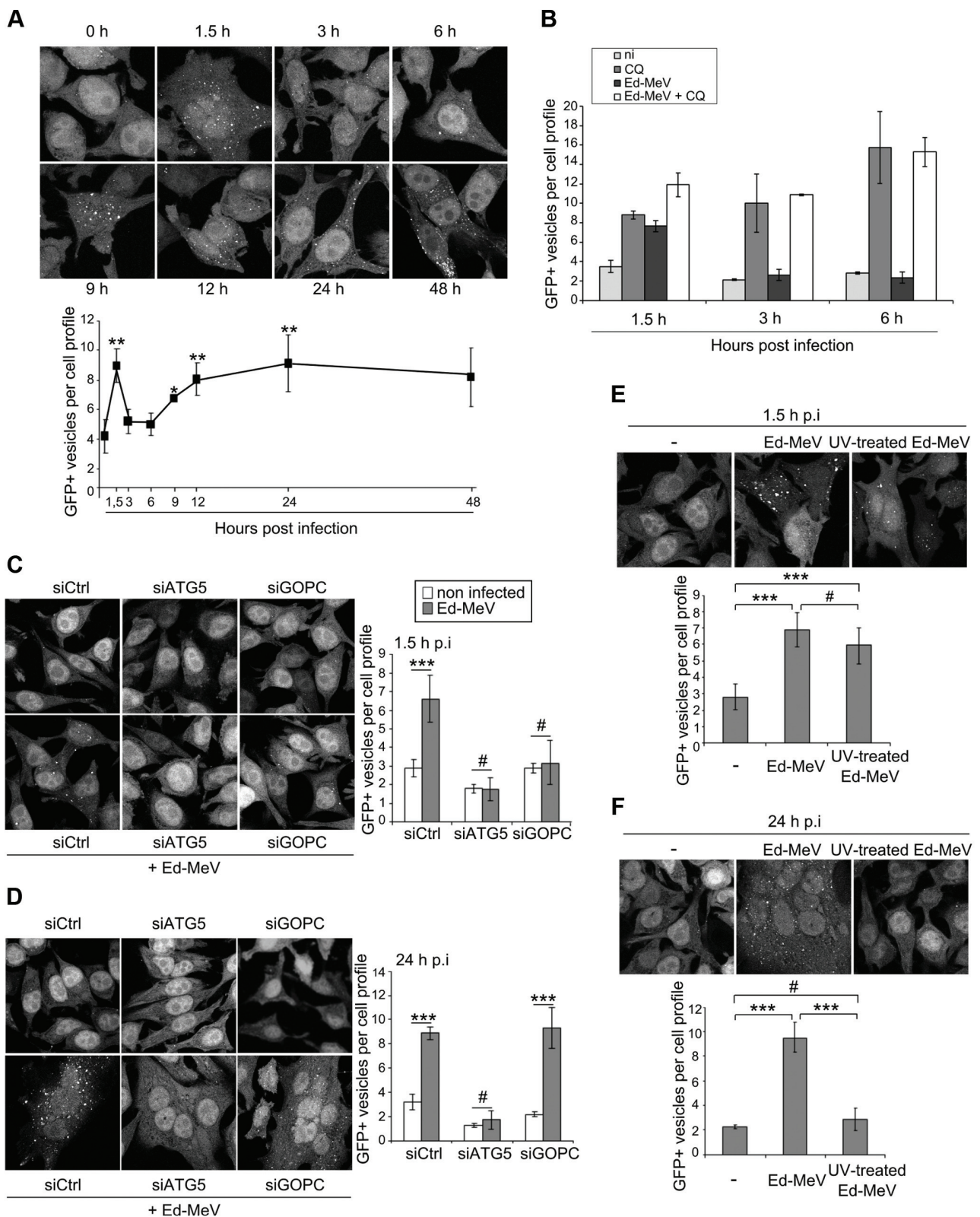
of CD46, CD46-Cyt-1, to BECLIN-1 *via* the scaffold protein GOPC [16,26]. Furthermore, we have shown that attenuated MeV can exploit autophagy through the physical interaction of the MeV-C protein with the autophagy-associated protein IRGM (immunity-related GTPase M) [27]. We wondered here how MeV regulates autophagy in the course of infection and how the virus exploits autophagy to its own advantage. We report that MeV infection induces successive autophagic signalling leading to a sustained increase of the autophagy flux. Whereas only attenuated MeV strains induce an early wave of autophagy dependent on CD46-Cyt1/GOPC, both attenuated and virulent strains induce and exploit a late but sustained productive autophagy wave.

## Results

### The attenuated strain of MeV induces two successive but independent waves of autophagy

We have previously reported that HeLa cell infection with the attenuated Edmonston (Ed)-MeV strain induces autophagy as soon as 1.5 hours post infection *via* the engagement of the CD46-Cyt-1/GOPC pathway [16]. We have also shown that autophagy was still detected by 24 hours of Ed-MeV infection [27]. Therefore, we examined autophagy kinetics upon Ed-MeV infection. GFP-LC3-HeLa cells were infected with Ed-MeV and autophagy was assessed at different time points by numerating GFP-LC3-labeled structures representing LC3-II-containing autophagosomes [28]. Strikingly, we found that Ed-MeV infection induces two successive waves of autophagosome accumulation (Fig. 1A). The first wave is induced as soon as 1.5 hours post infection, but this wave is transient and returned to basal level by 3 to 6 hours of infection. At these time points, autophagy was however still functional since the treatment of MeV-infected cells with chloroquine, which inhibits autophagosome recycling, still allowed the detection of an accumulation of autophagosomes (Fig. 1B and S1). This result suggests that following the transient early wave of autophagy, MeV does not actively inhibit autophagosome formation. Moreover, a second wave of autophagy is then induced, 9 hours after infection, and is sustained up to 48 hours post Ed-MeV infection (Fig. 1A). Similar waves of autophagy induction were observed by tracking LC3-II by western blot (Fig. S2). Of note, in the late time points, autophagosome accumulation was measured essentially in multinucleated cells, as MeV infection induces the massive formation of syncytia. Thus, for each experiment, the number of autophagosomes was normalized to the number of nuclei within a cell.

To investigate the molecular pathways underlining these two waves of autophagosome accumulation we used small interfering (si)RNAs to reduce the expression of putative key proteins. As expected, we found that the reduced expression of GOPC (Fig. S3) disrupted the early autophagosome accumulation, showing that early autophagy requires the expression of this scaffold protein (Fig. 1C, 1.5 h p.i.). In contrast, late autophagy was not affected by the reduced expression of GOPC, although as expected, the treatment of cells with siATG5 prevented autophagosome accumulation (Fig. 1D, 24 h p.i. and Fig. S3). Since the timing of MeV-induced late wave of autophagy correlated with the beginning of an efficient MeV replication (9 hours post infection) [13], we wondered whether virus replication was important for the induction of the late GOPC-independent autophagy wave. We found that infection of GFP-LC3-HeLa cells with a non-replicative ultraviolet-treated Ed-MeV (UV-Ed-MeV) still induced the early autophagosome accumulation (Fig. 1E). However, UV-Ed-MeV infection did not lead to the induction of the late wave of autophagy (Fig. 1F).



**Figure 1. Attenuated strain of measles virus induces two waves of autophagy.** (A) GFP-LC3-HeLa cells were infected with the attenuated strain of MeV Edmonston (Ed-MeV) at MOI 1. Autophagy was monitored by the numeration of GFP+ autophagosomes at the indicated period of time post infection. (B) GFP-LC3-HeLa cells were infected with Ed-MeV at MOI 1+/-75  $\mu$ M Chloroquine (CQ) and autophagy was monitored at the indicated period of time post infection. (C–D) GFP-LC3 HeLa cells were treated with the indicated siRNA for 48 h and infected or not with Ed-MeV (MOI 1). Autophagy was monitored 1.5 h (C) or 24 h (D) post infection by the numeration of GFP+ autophagosomes. (E–F) GFP-LC3-HeLa cells were



infected with Ed-MeV or UV-treated Ed-MeV (MOI 3) and 1.5 h (E) or 24 h (F) post infection (p.i) the number of GFP+ vesicles per cell was assessed by confocal microscopy. For each experiment, representative profiles are shown and are accompanied by a graph representing the number of GFP+ vesicles per cell profile (= GFP+ vesicles per one nucleus). For syncytia, the number of dots was normalized to the number of nuclei. Error bars, mean  $\pm$  SD of three independent experiments for (A and C-F) and error bars, mean  $\pm$  MD of two independent experiments for (B). Student's t test; \*\*\* $p$ <0.005; \*\* $p$ <0.01; \* $p$ <0.05; # $p$ >0.05.  
doi:10.1371/journal.ppat.1003599.g001

Altogether these results indicated that infection with an attenuated strain of MeV induces two successive waves of autophagy through distinct and uncoupled molecular pathways. An early one involves the cellular receptor CD46 and the scaffold protein GOPC, and a late one requires viral replication.

### The non-structural protein MeV-C is required to induce the late wave of autophagy during MeV infection

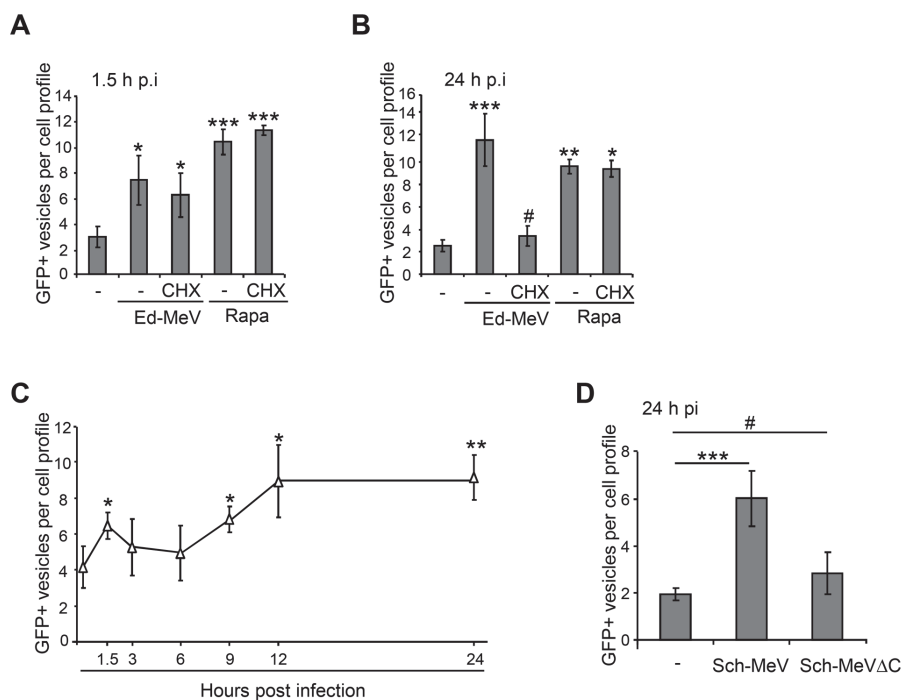
The non-structural protein MeV-C is synthesised during the course of MeV infection. As we have recently shown that the single overexpression of MeV-C was sufficient to induce autophagy *via* an IRGM-dependent pathway [15,27], we asked whether measles viral proteins synthesised during viral replication were indeed involved in late autophagy induction. To this end, we used 0.5  $\mu$ g/ml cycloheximide which strongly prevented protein translation in the course of infection (Fig. S4), and autophagosome accumulation was monitored in GFP-LC3-HeLa cells infected with infectious Ed-MeV. Interestingly, whereas cycloheximide treatment did not modulate the early autophagy wave (Fig. 2A), it totally abolished the induction of the later one (Fig. 2B). The absence of autophagosome accumulation in 24 hours Ed-MeV-infected cells

was not due to a limited availability of autophagy proteins due to cycloheximide treatment. Indeed, cells treated with rapamycin, an autophagy inducer, still induced autophagy in the presence of cycloheximide for the same period of time (Fig. 2A/B).

