



HAL
open science

Caractérisation des réticulons chez *Caenorhabditis elegans*: spécificités tissulaires, rôle dans l'organisation du réticulum endoplasmique et lien avec l'autophagie

Vincent Scarcelli

► **To cite this version:**

Vincent Scarcelli. Caractérisation des réticulons chez *Caenorhabditis elegans*: spécificités tissulaires, rôle dans l'organisation du réticulum endoplasmique et lien avec l'autophagie. Organisation et fonctions cellulaires [q-bio.SC]. Université Paris Saclay (COmUE), 2019. Français. NNT: 2019SACLS200 . tel-03092298

HAL Id: tel-03092298

<https://theses.hal.science/tel-03092298>

Submitted on 2 Jan 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Caractérisation des réticulons chez *Caenorhabditis elegans* : spécificités tissulaires, rôle dans l'organisation du réticulum endoplasmique et lien avec l'autophagie

Thèse de doctorat de l'Université Paris-Saclay
Préparée à l'Université Paris-Sud

École doctorale n°577 : Structure et dynamique des systèmes vivants
(SDSV)
Spécialité de doctorat: Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée et soutenue à Gif-sur-Yvette, le 2 juillet 2019, par

Vincent Scarcelli

Composition du Jury :

Oliver Nüsse Pr, Université Paris-Sud (CNRS UMR 8000)	Président
Eric Chevet DR, Université Rennes 1 (Inserm U1242)	Rapporteur
Florence Solari CR, UCBL (CNRS UMR 5310, INSERM U1217)	Rapporteur
Etienne Morel CR, INEM (Inserm U1151, CNRS UMR 8253)	Examineur
Christophe Lefebvre MCU, Université Paris-Sud (CNRS UMR 9198)	Directeur de thèse

Equipe "Autophagie et
développement" de
Renaud Legouis



Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier la Ligue Nationale contre le Cancer et ses donateurs, sans lesquels je n'aurais pas pu réaliser ma thèse.

Je remercie les membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'évaluer mon travail ainsi que pour les retours pertinents, en particulier mes rapporteurs Florence Solari et Eric Chevet. Merci également aux membres de mon comité de thèse, Etienne Morel et Julien Dumont, pour la qualité de leur discussion scientifique et leurs encouragements à chaque occurrence.

Merci à l'ensemble des professeurs de science que j'ai pu avoir au cours de mon parcours, et qui ont contribué petit à petit à me diriger vers le chemin de la thèse. Je pense particulièrement à Mr. Torres, en 3^e, qui m'a fait découvrir un goût certain pour le raisonnement scientifique.

Merci à l'ensemble du personnel de l'I2BC, en particulier le département de biologie cellulaire, qui m'a aidé depuis la préparation de mon oral de M2 jusqu'à financer les derniers mois de ma thèse, ainsi qu'aux membres de la plateforme Imagerie-Gif, toujours disponibles. Merci aux équipes de « mouches », voisines, pour leur bonne humeur, en particulier à Sophie, Laurine et Charlotte, pour leur attention.

Merci aux membres fondateurs de YOUR-I2BC ainsi que les bureaux suivants, notamment Laurine, Charbel, Diletta ou Mahnaz, pour avoir contribué à mettre en place une bonne ambiance parmi les jeunes chercheurs de l'I2BC. Je suis satisfait de voir que cette association continue d'être dans de bonnes mains.

Merci à ma famille, mes parents et mon frère Hugo, pour leur soutien et pour avoir supporté mes sautes d'humeur, pas nécessairement liées à la thèse par ailleurs.

Merci à mes amis pour avoir été présents et attentifs lorsque j'en ai eu besoin. Je pense en particulier à Alexandre et Thomas, à Jasmin, à Claire, à Philippine, à Kim, à Emilie, à Coralie-Anne. Un grand merci à Arthur pour m'avoir accompagné durant les différentes épreuves traversées et de m'avoir permis de relativiser différents aspects de la thèse.

Merci à Aurélie d'avoir partagé mon quotidien pendant ces années de thèse, et d'avoir été ma principale source d'encouragements. Je t'en serai toujours reconnaissant.

Merci à l'équipe « Autophagie et développement », à ses membres passés et présents, pour m'avoir accueilli et fait grandir.

Merci à Christophe de s'être lancé pour moi dans l'aventure de l'encadrement d'une thèse, suite à un M2 assez laborieux, dans tous les sens du terme. Merci pour ton soutien, tes encouragements, tes critiques méritées, et surtout ta confiance, ce qui a grandement participé au fait que j'arrive à faire de la bonne science.

Govswavp\$woqgswwsahsnbeuAsvg\$sutgAqujpjKvsg\$wv\$wawatèsAg\$rbJaFtjuaKweGt

Merci à Renaud d'avoir accepté de voir débarquer en urgence un stagiaire de M1 qui finira par devenir doctorant dans l'équipe. Je retiendrai particulièrement ton envie de partage et de débats. Christophe et toi avez significativement participé à mon développement scientifique et personnel. Rbu\$Dg\$ofAnmgvJafpeJqjv\$Hqvt\$Kvpelwt\$ffKahnbugt

Merci à Emmanuel d'avoir été mon premier encadrant, en M1, d'avoir amélioré ma rigueur scientifique en étant exigeant mais juste.

Rsîtf\$wowancdzkog\$HcshpAu\$SupMtdg\$vaêpfJxfofFvt

Merci à Céline L. pour avoir su être présente et rassurante dès les premiers moments difficiles, et pour avoir toujours été compréhensive. Sans Maman Céline, ma thèse aurait été plus difficile !

RfteMabw\$EkmkfMaeg\$LqvvfKamgtqepwmwwsu\$

Merci à Céline J. pour sa pugnacité mêlée de bienveillance. Merci à Marie-Hélène et Magali pour leurs échanges durant les lab-meetings. Merci à Siham pour son enthousiasme et sa curiosité. Merci à Chen pour sa gentillesse, son envie de partage et sa bonne humeur.

C\$npLaph\$AefabFf\$c\$DquapxatobDn\$svvtgt

Enfin, merci à Romane, pour toujours irradier de bienveillance, et pour tout le reste. Je ne pourrai pas t'oublier.