In order to determine whether MeV-C contributes indeed to autophagy induction during the course of infection, we then used a recombinant virus of the attenuated strain of MeV Schwarz (Sch-MeV) deficient for MeV-C expression (Sch-MeV $\Delta$ C). First, we found that wild type Sch-MeV behaved as Ed-MeV since Sch-MeV infection induced two successive waves of autophagy, with similar kinetics than Ed-MeV infection (Fig. 2C). However, we found that in contrast to the wild type strain, Sch-MeV $\Delta$ C did not induce autophagy 24 hours post infection (Fig. 2D). Thus, this result suggested that MeV-C expression is an essential prerequisite for an efficient induction of a second MeV-induced autophagy wave.

### Syncytia formation sustains autophagy in MeV-infected cells

MeV infection massively induces syncytia formation. However, very few syncytia were detected upon Sch-MeV $\Delta$ C infection (data



**Figure 2. The MeV-C protein is involved in MeV-induced autophagy.** (A–B) GFP-LC3-HeLa cells were infected or not with Ed-MeV (MOI 3) and treated or not with 0.5  $\mu$ g/ml cycloheximide (CHX) during 1.5 h (A) or 24 h (B), in the presence of 125 nM rapamycin (Rapa) when indicated. (C) GFP-LC3-HeLa cells were infected with the attenuated strain of MeV Schwarz (Sch-MeV) at an MOI 1. Autophagy was monitored by the numeration of GFP+ autophagosomes at the indicated period of time post infection. (D) GFP-LC3-HeLa cells were infected with the attenuated strain of MeV Schwarz wild-type (Sch-MeV) or deficient for MeV-C expression (Sch-MeV $\Delta$ C). 24 h post infection, the total number of GFP+ vesicles per cell was assessed by confocal microscopy in infected cells detected by staining for the viral nucleoprotein N (MeV-N). For each experiment, graph represents the number of GFP+ vesicles per cell (= GFP+ vesicles per one nucleus). For syncytia, the number of dots was normalized to the number of nuclei. Error bars, mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Student's t test; \*\*\* $p$ <0.005; \*\* $p$ <0.01; \* $p$ <0.05; # $p$ >0.05.  
doi:10.1371/journal.ppat.1003599.g002

not shown). We therefore wondered whether, beyond MeV-C expression, the formation of syncytia might contribute to the induction of autophagy upon MeV infection. We analysed autophagosome accumulation in either mononucleated or multinucleated cells 24 hours after infection with either Sch-MeV or Sch-MeVΔC. Autophagy was analysed in MeV-infected cells by numerating GFP-LC3<sup>+</sup> vesicles exclusively in infected cells detected by MeV-N staining. Interestingly, whereas autophagy was detected in both mononucleated or multinucleated cells infected with Sch-MeV, autophagy was only detected in the rare multinucleated cells formed upon Sch-MeVΔC infection (Fig. 3A). Altogether, these results indicate that MeV-C is required to induce the late autophagy wave in infected cells that have not yet fused with other cells, but is dispensable in syncytia.

To further evaluate a role of syncytia formation in autophagy induction, wild type Ed-MeV-infected GFP-LC3-HeLa cells were cultured in the presence of a fusion inhibitory peptide (FIP) which inhibits syncytia formation without preventing individual infectious MeV particles entry within host cells [14]. Whereas the FIP treatment completely abolished MeV-induced syncytia formation (not shown), autophagy was still detected in 24 hours-infected mononucleated cells, although with a 50% reduction when compared to untreated infected cells (Fig. 3B). This reduction was neither due to a general effect of FIP on the autophagy process, since accumulation of autophagosomes by rapamycin was not affected by FIP treatment (Fig. 3B), nor to a decrease of viral protein synthesis as monitored by detection of similar levels of expression of MeV-N and MeV-P in the presence or not of FIP (Fig. S5).

To determine whether MeV replication within infected-syncytia was required to induce autophagy, we analysed autophagy in multinucleated cells in absence of MeV replication. First, MeV-H/F-co-transfected HeLa cells (Fig. S6A [29]) were co-cultured with GFP-LC3-HeLa cells leading to the cell-cell fusion *via* a viral H/F proteins dependent fusion process. In GFP<sup>+</sup> multinucleated cells (those resulting from H<sup>+</sup>/F<sup>+</sup> GFP-LC3<sup>-</sup> cells which have fused with H<sup>-</sup>/F<sup>-</sup> GFP-LC3<sup>+</sup> cells), we found an increased number of autophagosomes, when compared with GFP<sup>+</sup> mononucleated cells (Fig. 3C). The reduced expression of GOPC did not modulate autophagosome accumulation in these multinucleated cells (Fig. 3D). Moreover, multinucleated cells resulting from cell-cell fusion forced by polyethylene glycol (PEG) displayed an increased number of GFP-LC3<sup>+</sup> autophagosomes (Fig. 3E). Thus, all together these results strongly suggested that in the course of MeV infection, the syncytia formation mediated by Ed-MeV-H/F viral proteins is sufficient to induce an autophagic signalling in multinucleated cells, independently of both viral replication and of the CD46/GOPC-dependent pathway.

### MeV proteins escape from degradation by sustained autophagy flux during MeV infection

Autophagy is a dynamic, multi-step process that can be modulated at several levels. An accumulation of autophagosomes can either reflect an increase of the autophagy flux, through the formation of *de novo* autophagosomes, or a reduced turnover of autophagosomes recycling, due to an inhibition of their fusion with lysosomes. We previously reported that the early CD46-Cyt-1/GOPC dependent induction of autophagy upon MeV infection resulted from an increase of the autophagy flux [16]. We confirmed this observation here by showing that the level of expression of the long-lived protein p62, a target of autophagy degradation, was reduced during the early wave of autophagy induced 1.5 hours post Ed-MeV or Sch-MeV infection (Fig. 4A/B). However, p62 expression was equivalent in 3–6 hours infected

cells and in uninfected cells (Fig. 4A/B), the time points during which autophagy was not detected in MeV-infected cells (Fig. 1A).

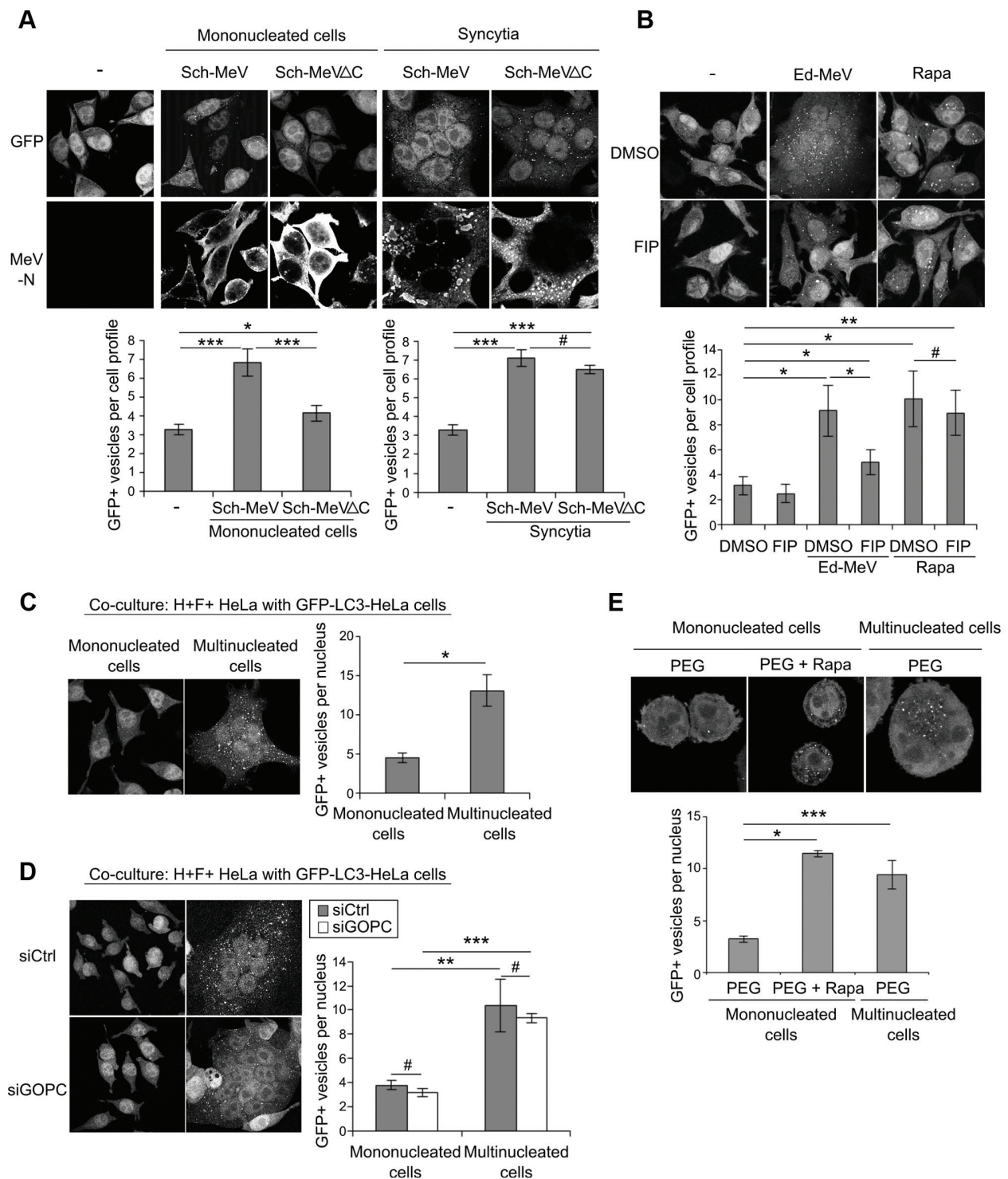
We then asked whether the late and sustained accumulation of autophagosomes also resulted from an increased autophagy flux. We found a strong reduction of p62 expression in 24 hours Ed-MeV-infected cells suggesting an increase of the autophagy flux at this late time point (Fig. 4C). To further determine the reason of the late autophagosome accumulation upon infection, we used stably expressing mRFP-GFP-LC3-HeLa cells that allow for the distinction between autophagosomes (GFP<sup>+</sup>RFP<sup>+</sup> puncta) and autolysosomes (GFP<sup>-</sup>RFP<sup>+</sup> puncta) due to the quenched signal of the GFP in acidic compartments [30,31]. Although we found an increased number of total autophagy vesicles in Ed-MeV-infected cells compared to control cells, an equivalent ratio of number of autophagosomes and autolysosomes was measured in infected cells and in control or rapamycin-treated cells (Fig. 4D). As expected, much more autophagosomes than autolysosomes were numerated in chloroquine-treated control cells, an inhibitor of autolysosome acidification (Fig. 4D). Thus, both the early and the late induction of autophagy following attenuated MeV infection induce *de novo* autophagosome formation and leads to the achievement of the autophagy process, without inhibition of autophagosome maturation. We therefore wondered whether this sustained autophagic flux degrades MeV proteins during the course of infection. We determined the level of expression of two viral proteins, the nucleoprotein MeV-N and the phosphoprotein MeV-P, in control cells and in cells treated with siATG5 in order to prevent autophagy. We found that autophagy competent or deficient cells expressed similar levels of MeV protein after 24 hours or 48 hours of infection (Fig. 4E/F). This result suggested that MeV proteins escape from autophagic degradation induced by MeV replication.