RmwuGv\$dfLg!aqsu\$xsskngoLawtbA?\$hpFf\$fvqdbvfsw

Sommaire

LISTE DES FIGURES	3
ABBREVIATIONS.....	5
AVANT-PROPOS	11
INTRODUCTION	15
I/ LE RETICULUM ENDOPLASMIQUE, ORGANITE OMNIPRESENT DANS LA CELLULE.....	17
1. DES FONCTIONS FONDAMENTALES POUR LA CELLULE.....	18
A- SYNTHÈSE ET CONFORMATION DES PROTÉINES.....	18
B- BIOSYNTHESE DES LIPIDES	20
C- MÉTABOLISME DU CALCIUM	21
2. UNE STRUCTURE DU RE COMPLEXE, RÉGULÉE, AU SERVICE DE SES FONCTIONS.....	22
A- TUBULES DE RE	22
B- FEUILLETS DE RE	25
C- RELATION ENTRE STRUCTURE ET FONCTION.....	27
D- SITES DE CONTACT MEMBRANAIRES	27
<i>Sites de contact avec les mitochondries.....</i>	<i>28</i>
<i>Sites de contact avec la membrane plasmique</i>	<i>30</i>
<i>Autres sites de contact.....</i>	<i>33</i>
3- DYNAMIQUE DU RESEAU ET HOMEOSTASIE DU RE	35
A- AU COURS DU CYCLE CELLULAIRE	35
B- SUITE AU STRESS DU RETICULUM ENDOPLASMIQUE.....	38
II/ LES RETICULONS, UNE CLASSE DE PROTÉINES STRUCTURANT LES TUBULES DE RE	43
1. UNE STRUCTURE PARTICULIÈRE DES RETICULONS, PRÉSENTS CHEZ TOUS LES EUCARYOTES	44
A- UNE FAMILLE DE PROTÉINES CONSERVÉE AU COURS DE L'ÉVOLUTION CHEZ LES EUCARYOTES.....	44
B- LES DOMAINES CARACTÉRISTIQUES DES RETICULONS LEUR CONFÈRENT UN RÔLE DANS LA FORMATION DE TUBULES DE RE	46
C- AUTRES ASPECTS FONCTIONNELS DES RETICULONS.....	49
2. LOCALISATION DES DIFFÉRENTS RETICULONS.....	51
A- LOCALISATION SUBCELLULAIRE DES RETICULONS	51
B- PATRONS D'EXPRESSION DES DIFFÉRENTS RETICULONS ET DE LEURS ISOFORMES.....	51
III/ L'AUTOPHAGIE, PROCESSUS DÉGRADATIF CLÉ DES CELLULES EUCARYOTES	56
1. GÉNÉRALITÉS	56
A- MACHINERIE MOLECULAIRE.....	60
<i>Etapas précoces de l'autophagie.....</i>	<i>61</i>
<i>Fusion avec le lysosome et dégradation.....</i>	<i>62</i>
<i>Acteurs de la régulation de l'autophagie.....</i>	<i>64</i>
B- FONCTIONS PHYSIOLOGIQUES DANS LA DIFFÉRENTIATION	65
C- PATHOLOGIES LIÉES À L'AUTOPHAGIE.....	68
2. AUTOPHAGIE SÉLECTIVE	71
A- TYPES D'AUTOPHAGIE SÉLECTIVE	72
B- RE-PHAGIE, DÉGRADATION SÉLECTIVE DU RE PAR AUTOPHAGIE	79

3. L'AUTOPHAGIE CHEZ CAENORHABDITIS ELEGANS	85
REVUE.....	87
APPROACHES FOR STUDYING AUTOPHAGY IN C. ELEGANS.....	87
PROBLEMATIQUE.....	107
RESULTATS.....	109
PARTIE I : LES ISOFORMES COURTES DE RET-1, PROTEINE DE LA FAMILLE DES RETICULONS, SONT IMPLIQUEES DANS LA MISE EN FORME DU RESEAU DE TUBULES DE RE, MAIS PAS DANS LA BIOGENESE DES AUTOPHAGOSOMES CHEZ C. ELEGANS	110
MANUSCRIPT	115
SHORT ISOFORMS OF RETICULON PROTEIN RET-1/RTN4 ARE INVOLVED IN THE SHAPING OF ER-TUBULES NETWORK BUT NOT IN AUTOPHAGOSOME BIOGENESIS IN C. ELEGANS.	115
PARTIE II : RESULTATS COMPLEMENTAIRES	163
A- RET-1 ISOFORMES C ET D SONT DES INTERACTEURS POTENTIELS DE LGG-1.....	163
B- OBTENTION PAR CRISPR-CAS9 DE SOUCHES DE VERS EXPRIMANT DIFFERENTES ISOFORMES DE RET-1 FUSIONNEES A DES PROTEINES FLUORESCENTES, SOUS LE CONTROLE DES PROMOTEURS ENDOGENES.....	165
C- L'INTERACTION ENTRE LGG-1 ET RET-1 CONDUIT-ELLE A DE LA RE-PHAGIE CHEZ C. ELEGANS ?	170
PARTIE III : L'AUTOPHAGIE MODULE L'EXPOSITION DE LA PHOSPHATIDYLSERINE ET LA DEGRADATION DU PHAGOSOME PENDANT L'APOPTOSE VIA DES FONCTIONS SPECIFIQUES DE GABARAP/LGG-1 ET LC3/LGG-2 . 173	
A- LGG-1 EST ENRICHI DANS LES CORPS APOPTOTIQUES ET LGG-2 DANS LES CELLULES PHAGOCYTAIRES... 173	173
B- LES LOCALISATIONS DE LGG-1 ET LGG-2 DEPENDENT DE LA VOIE AUTOPHAGIQUE CANONIQUE..... 173	173
C- LGG-1 ET LGG-2 SONT NECESSAIRES POUR LA DEGRADATION DES CORPS APOPTOTIQUES..... 174	174
D- LGG-1 EST IMPLIQUE DANS L'EXPOSITION DE LA PHOSPHATYDILSERINE. 174	174
E- LGG-2 EST IMPLIQUE DANS LA FUSION DES LYSOSOMES ET DU PHAGOSOME. 174	174
PUBLICATION	177
AUTOPHAGY MEDIATES PHOSPHATIDYLSERINE EXPOSURE AND PHAGOSOME DEGRADATION DURING APOPTOSIS THROUGH SPECIFIC FUNCTIONS OF GABARAP/LGG-1 AND LC3/LGG-2.	177
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	195
I. QUEL ROLE MECANISTIQUE RET-1 A DANS L'ORGANISATION DU RE ?.....	196
II. LES DIFFERENTES ISOFORMES DE RET-1 ONT-ELLES DES FONCTIONS SPECIFIQUES ?	198
III. RET-1C/D, UN NOUVEAU RECEPTEUR DE LA RE PHAGIE ?.....	201
A- QUELLES RELATIONS POSSIBLES ENTRE RE ET AUTOPHAGIE ?	201
B- QUELLES APPROCHES POUR CONFIRMER L'INTERACTION RET-1/LGG-1 ET EN DETERMINER LE ROLE ?... 202	202
BIBLIOGRAPHIE.....	207

Liste des figures

FIGURE 1 : LE RESEAU DE RETICULUM ENDOPLASMIQUE DANS LA CELLULE.....	17
FIGURE 2 : LA TRANSLOCATION CO-TRADUCTIONNELLE DANS LE RE DES PROTEINES A PEPTIDE SIGNAL.....	19
FIGURE 3 : DIFFERENTES PROTEINES DU RE ORGANISENT LA STRUCTURE ET LA MORPHOLOGIE DU RESEAU.....	23
FIGURE 4 : L'ORGANISATION DU RE DEPEND DE DIFFERENTES CLASSES DE PROTEINES	26
FIGURE 5 : LES DIFFERENTS SITES DE CONTACT RE-ORGANITES DANS LES CELLULES	28
FIGURE 6 : IMAGES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DES SITES DE CONTACT MEMBRANAIRES RE-MITOCHONDRIES,	30
FIGURE 7 : SITES DE CONTACT RE-MEMBRANE PLASMIQUE DANS LES NEURONES	32
FIGURE 8 : IMAGES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DES SITES DE CONTACT MEMBRANAIRES RE-GOLGI	33
FIGURE 9 : IMAGES DE MICROSCOPIE ELECTRONIQUE DES SITES DE CONTACT RE-GOUTTELETTES LIPIDIQUES	35
FIGURE 10 : L'INDUCTION DE L' UPR VIA IRE1	40
FIGURE 11 : L'ACTIVATION DE LA VOIE PERK.	41
FIGURE 12 : L'ACTIVATION DE LA VOIE ATF6.....	42
FIGURE 13 : ANALYSE PHYLOGENETIQUE DES RHD DE DIFFERENTS RETICULONS.....	45
FIGURE 14 : STRUCTURE DES RETICULONS DANS LES MEMBRANES.....	46
FIGURE 15 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE L'INSERTION DE RTN13 DANS LES MEMBRANES.....	47
FIGURE 16 : L'ISOFORME G DE RET-1 EST EXPRIMEE DANS LES NEURONES.....	52
FIGURE 17 : WESTERN-BLOT A PARTIR DE LYSATS DE TISSUS DE SOURIS ADULTES SAUVAGES (WT) OU MUTANTES NULLES RTN3.....	53
FIGURE 18 : PRINCIPAUX SYSTEMES DE DEGRADATION DANS LES CELLULES EUCARYOTES	57
FIGURE 19 : FORMATION DES AUTOPHAGOSOMES ET APPORT DE MEMBRANE AU PHAGOPHORE.	59
FIGURE 20 : LES DIFFERENTES ETAPES DE LA VOIE AUTOPHAGIQUE.	60
FIGURE 21 : INITIATION DE L' AUTOPHAGIE CHEZ LES MAMMIFERES EN CAS DE STARVATION.....	62
FIGURE 22 : PRINCIPE GENERAL DE L' AUTOPHAGIE SELECTIVE.	72
FIGURE 23 : PRINCIPE GENERAL DE LA MITOPHAGIE CHEZ LES MAMMIFERES.	75
FIGURE 24 : VOIES DE DEGRADATION DES GOUTTELETTES LIPIDIQUES.....	78
FIGURE 25 : LE RETICULON-LIKE ATG40 PERMET L'ELIMINATION DU RE TUBULAIRE ALORS QUE LE RECEPTEUR ATG39 PERMET LA DEGRADATION DU RE PERINUCLEAIRE	80
FIGURE 26 : RECEPTEURS DE LA RE-PHAGIE CHEZ LA LEVURE ET LES MAMMIFERES.....	80
FIGURE 27 : ROLES CONNUS DE FAM134B DANS LA RE-PHAGIE DES FEUILLETS DE RE ET L'ELIMINATION DES PROCOLLAGENES.	81
FIGURE 28 : L'ELIMINATION DES TUBULES DE RE PAR LE RETICULON RTN3L ET LE RECEPTEUR ATL3.....	83
FIGURE 29 : CYCLE DE DEVELOPPEMENT DE C. ELEGANS ET IMPLICATIONS DEVELOPPEMENTALES DE L' AUTOPHAGIE	85
FIGURE 30 : LES ISOFORMES C ET D DE RET-1 SONT DES INTERACTEURS POTENTIELS DE LGG-1.	164
FIGURE 31 APPROCHE DE CO-CRISPR CHEZ C. ELEGANS.....	166
FIGURE 32 : STRATEGIE D'INSERTION DE LA GFP AU LOCUS RET-1 PAR CRISPR-Cas9.....	167
FIGURE 33 : STRATEGIE D'INSERTION DE LA GFP AU LOCUS RET-1 PAR CRISPR-Cas9, EN C-TERMINAL.....	168
FIGURE 34 : STRATEGIE D'INSERTION DE LA GFP OU DE LA mCherry AU LOCUS RET-1 PAR CRISPR-Cas9,.....	168
FIGURE 35 : LES REARRANGEMENTS DE RE EN FORME DE CERCLE SE PRODUISENT LA OU LES TUBULES DE RE CIRCONSCRIVENT LES ORGANITES COMME ICI LES ENDOSOMES	197
FIGURE 36 : LA DEPLETION EN Vmp1 ENTRAINE L' APPARITION DE STRUCTURES EN ANNEAUX EN CONTACT DES GOUTTELETTES LIPIDIQUES	198
FIGURE 37 : RET-1 A UN ROLE DANS LA GUIDANCE DES AXONES DES NEURONES HSN.....	200