### MeV exploits the autophagy flux to replicate

Whereas several viruses take advantage of autophagy to replicate while inhibiting autophagosome maturation, MeV infection induces an increase of the autophagy flux. We wondered whether the autophagy flux was indeed required to improve viral particle production. First, we performed kinetics studies and, in accordance with our previous report [15], we found a strong impairment in Ed-MeV particle formation 24 hours to 72 hours post-infection in cells with a reduced expression of ATG5, as compared to control cells (Fig. 5A). Autophagy involvement in MeV particle formation was confirmed with the reduced expression of another autophagy essential gene ATG7 (Fig. S7A), which also compromised Ed-MeV production (Fig. S7B).

We then looked at the incidence of experimental autophagy induction on MeV replication. We found that HeLa cells treated with the autophagy inducer rapamycin produced twice more infectious Ed-MeV particles than untreated cells (Fig. 5B). This result was corroborated when we analysed the expression of MeV proteins. We found that rapamycin treatment led to an increased level of expression of the two MeV proteins MeV-N and MeV-P (Fig. 5C/D).

Importantly, the inhibition of autophagosome maturation with chloroquine decreased the viral particle production, when compared to control cells, highlighting the importance of the autophagic flux for an efficient MeV replication in HeLa cells (Fig. 5B). However, chloroquine treatment did not have impact on the level of expression of MeV protein (Fig. 5C/D), confirming that these proteins are not targeted towards autophagic degradation. Altogether, these results indicated that MeV infection leads to a productive autophagy which is required for an efficient production of MeV infectious particles.



**Figure 3. Syncytia formation induces autophagy in MeV-infected cells.** (A) GFP-LC3-HeLa cells were infected with the attenuated strain of MeV Schwarz wild-type (Sch-MeV) or deficient for MeV-C expression (Sch-MeV $\Delta$ C). 24 h post infection, the number of GFP+ vesicles within mononucleated or multinucleated cells was assessed by confocal microscopy in infected cells detected by staining for the viral nucleoprotein N (MeV-N). (B) GFP-LC3 HeLa cells were infected or not with Ed-MeV (MOI 3) or treated with rapamycin (Rapa) (125 nM), and treated or not with the FIP peptide (10  $\mu$ g/mL). 24 h post infection, the number of GFP+ vesicles per cell was assessed by confocal microscopy. (C) HeLa cells were co-transfected with a vector encoding for the H protein of Ed-MeV and one encoding for the F protein. 24 h post transfection H/F-co-transfected HeLa cells (H<sup>+</sup>F<sup>+</sup> HeLa) were co-cultured with GFP-LC3-HeLa cells to induce cell-cell fusion. The number of GFP+ vesicles within mononucleated or multinucleated cells was assessed by confocal microscopy after 18 h of co-culture. (D) GFP-LC3 HeLa cells and HeLa cells were treated with the indicated siRNA for 24 h. HeLa were then co-transfected with MeV-H/F as in (C) and co-cultured with siRNA treated GFP-LC3 HeLa cells. The number of GFP+ vesicles within mononucleated or multinucleated cells was assessed by confocal microscopy. (E) GFP-LC3 HeLa cells were treated with

Polyethylene Glycol (PEG) and treated or not with 250 nM rapamycin (Rapa) for 2 h. The number of GFP+ vesicles within monocucleated or multinucleated cells was assessed by confocal microscopy 6 h after PEG treatment. For each experiment, representative profiles are shown and are accompanied by a graph representing the number of GFP+ vesicles per cell (=GFP+ vesicles per one nucleus). For syncytia, the number of dots was normalized to the number of nuclei. Error bars, mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Student's t test; \*\*\* $p$ <0.005; \*\* $p$ <0.01; \* $p$ <0.05; # $p$ >0.05.  
doi:10.1371/journal.ppat.1003599.g003

### Autophagy induced by MeV protects cells from death

As autophagy has no direct impact on viral protein synthesis, we wondered whether MeV could take benefit from autophagy by extending infected cell survival. We found that autophagy inhibition using *siATG5* increased death of cells infected by Sch-MeV as measured by cell numeration (Fig. 6A). We confirmed this result by looking at the percentage of late apoptotic cells/dead cells determined by the double labeling for Annexin V and 7-Amino-Actinomycin (7AAD) and found twice more Annexin V+/7AAD+ in *siATG5*-treated cells than in control cells upon Sch-MeV infection (Fig. 6B). In contrast, the experimental induction of autophagy with rapamycin prior infection was found to protect Sch-MeV-infected cells from cell death (Fig. 6C/D). Moreover, the reduced expression of ATG5 increased Sch-MeVΔC-infected cell death (Fig. S8), but more slightly than wild type Sch-MeV (Fig. 6A). However, autophagy promotion with rapamycin protected efficiently Sch-MeVΔC-infected cells from death (Fig. S8). Taken together, these results strongly suggested that autophagy induced by MeV could contribute to protect infected cells from death what contributes to improve infectivity. Corroborating this hypothesis, we found that the inhibition of apoptosis, using the pan-caspase inhibitor Z-VAD, improved MeV particle production by 48 hours-infected cells (Fig. 6E). Furthermore, the prevention of autophagy in Z-VAD-treated cells did not modulate MeV production (Fig. 6E), suggesting that the main function of autophagy in the course of MeV infection is to delay MeV-induced apoptosis.

### A virulent strain of MeV induces and exploits the autophagic flux

We then investigated whether a virulent strain of MeV, which does not bind CD46 but CD150 to infect cells [8], might also induce the two waves of autophagy during infection, and exploit autophagy in HeLa cells. As expected, we did not detect autophagy in HeLa cells incubated with the virulent G954-MeV strain, since these cells do not express CD150 (Fig. S9) [8]. However, interestingly we found only a marginal accumulation of GFP+ dots in CD150-GFP-LC3-HeLa cells, 1,5 hours after infection (Fig. 7A and Fig. S10). By contrast, a strong increase of the number of autophagosomes was observed 24 hours after G954-MeV infection (Fig. 7B). These dots corresponded to autophagosomes since their accumulation was abolished in cells with a reduced expression of the essential gene for autophagy *ATG5* (Fig. S11). Additionally, we did not observe a decrease of p62 expression 1,5 hours post G954-MeV infection, whereas its expression drops off by 24 hours of infection (Fig. 7C/D). Moreover, tracking RFP-GFP-LC3 in infected CD150-HeLa cells confirmed that the autophagy flux is increased in 24 hours G954-MeV-infected cells (Fig. 7E). Thus, these results suggested that virulent CD150-dependent CD46-independent MeV strain infection does mostly induce the productive late wave of autophagy.