Abbréviations

3-MA : 3-MéthylAdénine
A β : Amyloïdes- β
ACBD5 : Acyl-Coenzyme A Binding Domain containing protein 5
ADN : Acide DésocyriboNucléique
AIM : Atg8-Interacting Motif
ALS : Sclérose Amylotrophique Latérale
ALFY : Autophagy-Linked FYVE protein
AMBRA1 : Activating Molecule in Beclin-1-Regulated Autophagy
AMPK : AMP-activated protein Kinase
APH : Hélice AmPhiphatique
Arl6 : ADP-ribosylation factor-like protein 6
ARN : Acide RiboNucléique
ARNi : Acide RiboNucléique interférent
ARNm : Acide RiboNucléique messenger
ATF6 : Activating Transcription Factor 6
ATG : AuTophagy-related
ATL1/2/3 : ATLastine
ATP : Adénosine TriPhosphate
BACE1 : Beta-site Amyloid precursor Cleaving Enzyme 1
BCL-2 : B-Cell Lymphoma 2
BEC-1 : Beclin-1
BiP : Binding immunoglobulin Protein
BNIP3 : Bcl2 interacting protein 3
CALCOCO2 : CALcium binding and COiled-COil Domain 2
CaV1.1 : Voltage-gated calcium channel alpha 1S
CCPG1 : Cell Cycle Progression Protein 1
CED : Cell death
C. elegans : *Caenorhabditis elegans*
CERT : Ceramide Transport Protein
CICR : Ca²⁺-induced Ca²⁺ release
CLEM : Correlative Light Electronic Microscopy
Climp : Cytoskeleton-linking membrane protein
CMA : Chaperon-Mediated Autophagy
COS-7 : CV-1 in Origin Simian - African green monkey kidney line
CRAC : Ca²⁺ release activated channels
CRACR2A/ B : Ca²⁺ release-activated
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short
Cvt : Cytoplasm to vacuole targeting
DAG : DiAcylGlycérol
DGAT :DiAcylGlycérol O-acylTransférase
DIC : Differential interference contrast
DNM1L : Dynamin 1 Like
DP1 : Deleted in Polyposis 1
Drp1 : Dynamin related protein 1
DTT : DithioThréiTol
EB1 : End Binding 1
eIF2 α : Eukaryotic Initiation Factor 2
EN : Enveloppe Nucléaire
EPG : Ectopic P Granules
ERAD : ER-associated degradation
ERES : ER exit sites
ERGIC : compartiment intermédiaire RE-Golgi
ERMES : ER-Mitochondria Encounter Structure
ESCRT : Endosomal Sorting Complexes Required for Transport
E-Systs : synaptotagmines-likes
FAM134B : FAMily with sequence similarity 134 member B
FATP1 : Fatty Acid Transport Protein 1
FFAT : Motif Phénylalanine dans un tract acide

FGF : Fibroblast Growth Factor
FIP200 : focal adhesion kinase FAK family kinase interacting protein of 200 kDa
FIR : FIP200 Interacting Region
FRAP : Fluorescence Recovery After Photobleaching
FUNDC1 : FUN14 Domain Containing 1
GABARAP : Gamma-Aminobutyric Acid type A Receptor-Associated Protein
GABARAP-L1 : GABARAP-like 1
GDP : Guanosine Di-Phosphate
GFP : Green Fluorescent Protein
GIM : GABARAP Interacting Motifs
GRAMD : Gram Domain Containing
GTP : Guanosine Tri-Phosphate
HEK-293 : Human Embryonic Kidney 293 cells
HeLa : Henrietta Lacks
HOPS : homotopic fusion and protein sorting
HSAN 1 : Human protein N-terminal acetyltransferase hNaa50p
HSC-70 : Heat Shock Cognate 70
HRP : horseradish peroxidase
HSN : neurones moteurs spécifiques des hermaphrodites
HSP : Paraplégie Spastique Hériditaire
HTT : Huntingtine
IFNG : Interféron gamma
IFT20 : intraflagellar transport 20
IGF : insulin-like growth factor
IRE1 : inositol requiring enzyme 1
IP3 : Inositol triphosphate
IP3R : Recepteur Inositol Triphosphate
kDa : kiloDalton
KIF5 : Kinesin family member 15
LAAT-1 : Lysosomal amino acid transporter 1
LAM6/LTC1 : Lipid Transfert at Contact sites 1
LAMP-2A : Lysosome Associated Membrane Protein type 2A
LAP : LC3-associated phagocytosis
LC3A/B/C : light chain 3
LD : Lipid Droplets
LGG : LC3, GABARAP, GATE-1
LIR : LC3-interacting region
MAM : Mitochondria associated membranes
MAP1A/B/S : Microtubule associated protein A1
ME : microscopie électronique
MP : membrane plasmique
MS : sclérose multiple
MSP : Major Sperm Protein
MT : Microtubules
mTOR : mammalian target of rapamycin
MDV : mitochondria derived vesicles
NBR1 : neighbor of BRAC1 gene
NDP52 : nuclear dot protein 52
NEBD : Nuclear envelope breakdown
NHEJ : Non Homologous End Joining
Nir2 : N-terminal domain-interaction receptor 2
Nogo-A : Neurite outgrowth inhibitor-A
NS3A : Nonstructural protein 3
NSF : N-ethylmaleimide-sensitive factor
NUC-1 : NUClease 1
OFD1 : Oral-Facial-Digital syndrome 1
OPTN : Optineurin
ORP : OSBP-Related Proteins
OSBP : OxySterol Binding Protein
Osh3 : OxySterol binding protein Homolog 3

PAM : Protospacer Adjacent Motif
Parkin / PKR : E3 Ubiquitin ligase parkin
PAS : Structure Pré-Autophagosomale
PC12 : Pheochromocytoma 12
PDI : Protéine Disulphide Isomérase
PE : PhosphatidylEthanolamine
PEX3/19 : PEroXisomal biogenesis factor
PERK : Protein Kinase RNA-activated-like ER Kinase
PGAM5 : Phosphoglycerate Mutase Family member 5
PHB2 : ProHiBitine 2
PI : Phosphatidylinostitol
PI3K : PhosphoInositide 3-Kinase
PINK1 : PTEN-induced putative kinase 1
PI4P : Phosphatidylinositol-4-Phosphate
PIP2 : Phosphatidylinositol 4,5 biphosphate
PLC : PhosphoLipase C
PLNs : PerLipINes
PolyQ : Polyglutamines
PRKN : PARKIN
PS : Phosphatidylsérine
PtdCho : Phosphatidylcholine
PtdEtn : PhosphatidylEthanolamine
Rab7/10 : Ras-related protein Rab-7
RE : Reticulum Endoplasmique
RET-1 : Reticulon 1
RHD : domaine d'homologie aux réticulons
RHOT1 : Ras Homolog Family Member T1
REEP : Receptor expression-enhancing protein
REL : Réticulum Endoplasmique lisse
RER : Réticulum Endoplasmique Rugueux
RETREG1 : RETiculophagy REGulator 1
RHD : Reticulon Homology Domain
RHOT1 : Ras Homolog Family Member T1
RIDD : Regulated IRE1-Dependant Decay
ROL : ROMane Leboutet
ROS : espèces réactives de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
RS : Reticulum Sarcoplasmique
RTNL : ReTiculoN Like
Sec61/62 : Sec61 translocon alpha 1 subunit
SERCAs : Sarcoendoplasmic Reticular Ca²⁺ ATPases
SLA : Sclérose Latérale Amyotrophique
SNARE : Soluble NSF Attachment protein Receptor
SNC : système nerveux central
SNCA : Synuclein Alpha
S. typhimurium : *Salmonella enterica sérotype Typhimurium*
SOCE : Store-operated Ca²⁺ entry
SP12 : Signal peptidase 12kDa
SRP : Signal recognition particle
STIM1 : Stromal interaction molecule 1
STX17 : SynTaXin 17
SQST-1 : SeQueSTosome 1
TAC : Tip Attachment Complex
TAG : TriAcylGlycerides
TBK1 : Sérine thréonine protein kinase
TFEB : Transcription factor EB
TOM : Translocase of the Outer Membrane
TMEM : TransMEMbrane protein
Tcbs : Tricalbines
TRIM16 : Tripartite motif- containing protein 16
ULK : Unc-51-Like Kinase 1

UNC : UNCoordinated 51
UPR : Unfolded Protein Response
VAMP : associated proteins, VAPa et VAPb
VAPs : Vesicles Associated Membrane Protein
VDAC : Canal Voltage-Dépendant Anion-Sélectif
VMP : Vacuolar Membrane Protein
VPS : Vacuolar Protein Sorting
WIPI : WQ-40 repeat containing protein that interacts with PI
Wnt : Wingless iNTegration 1 pathway
XBP1 : X-box Binding Protein 1
YOP1 : YIP One Partner 1

Avant-propos

L'étude de l'autophagie connaît une importance croissante dans le domaine de la biologie cellulaire. L'intérêt que porte la communauté scientifique pour sa compréhension est notamment illustré par l'attribution du prix Nobel de médecine à Yoshinori Ohsumi, principal découvreur des gènes de l'autophagie chez la levure. De nombreux travaux mettent en évidence un lien entre l'autophagie et sa régulation et de nombreux processus biologiques ayant des implications physiopathologiques.

Dans ce contexte, notre équipe, « Autophagie et développement », dirigée par Renaud Legouis, met à profit le modèle biologique *Caenorhabditis elegans* afin d'étudier les aspects cellulaires et développementaux de l'autophagie. Cette thématique d'étude, développée depuis de nombreuses années, a conduit l'équipe à générer des outils génétiques, cellulaires et moléculaires. Au cours de mes années de thèse, plusieurs projets ont cohabité au sein de l'équipe. Concernant l'aspect développemental de l'autophagie, l'équipe a voulu déterminer l'implication des protéines autophagiques au cours de la dégradation des corps apoptotiques, qui résultent de l'apoptose de cellules déterminées au cours du développement. J'ai contribué à cette étude parallèlement à mon projet principal, notamment par le développement des approches de vidéo-microscopie. Elle a conduit à une publication dans *Autophagy*, en 2018 (Jenzer *et al*, 2019). Je présente cet article, en particulier ma contribution à celui-ci, dans mon manuscrit de thèse, en fin de partie « Résultats ». Les autres projets concernent l'étude de la dégradation sélective de l'autophagie et s'articule autour de deux axes : d'une part, l'étude des fonctions moléculaires des protéines autophagiques des protéines LGG-1 et LGG-2, et d'autre part la dégradation sélective par autophagie d'organites. Cet axe comporte l'étude de la dégradation sélective des mitochondries par autophagie, portée par une autre étudiante doctorante de l'équipe, Yanfang Chen, et celle de la relation entre le réticulum endoplasmique et l'autophagie, mon projet. Celui-ci nous a mené à nous intéresser plus particulièrement au locus *ret-1*, seul locus conduisant à l'expression de protéines réticulons chez *C. elegans*. L'introduction de ma thèse concerne ce projet.

J'ai donc organisé mon introduction en traitant d'abord du réticulum endoplasmique, à travers ses fonctions, sa structure, sa dynamique et son homéostasie. Je présente ensuite la famille de protéines réticulons, leurs particularité, l'évolution de cette famille, leurs rôles et leurs implications physiopathologiques. Par la suite, je décris l'autophagie, le processus et la machinerie moléculaire impliquée, et en aborde certains aspects physiologiques et pathologiques, avant de détailler les processus d'autophagie sélective. Je détaille plus particulièrement ce qui est actuellement connu sur la RE-phagie et les différents acteurs de celle-ci. Enfin, par

l'introduction d'une revue bibliographique pour laquelle je suis co-premier auteur, « *Approaches for studying Autophagy in Caenorhabditis elegans* », j'aborde les spécificités de *C. elegans* en tant que modèle, les différents processus physiologiques chez celui-ci impliquant l'autophagie, ses acteurs moléculaires de l'autophagie, ainsi que les différentes approches possibles afin d'étudier cette dernière. Le RE, les réticulons et l'autophagie ayant un lien avec certaines pathologies neurodégénératives, j'ai choisi d'évoquer particulièrement celles-ci lorsque je mentionne les aspects pathologiques.

Après la présentation de ma problématique d'étude, les résultats obtenus dans le cadre de mon projet principal sont présentés sous forme d'un manuscrit en anglais, que nous souhaitons soumettre très prochainement, à la suite duquel j'ajoute des résultats complémentaires. Comme indiqué, l'article « *Autophagy mediates phosphatidylserine exposure and phagosome degradation during apoptosis through specific functions of GABARAP/LGG-1 and LC3/LGG-2* » est présenté ensuite.

Dans la partie discussion, je présente des pistes de réflexion sur les résultats que j'ai obtenus dans le cadre de mon projet. En mettant en relation les résultats obtenus chez de nombreuses espèces, j'apporte des éléments de réponses aux questions restées en suspens, et je présente des perspectives pour l'équipe afin de répondre à celles-ci.