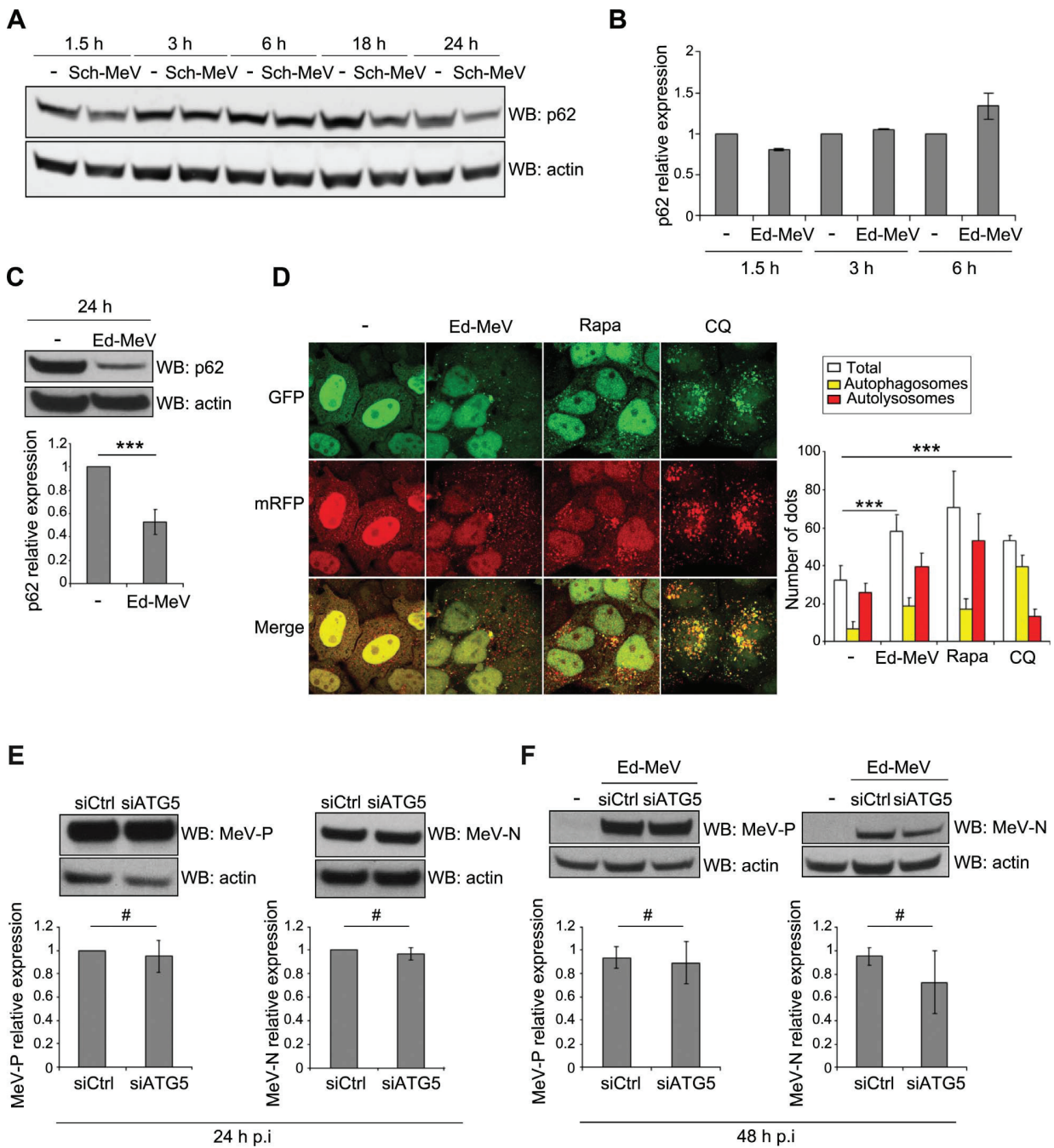
Additionally, we found that UV-G954-MeV and cycloheximide treatment prevented autophagosome accumulation in 24 hours G954-MeV-infected CD150-HeLa cells, indicating that, as for attenuated strains, neo-synthesized viral proteins are required for autophagy infection by a virulent MeV strain (Fig. 7F and S12). Moreover, virulent H/F co-expression on HeLa cells (Fig. S6B)

co-cultured with CD150-GFP-LC3 HeLa cells was sufficient to induce an autophagic signalling in multinucleated cells, independently of viral replication (Fig. 7G). Finally, we found that virulent MeV replicated less efficiently in *siATG5*-treated cells than in control cells (Fig. 7H). Altogether, these results indicated that a virulent MeV strain unable to induce the first CD46-dependent autophagic wave, induces and exploits the late autophagic wave to replicate.

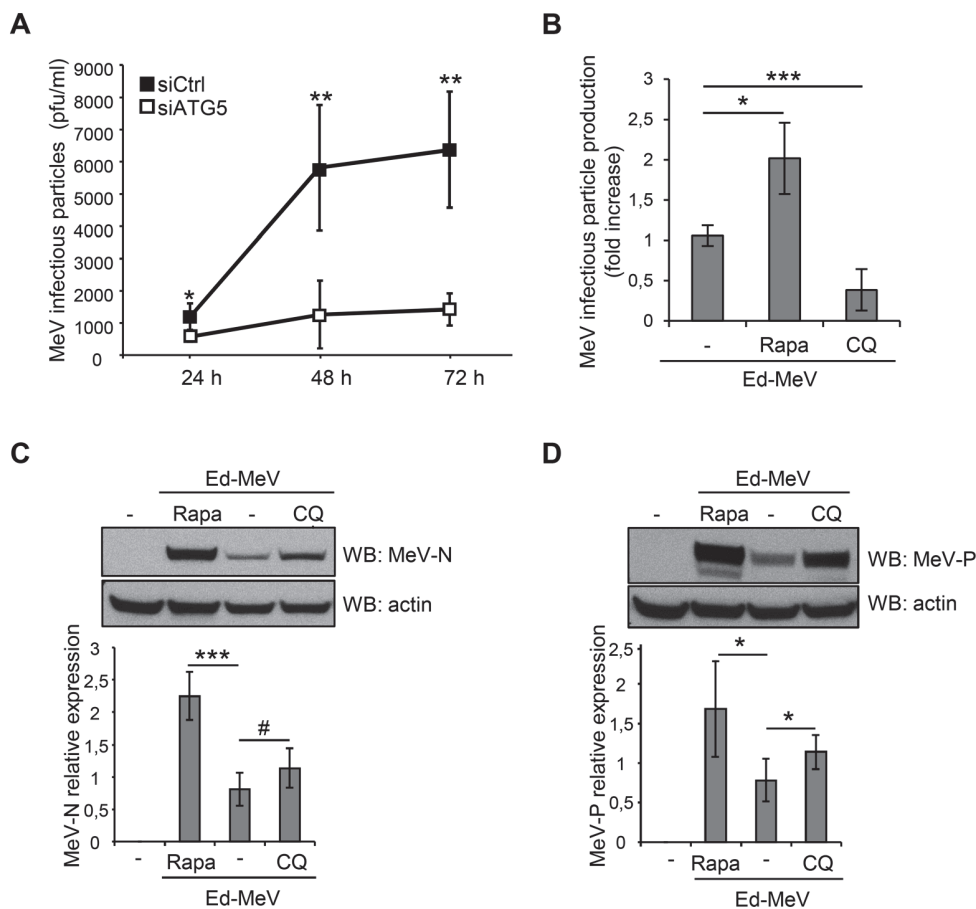
### Discussion

We found that infection with attenuated MeV induces two successive waves of autophagy *via* distinct molecular pathways. We have previously described the attenuated MeV receptor CD46-Cyt-1 as a pathogen receptor able to induce an early autophagy flux, subsequently to pathogen detection, *via* its association with the scaffold protein GOPC, which relies to the autophagosome formation complex BECLIN 1/VPS34 [16]. We show here that this autophagy induction is very transient as it probably stops after CD46/GOPC-mediated autophagic signalling following virus entry. Interestingly, virulent strains do not bind to CD46 and therefore are unable to induce the CD46-dependent early autophagy wave. Instead, virulent strains bind to CD150. CD150 was reported to recruit the autophagy-associated molecules BECLIN 1 and VPS34 to the phagosome of macrophages which uptake gram-negative bacteria [32]. However, whether CD150 engagement regulates the autophagy process has not been observed. Our results indicate that CD150 does not induce autophagy (or very marginally) upon virulent MeV entry. Thus, an attractive hypothesis would be that the first autophagy wave induced by attenuated/vaccinal MeV strains, but not triggered by virulent/clinical ones, could contribute to the attenuation of MeV infectivity, an issue that remains to be investigated. An immune function resulting from CD46-induced autophagy could be to facilitate intravesicular TLR engagement. Indeed in plasmacytoid dendritic cells, TLR7 gains access to viral-replication intermediates through autophagy to induce antiviral type I interferon (IFN-I) production [20]. Interestingly, in B cells, TLR9 is recruited to autophagosomes upon B cell receptor (BCR) internalization to enhance B cell activation [33]. Furthermore, it was shown that CD46-binding adenoviruses are routed in a pathway that allows TLR9-dependent IFN-I induction, whereas adenoviruses using CAR as cellular receptor does not [34]. Thus, the immediate autophagy induction mediated by CD46 might confer an early response towards CD46-binding MeV strains, protecting cells from massive replication by producing IFN-I prior to extended MeV replication, and contributing to their attenuation. HeLa cells being poor producers of IFN-I, in our experimental setup attenuated MeV can replicate efficiently. It will be of interest to determine whether autophagy induced by CD46-binding viruses is involved in early IFN-I induction.

After few hours of infection, a new autophagy flux is induced, which is sustained over time. This process is independent of a CD46-Cyt-1/GOPC signalling, but requires viral replication and relies on the expression of the C protein of MeV. Importantly, in HeLa cells, for attenuated and virulent strains of MeV, we demonstrated that this second wave of autophagy is manipulated by MeV to increase infectious viral particle formation. We



**Figure 4. The late wave of autophagy induced by attenuated MeV is productive.** (A) HeLa cells were infected with Sch-MeV (MOI 1). At the indicated time points post infection, cellular p62 expression was determined by western blot. (B) HeLa cells were infected with Ed-MeV (MOI 1). At the indicated time points post infection, cellular p62 expression was determined by western blot. The graph represents the intensity of p62 over actin expression normalized to the control condition (non infected). Error bars, mean  $\pm$  MD of two independent experiments. (C) HeLa cells were infected with Ed-MeV (MOI 3). 24 h p.i., cellular p62 expression was determined by western blot. Representative results are shown and are accompanied by a graph representing the intensity of p62 over actin expression normalized to the control condition (non infected). (D) mRFP-GFP-LC3 HeLa cells were infected with Ed-MeV (MOI 3) or treated with 250 nM rapamycin (Rapa) or 75  $\mu$ m Chloroquine (CQ) during 2 h. 24 h p.i., the total number of autophagic vesicles (mRFP+) and the number of autophagosomes (mRFP+/GFP+) were assessed by confocal microscopy. The number of autolysosomes was determined by subtracting the number of autophagosomes (mRFP+/GFP+) from the total number of vesicles (mRFP+). Representative profiles are shown and are accompanied by a graph representing the number of autophagic vesicles (white), autophagosomes (yellow) and autolysosomes (red) per nuclear profile for each condition. (E–F) HeLa cells were treated with the indicated si-RNA for 48 h and infected with Ed-MeV (MOI 3 (E) or MOI 0.1 (F)). 24 h (E) or 48 h (F) post-infection, cells were lysed and anti-N and anti-P western blot were performed to reveal MeV-N and MeV-P, respectively. Representative results are shown and are accompanied by a graph representing the intensity of MeV-N or MeV-P expression over cellular actin normalized to the control condition. (C–F) : error bars, mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Student’s t test; \*\*\* $p$ <0.005; \*\* $p$ <0.01; \* $p$ <0.05; # $p$ >0.05. doi:10.1371/journal.ppat.1003599.g004

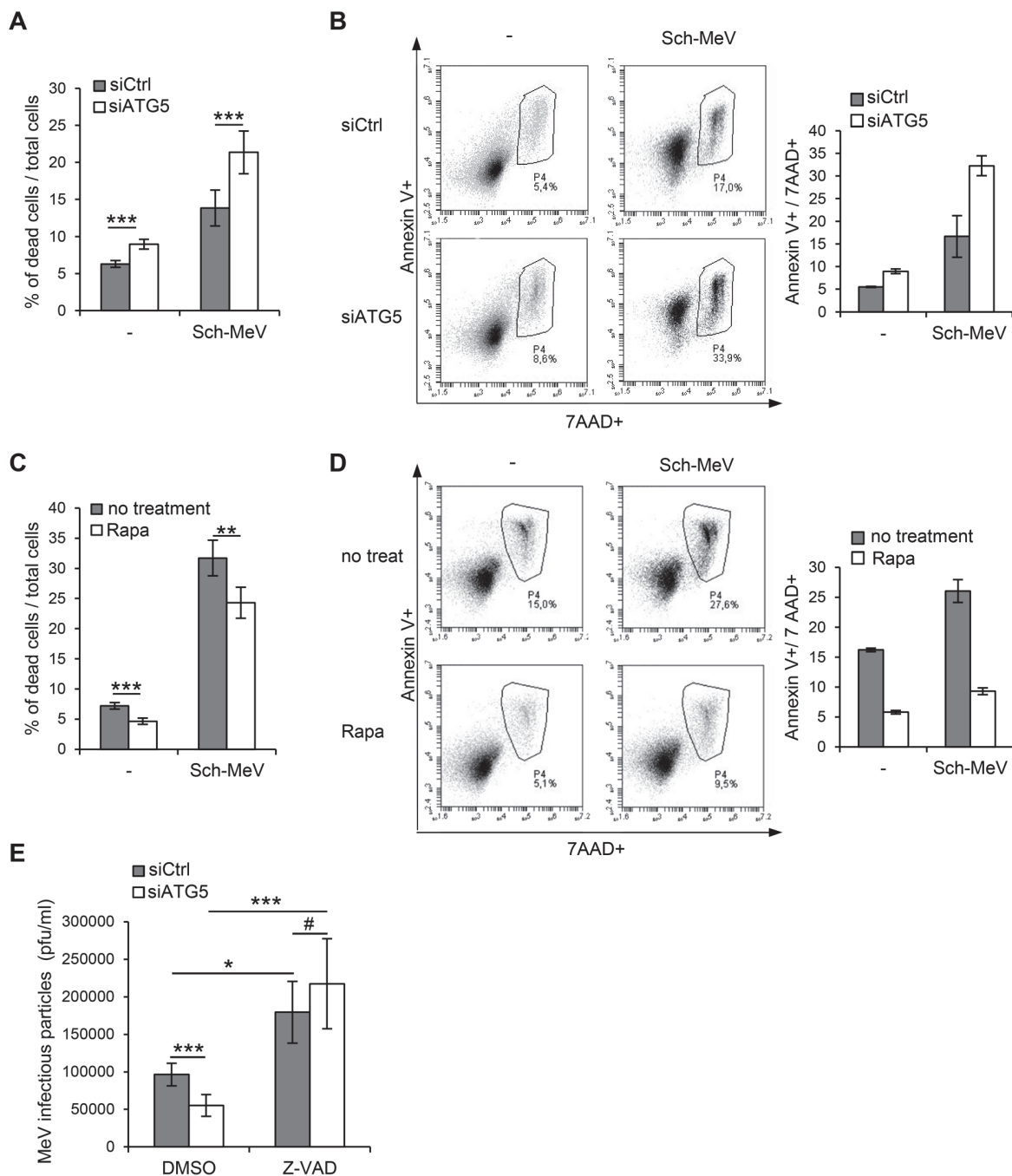


**Figure 5. Ed-MeV exploits autophagy to replicate.** (A) HeLa cells were treated with the indicated si-RNA for 48 h and infected with Ed-MeV (MOI 3). One, two or three days post infection infectious viral particles were titrated by plaque assay. (B–D) HeLa cells were treated or not with 125 nM rapamycin (Rapa) or 50  $\mu$ M chloroquine (CQ) and infected with Ed-MeV (MOI 1 (B) or MOI 0.1 (C–D)). Three days post infection infectious viral particles were titrated by plaque assay (B) or 48 h post-infection, cells were lysed and MeV-N (C), MeV-P (D) expression were detected by western blot. (C–D) Representative results are shown and are accompanied by a graph representing the intensity of MeV-N (C) or MeV-P (D) expression over actin, normalized to the non-infected condition. For each experiment, error bars, mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Student's t test; \*\*\* $p$ <0.005; \*\* $p$ <0.01; \* $p$ <0.05; # $p$ >0.05. doi:10.1371/journal.ppat.1003599.g005

described recently the autophagy-associated protein IRGM as being a cellular target of MeV for both the induction of autophagy 24 hours post-infection (what correspond to the second autophagy wave), and to improve MeV infectivity [15]. Moreover, we have reported that the single expression of MeV-C, which can interact with IRGM, was sufficient to induce autophagy, through an IRGM dependent pathway [15]. Here, we extended these observations by showing that MeV deficient for the expression of the C protein (MeV $\Delta$ C) does not induce autophagy in infected mononucleated cells. These results confirmed a prominent role of the MeV-C protein in the induction of the second wave of autophagy, subsequently to MeV replication. The exact role of MeV-C in MeV-induced autophagy requires further investigations. We have previously shown that the MeV-C partner IRGM can interact with several other human autophagy-associated proteins, ATG5, ATG10, LC3C and BIF-1, which could be involved in MeV-induced autophagy, consequently to C expression [15,35]. Interestingly, MeV-C was also shown to interfere with host defence mechanisms by dampening antiviral IFN-I activation through the downregulation of viral RNA synthesis in order to limit their detection by IFN-I-inducing cytosolic receptor such as RIG-I or MDA5 [36,37]. We highlight here an unrevealed

role of the C protein in autophagy induction upon MeV infection, which is ultimately used by the virus to improve its infectivity.

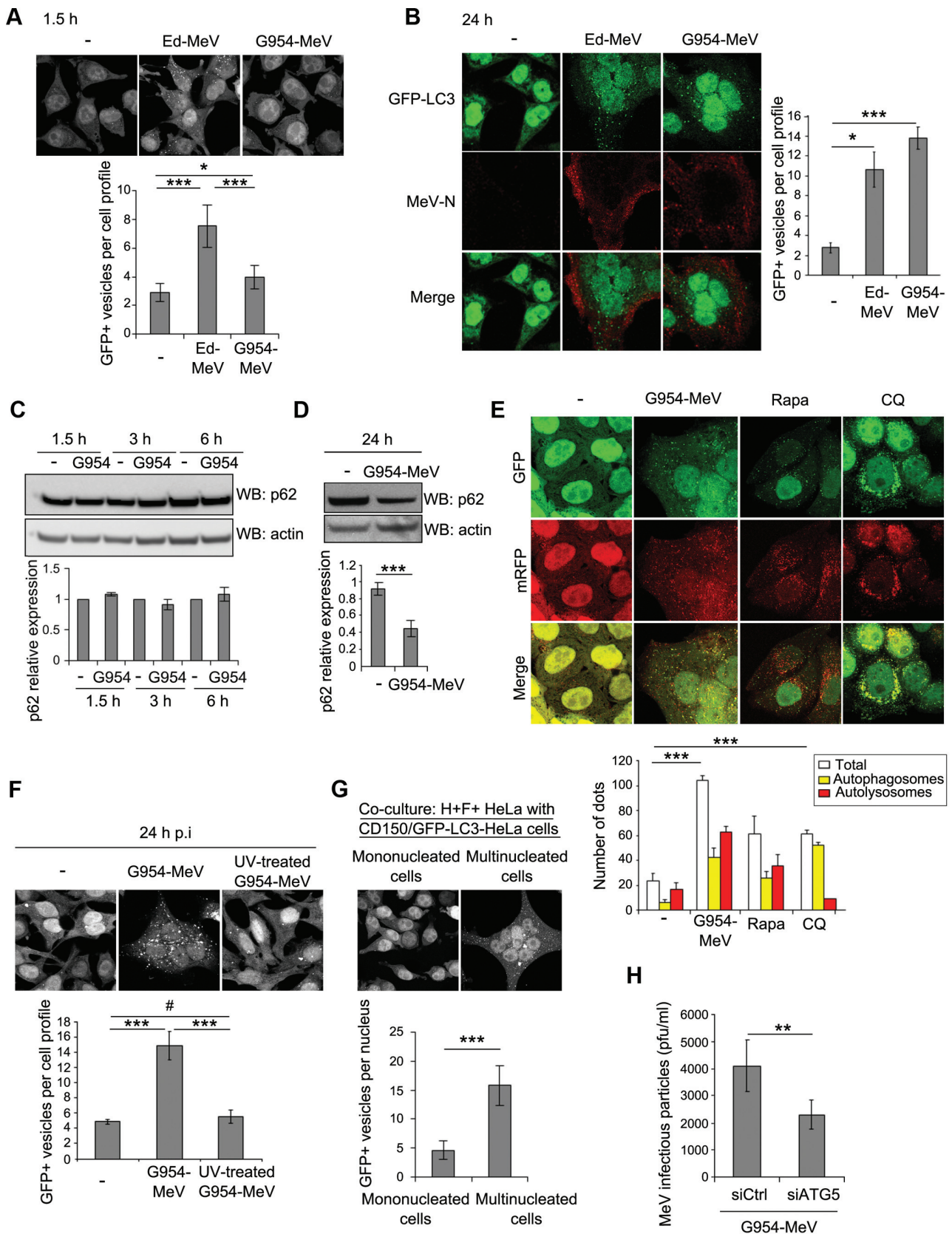
Strikingly, whereas the expression of MeV-C is required for the induction of the late autophagy wave in infected mononucleated cells, its expression is not critical for the induction of autophagy in syncytia. Indeed, we found that whereas Sch-MeV $\Delta$ C does not induce autophagy in mononucleated cells, autophagy was still observed in syncytia. Interestingly, it has recently been suggested that viruses of the *Morbillivirus* genus including MeV, could induce autophagy through a fusogenic dependent mechanism which requires the coexpression of MeV-F and MeV-H proteins [38]. Using an alternative approach to analyse autophagy, we found an increase of autophagosomes in multinucleated cells formed through a MeV-H/F proteins-mediated process. Furthermore, we found that the forced fusion between cells promoted by PEG-treatment induces autophagy. Thus, the plasma membrane perturbations/damages resulting from cell-cell fusion could be sufficient to trigger an autophagy signalling, with functions to eliminate/recycle excessive/redundant/damaged cytosolic materials within newly formed multinucleated cells. The upstream signals inducing autophagy subsequently to the fusion between cells remain to be investigated. Interestingly, it was proposed that