Introduction

I/ Le réticulum endoplasmique, organite omniprésent dans la cellule

Le réticulum endoplasmique (RE) est un organite aux multiples rôles présent uniquement dans les cellules eucaryotes. Observé pour la première fois en 1857 par microscopie optique dans les glandes salivaires de diverses espèces par Charles Garnier, il est d'abord nommé ergatoplasme. Emilio Verratti observa lui le réticulum sarcoplasmique en 1902. La première observation du RE en microscopie électronique date de 1945 par Porter, Claude et Fullam, dans des cultures cellulaires issues de tissus d'embryons de poulet. En 1953, Porter utilise le terme réticulum (« réseau ») endoplasmique pour la première fois. Depuis, l'utilisation de nombreuses techniques avancées comme la tomographie en microscopie électronique et la microscopie confocale ont permis de montrer que le RE est composé d'une seule membrane continue, formant un réseau comportant plusieurs domaines différant dans leur structures et fonctions. Sa membrane constitue généralement plus de la moitié des membranes d'une cellule animale, et son volume souvent plus de 10% du volume cellulaire total (Molecular Biology of the Cell. 5th edition. Alberts B, Johnson A, Lewis J, et al., P569-571). Le RE a un rôle central à la fois dans la biosynthèse des lipides et des protéines. Sa membrane est le site de production des lipides constituant les organelles de la cellule, et accueille les protéines transmembranaires avant leur adressage. Le RE est en outre en continuité physique avec l'enveloppe nucléaire, ce qui fait que cette dernière peut être décrite comme faisant partie intégrante du RE.

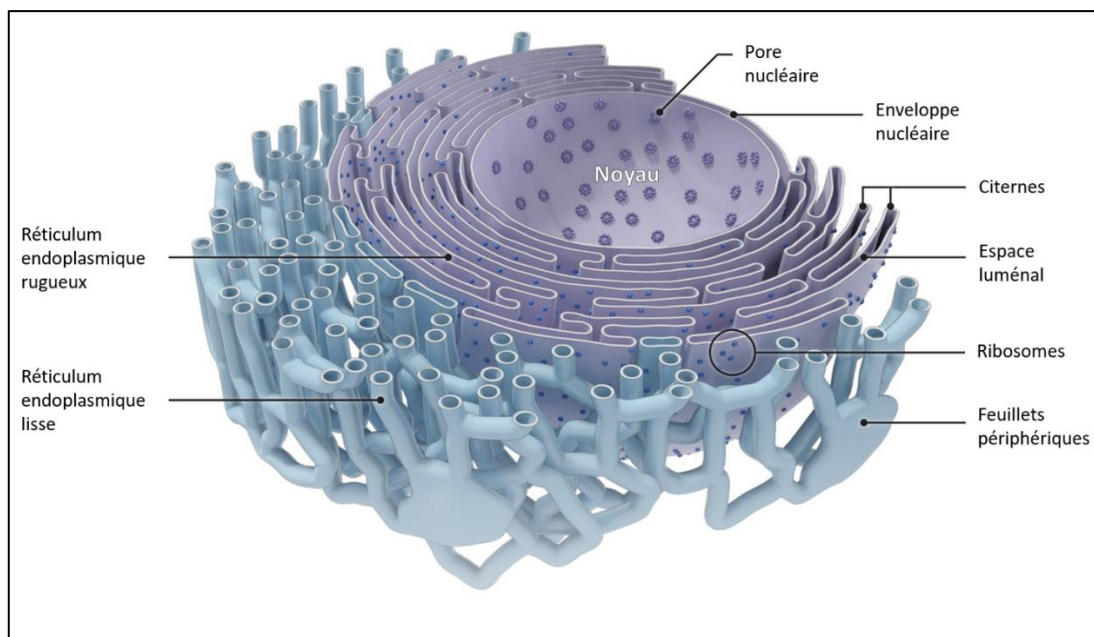


Figure 1 : Le réseau de réticulum endoplasmique dans la cellule. En continuité membranaire avec l'enveloppe nucléaire, le RE est constitué de différentes structures morphologiquement différentes. (Adapté de Goyal and Blackstone, 2013).

1. Des fonctions fondamentales pour la cellule

Le RE est un organite aux multiples fonctions, qui sont également corrélées à sa structure, comme nous le verrons dans la partie suivante. Ses principales fonctions sont la synthèse des protéines transmembranaires et des protéines destinées à être excrétées, la synthèse des lipides (phospholipides, stéroïdes, cholestérol), et le maintien de l'homéostasie calcique. Le RE a en outre un rôle de détoxification, en particulier dans certains types cellulaires comme les cellules des reins et du foie, où certaines molécules toxiques sont transformées, notamment en les solubilisant. Cette fonction dépend d'enzymes comme le cytochrome p450.

a- Synthèse et conformation des protéines

Le RE est le site de la synthèse des protéines sécrétées, des protéines transmembranaires, ainsi qu'une partie mineure de protéines cytosoliques (Reid & Nicchitta, 2015). Cette synthèse protéique nécessite la localisation de ribosomes à la face cytosolique de la membrane du RE. La traduction des protéines sécrétées ou transmembranaires débute dans le cytosol. Les mRNA correspondant sont traduits partiellement par le ribosome, le polypeptide naissant contenant une séquence signal à son extrémité amino-terminale est alors reconnu par la particule de reconnaissance du signal (SRP, signal recognition particle), et le complexe ainsi formé est alors adressé au RE où il se fixe au récepteur du SRP. La traduction se poursuit sur le RE et le polypeptide résultant entre dans le RE au cours de la traduction (Rapoport, 2007) à travers la membrane via le translocon, canal composé de plusieurs protéines Sec (Meyer *et al*, 1982). La translocation est donc cotraductionnelle. Au cours de ce processus ou plus rarement postérieurement à celui-ci, la signal peptidase clive le court peptide signal, la protéine entre ainsi dans la lumière du RE (Evans *et al*, 1986).

Si la protéine est une protéine membranaire intégrale, la présence d'un domaine de résidus hydrophobes ou d'une séquence stop-transfert met en pause la translocation (Blobel, 1980). La protéine est alors déplacée latéralement et devient ancrée dans la bicouche phospholipidique. Les protéines transmembranaires peuvent contenir une seule séquence d'acides aminés hydrophobes, qui sont alors désignées comme « single pass », ou de multiples régions traversant la membrane, les protéines transmembranaires « multi-pass » (Braakman & Hebert, 2013).