**Figure 6. MeV-induced autophagy prevents cell death.** (A–B) HeLa cells were treated with the indicated siRNA for 48 h and infected or not with Sch-MeV (MOI 0.1 for A and MOI 1 for B). (C–D) HeLa cells were treated or not with 250 nM rapamycin (Rapa) and infected or not with Sch-MeV (MOI 1). (A, C) 48 h post infection, cell death was analysed by trypan blue exclusion test. Graphs represent the percentage of dead cells compared to the number of total cells. Error bars, mean  $\pm$  SD of two independent experiments made in triplicate (A) and two independent experiments made in duplicate (C). (B, D) 48 h post infection, cell death was analysed by Annexin V and 7AAD staining. Representative results of two experiments made in duplicate are shown. (E) HeLa cells were treated with the indicated siRNA for 48 h and infected with Sch-MeV (MOI 0.1) and treated with DMSO or with 50  $\mu$ M Z-VAD. 48 h p.i., infectious viral particles were titrated by plaque assay. Error bars, mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Student's t test; \*\*\* $p$ <0.005; \*\* $p$ <0.01; \* $p$ <0.05; # $p$ >0.05. doi:10.1371/journal.ppat.1003599.g006

autophagy could play a role in syncytia formation [38]. Thus, an attractive hypothesis would be that during MeV infection, the MeV-C protein induces autophagy in infected cells through an IRGM-dependent pathway, which could contribute to the

facilitation of the syncytia formation. In turn, through a fusogenic process, syncytia formation could further increase autophagy in multinucleated cells leading to a positive feedback loop of autophagy induction, maintained by MeV-C expression. In





p.i. (B) CD150-transfected GFP-LC3-HeLa cells were infected with Ed-MeV at MOI 1 or with the virulent strain of G954-MeV at MOI 0.1. Autophagy was monitored by the numeration of GFP+ autophagosomes 24 h p.i. in infected cells detected by staining for the viral nucleoprotein N (MeV-N). (C) CD150-stably-expressing HeLa cells were infected with G954-MeV (MOI 1). At the indicated time points, cellular p62 expression was determined by western blot. Representative results are shown and are accompanied by a graph representing the intensity of p62 over actin expression normalized to the control condition (non infected). Error bars, mean  $\pm$  SD of two independent experiments. (D) CD150-transfected HeLa cells were infected with G954-MeV (MOI 0.1). 24 h p.i., cellular p62 expression was determined by western blot. Representative results are shown and are accompanied by a graph representing the intensity of p62 over actin expression normalized to the control condition (non infected). (E) CD150-transfected mRFP-GFP-LC3 HeLa cells were infected with G954-MeV (MOI 0.1) or treated with 250 nM Rapa or 75  $\mu$ M CQ during 2 h. 24 h p.i., the autophagic vesicles were analysed as in figure 4D. (F) CD150-transfected GFP-LC3-HeLa cells were infected with G954-MeV or UV-treated G954-MeV (MOI 0.1). 24 h post infection, the number of GFP+ vesicles per cell was assessed by confocal microscopy. (G) HeLa cells were co-transfected with a vector encoding for the H protein of KA-MeV (a CD150-dependent strain) and one encoding for the F protein of Ed-MeV. Autophagy was determined as in figure 3C. (H) CD150-transfected HeLa cells were treated with the indicated si-RNA for 48 h and infected with G954-MeV (MOI 0.1). Two days post infection, infectious viral particles were titrated by plaque assay. For each experiment (except for (C)), error bars, mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Student's t test; \*\*\*p<0.005; \*\*p<0.01; \*p<0.05; #p>0.05.  
doi:10.1371/journal.ppat.1003599.g007

accordance with this hypothesis, the number of syncytia is strongly reduced upon infection with Sch-MeV $\Delta$ C compared with wild type Sch-MeV (data not shown). Thus, whereas the first wave of autophagy triggered by the CD46-Cyt-1/GOPC pathway would concern exclusively the primary infected cells by infectious attenuated viral particles, the second wave is induced following MeV-C expression and would be maintained over time by syncytia formation.

MeV-induced syncytia were reported to be dynamic entities with an unusual extended life span [39]. Interestingly, we found that autophagy contributes to protect MeV-infected cells from apoptotic cell death. Thus autophagy induction in syncytia could delay MeV-induced cell death, and contribute to an efficient spreading of the virus. Indeed, we report that inhibition of apoptosis strongly facilitates MeV replication, what is not anymore modulated by additional autophagy inhibition. Furthermore, in support of this hypothesis MeV $\Delta$ C, which does not induce autophagy over basal level in mononucleated cells, presents a growth defect and induces more apoptosis in infected cells than wild type virus [40]. Thus, one way by which MeV exploits autophagy is by protecting infected cells from cell death which otherwise could limit viral replication and propagation of numerous infectious viral particles. Other viruses were recently described to manipulate autophagy in order to prevent cell death, as the human flavivirus dengue virus type 2 and the Chikungunya virus [41,42].

MeV infection induces an increase of the autophagy flux. However, MeV proteins are not degraded by autophagy what suggests that MeV proteins would escape from targeting towards autophagosomes. Indeed, colocalization between GFP-LC3 and the MeV-N protein was not observed. Furthermore, it has been recently reported that the *Morbillivirus* replication complex and autophagosomes do not colocalize [38]. However, we have shown that maturation of autophagosomes is necessary to promote the formation of infectious viral particles. Beyond delaying death of infected cells, productive autophagy could contribute to the generation of an excess of metabolites used by MeV to optimize its replication. Autophagy induced by Dengue virus infection is used to regulate cellular lipid metabolism to generate ATP and to promote viral replication [43]. As we found that MeV proteins synthesis is not modulated by autophagy, nucleic acids and/or lipids generated from autophagy-mediated recycling could be primary metabolites exploited to improve MeV replication and/or assembly. Alternatively, the different autophagy signalling triggered in the course of MeV infection might be required to coordinate different steps of the virus cycle. Indeed, productive autophagy has been shown to facilitate poliovirus replication, which gradually gets benefit of the complete autophagic process : whereas autophagosome formation is involved in the viral RNA synthesis and early phases of the virus cycle, the acidification of the

autolysosomes contributes to the final maturation of virus particles [44]. Similarly, autophagy impacts on the final maturation of infectious Dengue virus particles formation, as inhibition of autophagy leads to the production of noninfectious particles [45]. The contribution of the different autophagy signalings in MeV maturation remains to be investigated.

Our work describes the induction of successive molecular pathways contributing to autophagy in response to an infection by attenuated MeV. Whereas an early wave of autophagy induction is triggered by the host recognition of the pathogen, *via* CD46-Cyt-1/GOPC, a later one seems to be the result of a direct interaction of viral proteins with the autophagy machinery, and is sustained within syncytia. The sustained wave is exploited by attenuated as well as virulent strains of MeV to promote the production of infectious viral particles. The complete understanding of the complex relationship between autophagy and MeV might allow a better understanding of the contribution of autophagy for the attenuated or virulent characters of a pathogen, and a better usage of MeV-derived vaccine for therapy.

## Material and Methods

### Ethics statement

The experiments in this article were performed at Biological Safety Level 2 in accordance with the regulations set forth by the national French committee of genetics (commission de génie génétique).

### Cell culture

HeLa, GFP-LC3-HeLa and mRFP-GFP-LC3 HeLa cells were maintained in RPMI 1640, Vero cells were maintained in DMEM. All the media were supplemented with 50  $\mu$ g/mL gentamicin and 10% fetal bovine serum (FBS).

### MeV strains and titration by plaque assay

Ed-MeV was obtained from ATCC and G954-MeV was kindly provided by B. Horvat (INSERM U1111, France). HeLa cells were infected with MeV at the indicated MOI. After the indicated period of infection, cells were submitted to 5 cycles of freezing at  $-80^{\circ}$ C and defrosting at  $37^{\circ}$ C and infectious viral particles were quantified by limiting dilution on confluent Vero cells.

### SiRNA transfection

Smartpool siRNA targeting ATG5, ATG7 and GOPC, as well as control siRNA (AUACCUAACUGAUGAGACCUU) were from Dharmacon (Perbio, Brebières, France).  $0.1 \times 10^6$  HeLa, GFP-LC3 HeLa cells were plated in 6-well plates 24 hours prior to transfection with 100 pmol si-RNA using Lipofectamine RNAi-MAX (Invitrogen) according to manufacturer's instructions.

Protein expression level was assessed by western-blot three days post transfection.

### CD150 transfection

HeLa, GFP-LC3-HeLa and mRFP-GFP-LC3 HeLa cells were transfected with the plasmid pCAGGS-CD150, kindly provided by Y. Yanagi (Japan) [8], using lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. 24 h post transfection, CD150 expression was checked by FACS analysis after a staining using an anti-CD150-PE antibody and as a negative control an isotype antibody.

### Generation of stable cells expressing CD150

The lentiviral *peGAET-ires-puro* expression plasmids was a gift of P. Mangeot (ENS-Lyon, INSERM U1111, Lyon, France). To generate *peGAET-cd150-ires-puro* plasmid, *cd150* sequence was amplified by PCR and replaced the *tTA* sequence in *peGAET-ires-puro* into the *EcoRI* and *XhoI* restriction sites. Viral particles were commonly produced by cotransfection of 293T cells with lentiviral *peGAET-cd150-ires-puro* plasmid and the helper plasmids encoding the proteins required for vector packaging (Plateau AniRA Vectorologie UMS3444, US8). Supernatant was collected at days 2 post-transfection, filtered and concentrated by ultracentrifugation. GFP-LC3-HeLa and HeLa were transduced with concentrated viral particles in the presence of 8  $\mu\text{g/ml}$  polybrene (Sigma). 48 h post transduction, cells were treated with 1  $\mu\text{g/ml}$  puromycin for 10 days. Surviving clones were expanded in 1  $\mu\text{g/ml}$  puromycin and analysed for stable integration of the transgene and expression of CD150 protein by flow cytometry.

### MeV-H and MeV-F transfection

HeLa cells were co-transfected with the plasmid pCXN2-F (Edmonston strain), and either with the plasmid pCXN2-H (Edmonston strain) or pCXN2-H (KA strain) [37] using lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. 24 h post transfection, MeV-H and MeV-F expression were checked by FACS analysis using specific primary antibodies.

### Polyethylene glycol (PEG) treatment

GFP-LC3-HeLa cells were seeded in 25  $\text{cm}^2$  flask to be confluent the next day, in RPMI 10% FBS in absence of antibiotics. A PEG solution was prepared by mixing 10 g of autoclaved PEG 6000 (Sigma) with 10 ml of RPMI without FBS. The cells were washed twice with warmed PBS and then incubated 10 min at 37°C with PEG. The PEG was then removed and RPMI free of serum was added progressively onto the cells. This RPMI was then removed and replaced by 5 ml of RPMI 10% FBS for 4 hours. Finally, the cells were detached with Versene (Invitrogen) and plated in 24 well-plates on cover slips coated with Poly-L-Lysine and treated with rapamycin for 2 hours.

### Western blot

Cells were lysed with lysis buffer (PBS-1 $\times$ , NP40 1% or 0.5% and protease inhibitor (Roche)). Soluble proteins were separated by SDS-PAGE (NuPAGE Novex Tris-Acetate Mini Gels, Invitrogen) and transferred to nitrocellulose membranes with iblot Gel Transfer System (Invitrogen). Primary antibodies, anti-Actin (mouse monoclonal), anti-MeV-N (mouse monoclonal), anti-MeV-P (mouse monoclonal or rabbit polyclonal), anti-p62 (mouse monoclonal), secondary HRP linked anti-rabbit or HRP linked anti-mouse antibodies were used and antigen-antibody complexes were visualized by enhanced chemiluminescence.

### Confocal microscopy for autophagy analysis

After the indicated treatments, GFP-LC3-HeLa or mRFP-GFP-LC3 HeLa cells were fixed with 4% paraformaldehyde. For Measles nucleoprotein staining, an anti-MeV-N antibody (mouse monoclonal, clone 120 produced in the lab) was used at 10  $\mu\text{g/ml}$ , followed by secondary antibody conjugated to Alexa Fluor 568. Cells were analysed using a Confocal Axioplan2 LSM510 microscope (Zeiss, Göttingen, Germany) equipped with the LSM 510 META system (Zeiss) and mounted with an Axioscope 63 $\times$  oil immersion lens (Zeiss). The number of GFP + was numerated from one single plan section per cell and normalized to the number of nuclei. In the legend, a cell profile means "per nucleus" because for syncytia, number of GFP+ vesicles was normalized to the number of nuclei. In each case, number of GFP+ vesicles was numerated from 100 to 200 cells for each experiment.

### Trypan blue exclusion test of cell viability

Cells were mixed with 0.4% trypan blue (Gibco) and unstained (viable) and stained (nonviable) cells were numerated on a Bürker microscope slide (Marienfeld). For each condition, at least 100 cells have been numerated.

### Annexin V and 7AAD staining

Cells were stained with the PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen) according to manufacturer's instructions and cells were analysed by using an Accuri C6 flow cytometer and the C Flow software.

### Antibodies

Anti-MeV-N (mouse monoclonal, clone 120), MeV-H (mouse monoclonal, clone 55), anti-MeV-F (mouse monoclonal, clone Y503), and anti-GOPC (GOPC-GST rabbit anti-serum) were produced in the lab, anti-MeV-P (mouse monoclonal 49.21 or rabbit polyclonal J37171) were kindly provided by D. Gerlier (INSERM U1111, France). Anti-Actin (A2066), anti-ATG5 (A0856), anti-MAP1LC3B (L7543) and anti-ATG7 (A2856) were from Sigma (St Louis, Mo, USA). Anti-rabbit HRP (NA 934) or anti-mouse HRP (NA 931) were from Amersham Biosciences (Uppsala, Sweden). Anti-p62 (SQSTM1 (D-3): sc-28359) was from Santa Cruz Biotechnology (California, USA). Anti-mouse Alexa Fluor 568 was purchased from Invitrogen (Molecular Probes). Anti-CD150-PE (559592) was from BD Pharmingen and isotype (IOTest IgG2a (Mouse)-FITC/IgG1 (Mouse)-PE) was from Beckman Coulter (Immunotech SAS, Marseille, France).

### Reagents

Pharmacological reagents used were cycloheximide (C4859, Sigma), rapamycin (Calbiochem), chloroquine (C6628, Sigma) and Z-Val-Ala-DL-Asp(OMe)-fluoromethylketone (Z-VAD) (N-1560, Bachem).

### Supporting Information

**Figure S1 Effect of chloroquine during Ed-MeV infection.** GFP-LC3 HeLa cells were infected with Ed-MeV at MOI 1 and/or treated with 75  $\mu\text{M}$  Chloroquine (CQ). Autophagy was monitored by the numeration of GFP+ autophagosomes at the indicated period of time post infection. CQ was maintained all along during the culture. Representative profiles are shown and are accompanied by a graph representing the number of GFP+ vesicles per cell profile. Error bars, mean  $\pm$  MD of two independent experiments. (TIF)

**Figure S2 LC3-II expression during Ed-MeV infection.** GFP-LC3-HeLa cells were infected with Ed-MeV (MOI 1). At the indicated time points post infection, autophagy was assessed by measuring LC3 conversion by western blot. (TIF)

**Figure S3 Efficiency of siRNA.** HeLa cells were treated with the indicated siRNA. 48 h later, the expression of the respective proteins were assessed by western blot. (TIF)

**Figure S4 Efficiency of cycloheximide treatment.** GFP-LC3 HeLa cells were infected with attenuated Ed-MeV (MOI 3) in the presence of 1  $\mu\text{g/ml}$  or 0.5  $\mu\text{g/ml}$  cycloheximide (CHX). 24 h post-infection, cells were lysed and anti-N and anti-P western blot were performed to reveal MeV-N and MeV-P, respectively. Representative results are shown and are accompanied by a graph representing the intensity of MeV-N or MeV-P expression over cellular actin, and normalized to the control condition (DMSO treatment). Error bars, mean  $\pm$  SD of two independent experiments. Student's t test, \*\*\* $p < 0.005$ ; \* $p < 0.05$ . (TIF)

**Figure S5 FIP treatment does not affect MeV viral protein synthesis.** HeLa cells were infected or not with Ed-MeV (MOI 3) and treated or not with the FIP peptide (10  $\mu\text{g/ml}$ ). 24 h post-infection, cells were lysed and anti-N and anti-P western blot were performed to reveal MeV-N and MeV-P, respectively. Representative results are shown and are accompanied by a graph representing the intensity of MeV-N or MeV-P expression over cellular actin normalized to the control. (TIF)

**Figure S6 Expression of MeV-H and MeV-F on co-transfected cells.** (A) HeLa cells were co-transfected with a vector encoding for the H protein of Ed-MeV (A) or the H protein of KA-MeV (B), and one encoding for the F protein (A and B). 24 h post transfection, expression of MeV-H and MeV-F was measured by FACS analysis. (TIF)

**Figure S7 Ed-MeV particle formation is reduced in siATG7-treated cells.** (A) the efficiency of siATG7 treatment is shown by western blot, for one representative experiment. (B) HeLa cells were treated with the indicated siRNA for 48 h and infected with Ed-MeV (MOI = 2). Two days post infection viral particles were titrated by plaque assays. Error bars, mean  $\pm$  SD of six independent experiments. Student's t test; \*\*\* $p < 0.005$ . (TIF)

**Figure S8 Autophagy protects Sch-MeV $\Delta$ C infected cells from death.** (A) HeLa cells were treated with the indicated siRNA for 48 h and infected or not with Sch-MeV $\Delta$ C (MOI 0.1). (B) HeLa cells were treated or not with 250 nM rapamycin (Rapa) and infected or not with Sch-MeV $\Delta$ C (MOI 1). (A, B) 48 h post infection, cell death was analysed by trypan blue exclusion test. Graphs represent the percentage of dead cells compared to the number of total cells. Error bars, mean  $\pm$  SD of two independent experiments made in triplicate (A) and two independent experiments made in duplicate (B). (TIF)

**Figure S9 The virulent strain of measles virus does not induce autophagy in HeLa cells.** GFP-LC3 HeLa cells were infected with attenuated Ed-MeV (MOI 1) or with virulent G954-MeV (MOI 0.1). Autophagy was monitored by the numeration of GFP+ autophagosomes 24 h post infection in infected cells

detected by a staining for the viral nucleoprotein N (MeV-N). Representative profiles for each condition are shown and are accompanied by a graph representing the number of GFP+ vesicles per cell profile (= GFP+ vesicles per one nucleus). For syncytia, the number of dots was reported to the number of nuclei. Error bars, mean  $\pm$  SD of three independent experiments for no infection and G954-MeV and one experiment for Ed-MeV. Student's t test; # $p > 0.05$ . (TIF)

**Figure S10 Expression of CD150 on GFP-LC3 HeLa cells.** (A) GFP-LC3 HeLa cells were transfected with a vector encoding for the expression of human CD150. 24 h post transfection, CD150 cell surface expression was monitored by FACS. (B) GFP-LC3 HeLa cells were transduced with concentrated viral particles (peGAET-cd150-ires-puro plasmid) and CD150 was analysed by FACS on stably expressing CD150+ cells. (TIF)

**Figure S11 G954-MeV-induced autophagy is ATG5 dependent.** GFP-LC3-HeLa cells were treated with the indicated siRNA for 24 h and transfected with a vector encoding for CD150. Cells were then infected with G954-MeV at MOI 0.1 (24 h) and autophagy was monitored by the numeration of GFP+ autophagosomes. Representative profiles are shown and are accompanied by a graph representing the number of GFP+ vesicles per cell profile (= GFP+ vesicles per one nucleus). For syncytia, the number of dots was reported to the number of nuclei. Error bars, mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Student's t test; \*\*\* $p < 0.005$ . (TIF)

**Figure S12 The second autophagic wave induced by G954-MeV requires viral protein synthesis.** CD150-transfected GFP-LC3-HeLa cells were infected or not with G954-MeV (MOI 0.1) or treated with 125 nM Rapa and treated or not with 0.5  $\mu\text{g/ml}$  CHX. A staining against the MeV nucleoprotein N indicates infected cells. Representative profiles are shown and are accompanied by a graph representing the number of GFP+ vesicles per cell profile (= GFP+ vesicles per one nucleus). For syncytia, the number of dots was reported to the number of nuclei. Error bars, mean  $\pm$  SD of three independent experiments. Student's t test; \*\*\* $p < 0.005$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \* $p < 0.05$ ; # $p > 0.05$ . (TIF)

## Acknowledgments

We thank Dr. C. Viret for discussion and critical comments on the manuscript. We thank Drs. Y. Yanagi and D.C. Rubinsztein and B. Horvat for providing us with CD150, MeV-H and MeV-F-encoding vector, mRFP-GFP-LC3-HeLa cells and G954 strain of MeV, respectively. We acknowledge the framework of the LABEX ECOFECT (ANR-11-LABX-0042) of Université de Lyon, within the program "Investissements d'Avenir" (ANR-11-IDEX-0007) operated by the French National Research Agency (ANR), within which this work was performed. We also thank the imagery PLATIM (C. Chamot, C.Lionnet and O.Duc), the flow cytometry (T. Andrieu and S. Dussurgey) and the vectorology facilities (G. Froment, D. Nègre and C. Costa) of the SFR Biosciences Gerland.