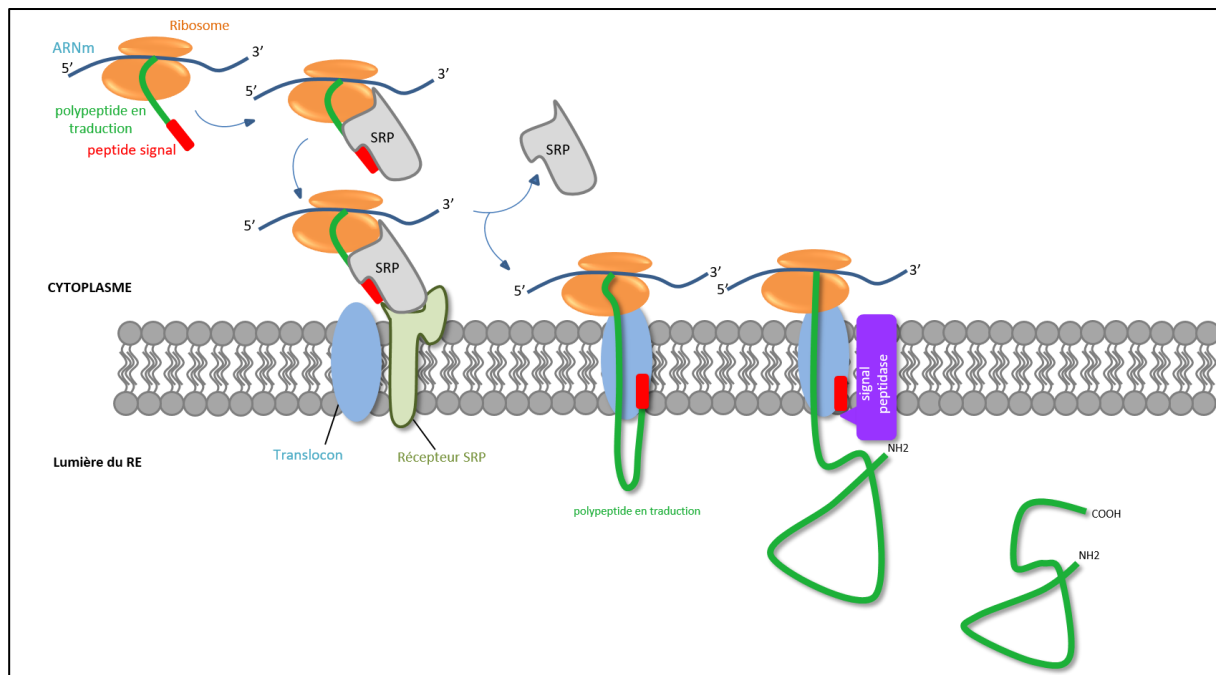


Figure 2 : La translocation co-traductionnelle dans le RE des protéines à peptide signal. Le peptide signal est reconnu par le SRP au cours de la traduction, et l'ensemble formé par le ribosome et le polypeptide en traduction est recruté au RE via le récepteur au SRP. La protéine est transloquée par le complexe translocon et le signal peptide clivé par le complexe signal peptidase. La protéine est finalement libérée dans la lumière du RE.

Si la protéine n'est pas destinée à être intégrée à la membrane mais à entrer dans la voie sécrétoire ou dans la lumière des organites, la protéine entre dans un processus de transport. Une fois la traduction achevée et le peptide signal clivé, les ribosomes sont libérés dans le cytosol. Certains ribosomes sont liés de façon stable à la membrane du RE, dans ce cas l'ARNm est libéré et le ribosome peut participer à plusieurs traductions successives (Jagannathan *et al*, 2014; Potter & Nicchitta, 2002). Des protéines cytosoliques peuvent être issues d'une traduction effectuée par ces ribosomes liés au RE, et le recrutement des ARNm à ces ribosomes pourrait dépendre de la protéine p180 qui recrute des ARNm au RE de façon indépendante à la traduction (Cui *et al*, 2012).

A la suite de la synthèse protéique et de la translocation, une protéine destinée à la sécrétion est prise en charge par les chaperonnes et des enzymes pour le repliement et les modifications post traductionnelles, qui comprennent les N-glycosylations, la formation des ponts disulfures et l'oligomérisation (Braakman & Hebert, 2013). Si la protéine est résidente du RE, elle est correctement repliée. Si la protéine est sécrétée, elle est libérée par les chaperonnes avant d'être recrutée pour le transport via l'appareil de Golgi vers sa destination (comme à la membrane plasmique ou pour sécrétion) ou adressée au peroxysome (van der Zand *et al*, 2012). Les domaines cytosoliques des protéines transmembranaires peuvent nécessiter des protéines cytosoliques ou chaperones pour le repliement correct de ces domaines.

Malgré la machinerie destinée à effectuer correctement ces modifications, une fraction des protéines transloquées dans le RE n'atteignent pas leur repliement natif et fonctionnel, et restent mal repliées ou s'agrègent (Hartl & Hayer-Hartl, 2009). Ces protéines peuvent rester ainsi dans le RE ou être prises en charge par la voie de dégradation associée au RE (ERAD, ER-associated degradation), qui implique le protéasome et empêche les polypeptides aberrants d'entrer dans la voie de sécrétion (Ruggiano *et al*, 2014). Cette dégradation par ERAD nécessite une reconnaissance précise et contrôlée des agrégats pour éviter une trop forte dégradation des protéines du RE. L'activation du stress du RE est d'ailleurs liée à plusieurs pathologies humaines (voir partie stress du RE).

b- Biosynthèse des lipides

Le RE et l'appareil de Golgi constituent l'essentiel du compartiment endomembranaire dans les cellules eukaryotes. Ce compartiment est le site majeur de synthèse des lipides, qui constituent les membranes biologiques de la cellule. Le RE produit les lipides essentiels dans la composition des membranes, comme la phosphatidylcholine (PtdCho), la phosphatidylethanolamine (PtdEtn) et de lipides membranaires moins abondants comme le phosphatidyl-inositol (PtdIns) et la structure des sphingolipides. Sont également présentes dans le RE les enzymes permettant la synthèse du cholestérol et des triacylglycerides (TAG), servant à constituer des réserves énergétiques. Les lipides synthétisés dans le RE participent à la composition des membranes des autres organites, dans lesquelles ils sont distribués par le trafic vésiculaire et/ou les sites de contact RE-organites, et les TAGs sont transférés dans les gouttelettes lipidiques, émergeant du RE. La très grande majorité des lipides spécifiques à certains organites (comme la cardiolipine des mitochondries) dérivent de précurseurs ou de lipides synthétisés par le RE (Jacquemyn *et al*, 2017).