## Author Contributions

Conceived and designed the experiments: CR CRC MFa. Performed the experiments: CR IPG PV OA JB MFL. Analyzed the data: CR MFa. Contributed reagents/materials/analysis tools: FT. Wrote the paper: CR MFa.

## References

- Moss WJ, Griffin DE (2012) Measles. *Lancet* 379: 153–164.
- Griffin DE (2010) Measles virus-induced suppression of immune responses. *Immunol Rev* 236: 176–189.
- Oldstone MB (2009) Modeling subacute sclerosing panencephalitis in a transgenic mouse system: uncoding pathogenesis of disease and illuminating components of immune control. *Curr Top Microbiol Immunol* 330: 31–54.
- Young VA, Rall GF (2009) Making it to the synapse: measles virus spread in and among neurons. *Curr Top Microbiol Immunol* 330: 3–30.
- Rall GF (2003) Measles virus 1998–2002: progress and controversy. *Annu Rev Microbiol* 57: 343–367.
- Moss WJ, Griffin DE (2006) Global measles elimination. *Nat Rev Microbiol* 4: 900–908.
- Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, et al. (1993) Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* 67: 6025–6032.
- Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y (2000) SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406: 893–897.
- Muhlebach MD, Mateo M, Sinn PL, Prufer S, Uhlig KM, et al. (2011) Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature* 480: 530–533.
- Noyce RS, Bondre DG, Ha MN, Lin LT, Sisson G, et al. (2011) Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog* 7: e1002240.
- Navaratnarajah CK, Leonard VH, Cattaneo R (2009) Measles virus glycoprotein complex assembly, receptor attachment, and cell entry. *Curr Top Microbiol Immunol* 329: 59–76.
- Navaratnarajah CK, Oezguen N, Rupp L, Kay L, Leonard VH, et al. (2011) The heads of the measles virus attachment protein move to transmit the fusion-triggering signal. *Nat Struct Mol Biol* 18: 128–134.
- Plumet S, Duprex WP, Gerlier D (2005) Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection. *J Virol* 79: 6900–6908.
- Gerlier D, Valentin H (2009) Measles virus interaction with host cells and impact on innate immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 329: 163–191.
- Gregoire IP, Richetta C, Meyniel-Schicklin L, Borel S, Pradezynski F, et al. (2011) IRGM Is a Common Target of RNA Viruses that Subvert the Autophagy Network. *PLoS Pathog* 7: e1002422.
- Joubert PE, Meiffren G, Gregoire IP, Pontini G, Richetta C, et al. (2009) Autophagy induction by the pathogen receptor CD46. *Cell Host Microbe* 6: 354–366.
- Levine B, Mizushima N, Virgin HW (2011) Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* 469: 323–335.
- Mizushima N, Levine B (2010) Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nat Cell Biol* 12: 823–830.
- Levine B, Klionsky DJ (2004) Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 6: 463–477.
- Lee HK, Lund JM, Ramanathan B, Mizushima N, Iwasaki A (2007) Autophagy-dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science* 315: 1398–1401.
- Richetta C, Faure M (2012) Autophagy in antiviral innate immunity. *Cell Microbiol* 15(3):368–76.
- English L, Chemali M, Duron J, Rondeau C, Laplante A, 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.
- Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, et al. (2005) Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 307: 593–596.
- Schmid D, Pypaert M, Munz C (2007) Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* 26: 79–92.
- Espert L, Codogno P, Biard-Piechaczyk M (2007) Involvement of autophagy in viral infections: antiviral function and subversion by viruses. *J Mol Med* 85(8):811–23.
- Meiffren G, Joubert PE, Gregoire IP, Codogno P, Rabourdin-Combe C, et al. (2010) Pathogen recognition by the cell surface receptor CD46 induces autophagy. *Autophagy* 6: 299–300.
- Gregoire IP, Rabourdin-Combe C, Faure M (2012) Autophagy and RNA virus interactions reveal IRGM as a common target. *Autophagy* 8: 1136–7.
- Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, et al. (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8: 445–544.
- Tatsuo H, Okuma K, Tanaka K, Ono N, Minagawa H, et al. (2000) Virus entry is a major determinant of cell tropism of Edmonston and wild-type strains of measles virus as revealed by vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing their envelope proteins. *J Virol* 74: 4139–4145.
- Kimura S, Fujita N, Noda T, Yoshimori T (2009) Monitoring autophagy in mammalian cultured cells through the dynamics of LC3. *Methods Enzymol* 452: 1–12.
- Sarkar S, Korolchuk V, Renna M, Winslow A, Rubinsztein DC (2009) Methodological considerations for assessing autophagy modulators: a study with calcium phosphate precipitates. *Autophagy* 5: 307–313.
- Berger SB, Romero X, Ma C, Wang G, Faubion WA, et al. (2010) SLAM is a microbial sensor that regulates bacterial phagosome functions in macrophages. *Nat Immunol* 11: 920–27.
- Chaturvedi A, Dorward D, Pierce SK (2008) The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyperresponses to DNA-containing antigens. *Immunity* 28: 799–809.
- Iacobelli-Martinez M, Nemerow GR (2007) Preferential activation of Toll-like receptor nine by CD46-utilizing adenoviruses. *J Virol* 81: 1305–1312.
- Petkova DS, Viret C, Faure M (2013) IRGM in autophagy and viral infections. *Front Immunol* 3: 426.
- Shaffer JA, Bellini WJ, Rota PA (2003) The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* 315: 389–397.
- Nakatsu Y, Takeda M, Ohno S, Shirogane Y, Iwasaki M, et al. (2008) Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins. *J Virol* 82: 8296–8306.
- Delpue S, Rudd PA, Labonte P, von Messling V (2012) Membrane fusion-mediated autophagy induction enhances morbillivirus cell-to-cell spread. *J Virol* 86: 8527–8535.
- Herschke F, Plumet S, Duhon T, Azocar O, Druelle J, et al. (2007) Cell-cell fusion induced by measles virus amplifies the type I interferon response. *J Virol* 81: 12859–12871.
- Takeuchi K, Takeda M, Miyajima N, Ami Y, Nagata N, et al. (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.
- McLean JE, Wudzinska A, Datan E, Quaglino D, Zakeri Z (2011) Flavivirus NS4A-induced autophagy protects cells against death and enhances virus replication. *J Biol Chem* 286: 22147–22159.
- Joubert PE, Werneke SW, de la Calle C, Guivel-Benhassine F, Giodini A, et al. (2012) Chikungunya virus-induced autophagy delays caspase-dependent cell death. *J Exp Med* 209: 1029–1047.
- Heaton NS, Randall G (2010) Dengue virus-induced autophagy regulates lipid metabolism. *Cell Host Microbe* 8: 422–432.
- Richards AL, Jackson WT (2012) Intracellular vesicle acidification promotes maturation of infectious poliovirus particles. *PLoS Pathog* 8: e1003046.
- Mateo R, Nagamine CM, Spagnolo J, Méndez E, Rahe M, et al. (2013) Inhibition of cellular autophagy deranges dengue virion maturation. *J Virol* 87: 1312–1321.

## **Rôle des récepteurs autophagiques dans la maturation des autophagosomes**

---

La xénophagie est une forme d'autophagie sélective permettant de capturer des pathogènes dans les autophagosomes et de les dégrader dans les autolysosomes. Cette sélectivité est assurée par une famille de protéines ; les récepteurs autophagiques qui reconnaissent des substrats cytosoliques d'un côté et les membres de la famille LC3 ancrés dans la membrane de l'autophagosome de l'autre. Parmi ces récepteurs, NDP52 cible la bactérie *Salmonella* Typhimurium vers l'autophagie.

Nous décrivons un rôle nouveau et inattendu pour NDP52 ; assurer la maturation d'autophagosomes durant l'infection par *Salmonella* mais aussi durant l'autophagie basale. De manière intéressante, ce rôle de NDP52 dans la maturation est indépendant de son rôle dans le ciblage de la bactérie puisque ces fonctions nécessitent des domaines et des partenaires moléculaires de NDP52 distincts. Nous montrons aussi que d'autres récepteurs peuvent participer à la maturation comme Optineurine. Ce travail montre donc que NDP52 assure deux rôles durant la xénophagie en ciblant les bactéries vers les autophagosomes en formation puis en promouvant la maturation de l'autophagosome. De plus, nous proposons un possible mécanisme de régulation de ces deux fonctions par des modifications post-traductionnelles des récepteurs autophagiques.

Ce travail démontre que les récepteurs autophagiques jouent des rôles au-delà du ciblage des pathogènes qui sont aussi cruciaux pour une xénophagie efficace. De plus, les récepteurs autophagiques sont aussi nécessaires pour le déroulement de l'autophagie basale. Ces travaux offrent une nouvelle compréhension de la régulation moléculaire de l'autophagie et de la xénophagie.

Mots clés : autophagie, xénophagie, récepteurs autophagiques, maturation autophagique, *Salmonella* Typhimurium

## **A role for autophagic receptors in autophagosome maturation**

---

Xenophagy relies on the ability of the autophagy process to selectively entrap intracellular pathogens within autophagosomes to degrade them into autolysosomes. The selectivity of the process relies on proteins named autophagy receptors that share the ability to recognise cytosolic cargos on one hand and autophagosome-bound members of the ATG8 family on the other. Among autophagy receptors NDP52 has been described to target *Salmonella* Typhimurium to the growing autophagosome.

We describe a new unexpected role for NDP52, as this receptor also regulates the maturation of *Salmonella*-containing autophagosomes and during ongoing autophagy. Interestingly, the role of NDP52 in maturation is independent from its role in targeting as they rely on different binding domains and protein partners. We also show that other autophagy receptors also mediate autophagosome maturation such as Optineurin. Therefore, our work shows that NDP52 plays a dual function during xenophagy first by targeting bacteria to growing autophagosomes and then by assuring autophagosome maturation. Moreover, we also provide insights as to how these dual roles are regulated by post-translational modifications of autophagy receptors.

This work demonstrates that autophagy receptors have other roles beyond pathogen targeting that are also crucial for an efficient xenophagy. Moreover, autophagy receptors are also necessary for autophagy completion in uninfected cells. These results strengthen our understanding of both ongoing autophagy and xenophagy molecular mechanisms.

Keywords: autophagy, xenophagy, autophagy receptors, autophagosome maturation, *Salmonella* Typhimurium