La membrane du RE contient de hauts niveaux de PtdCho et PtdEtn, et relativement peu de sphingolipides et de cholestérol. Cette composition spécifique induit une membrane relativement fine. Du fait de la particularité des lipides à être enchâssés dans des membranes, il existe peu de rétrocontrôles classiques où le produit inhibe directement la synthèse de lipides. Il existe ainsi des mécanismes complexes de régulation qui modifient l'activité des enzymes du RE. En fonction du lipide synthétisé, des chaînes d'enzymes différentes sont mises à contribution (Fagone & Jackowski, 2009).

c- Métabolisme du calcium

En plus de ses fonctions de biogénèse, le RE a également un rôle important de réservoir de Ca^{2+} intracellulaire. Le calcium est utilisé de façon étendue pour diverses régulations, comme la localisation, la fonction de protéines et leur association avec leurs partenaires, qui peuvent être d'autres protéines, des organites ou de l'acide nucléique.

La concentration cytosolique de Ca^{2+} dans le cytosol est d'environ 100nM, alors que dans la lumière du RE, cette concentration est de 100-800 μM , en comparaison des 2mM extracellulaires. Le RE comporte ainsi plusieurs canaux calciques, récepteurs à la ryanodine et à l'IP3 (inositol triphosphate) responsables de la libération de Ca^{2+} depuis le RE dans le cytosol quand la concentration de ce dernier baisse. Cette libération dépend de la stimulation de la phospholipase C (PLC) via l'activation du récepteur couplé à la protéine G (Oude Weernink *et al*, 2007). La PLC clive le PIP2 (phosphatidylinositol 4,5 biphosphate) en diacyl-glycérol (DAG) et IP3, activant son récepteur (IP3R), ce qui conduit à une libération du Ca^{2+} du RE et provoque une augmentation transitoire des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} . Les récepteurs à la ryanodine sont activés via l'augmentation du Ca^{2+} intracellulaire (Ca^{2+} -induced Ca^{2+} release, CICR) et amplifient la réponse (Endo, 2009). La dépolarisation des membranes de t-tubules, extensions de la membrane plasmique peut conduire à des changements de conformation des canaux Ca^{2+} voltage dépendants comme le récepteur à la dyhydropyridine (Fill & Copello, 2002). Le Ca^{2+} peut également s'échapper du RE et être ensuite pris en charge par des ATPases, les SERCAs (sarcoendoplasmic reticular Ca^{2+} ATPases), ou bien entrer dans la cellule depuis le milieu cellulaire externe, ajoutant à la complexité de la régulation (Clapham, 2007). L'épuisement rapide de la réserve de Ca^{2+} via sa libération par les IP3R déclenche l'activation d'un mécanisme d'entrée du calcium dans la cellule, l'entrée du Ca^{2+} stock-dépendante (SOCE, store-operated Ca^{2+} entry)(Clapham, 2007; Prakriya & Lewis, 2015). Lorsque cette déplétion de Ca^{2+} dans la lumière du RE se produit, les protéines STIM1 forment des clusters au niveau du RE au contact des membranes plasmiques, au niveau desquelles elles séquestrent et assemblent les sous unités Orai1 en canaux actifs à Ca^{2+} (CRAC, Ca^{2+} release activated channels) (Feske *et al*, 2006; Parekh & Penner, 1997; Roos *et al*, 2005; Zhang *et al*, 2006). Ces canaux entraînent une capture du Ca^{2+} extracellulaire directement dans la lumière du RE afin d'en restaurer la concentration. Ce processus est dépendant des changements de concentration en Ca^{2+} dans la lumière du RE mais indépendant des variations dans le cytoplasme.

Ces régulations des concentrations du Ca^{2+} intracellulaires via le RE sont notamment impliquées dans la fécondation après l'entrée du spermatozoïde (Busa & Nuccitelli, 1985; Gilkey *et al*,

1978), dans la libération de neurotransmetteurs (Mulkey & Zucker, 1991) ou la contraction musculaire (Clapham, 2007). La libération de Ca^{2+} peut être fait à l'échelle de la cellule entière (Gilkey *et al*, 1978) ou, être très localisé via des clusters de canaux (Cheng *et al*, 2013)). Dans les cellules musculaires, un type de réticulum est spécialisé dans ces transferts, le réticulum sarcoplasmique (SR). Celui-ci est organisé au plus près des structures contractiles, et libère les ions calcium en réaction au potentiel d'action. Cette libération entraîne l'interaction entre l'actine et la myosine, conduisant à la contraction musculaire. Le SR illustre une relation entre la structure et la fonction du réticulum.

2. Une structure du RE complexe, régulée, en relation avec ses fonctions

Le RE présente une architecture tridimensionnelle complexe et hétérogène. A l'origine, c'est la microscopie électronique qui a permis de faire la distinction entre différents sous domaines du RE, le RER (Réticulum Endoplasmique Rugueux) et le REL (Réticulum Endoplasmique lisse). Le RER est défini par la présence à sa membrane de ribosomes et est impliqué dans les fonctions de synthèse de protéines ainsi que leur repliement et modifications post-traductionnelles. Par opposition, Le REL est le RE dépourvu de ribosomes, et comprend notamment les zones de RE de transition, où les vésicules sont générées et fusionnent, ainsi que les zones de contact avec d'autres organelles. La répartition de ces types de RE varie notamment en fonction du type cellulaire. Par exemple, dans les cellules musculaires un REL spécialisé dans le contrôle de la concentration en Ca^{2+} pour réguler la contraction musculaire. Le REL et le RER sont bien sûr en continuité membranaire, comme l'intégralité du RE, mais sont séparés spatialement. C'est particulièrement le cas dans les neurones, où les corps cellulaires et les parties proximales des dendrites sont enrichis en RER, alors que le REL est localisé principalement au niveau des axones et des extrémités distales. Avec les progrès de la microscopie, et notamment photonique, deux structures morphologiques du RE, distinctes aussi bien dans leur composition que par leur structure, ont pu être mis en évidence : les tubules et les feuilletts.

a- Tubules de RE

Les tubules de RE sont de longues structures cylindriques de 50nm de diamètre (chez les mammifères, 30nm chez la levure) interconnectés entre eux généralement par des jonctions triple, ce qui forme un réseau présent dans tout le cytoplasme. Ils sont connectés à l'enveloppe nucléaire ainsi qu'aux feuilletts. Leur structure tubulaire est en premier lieu déterminée et

stabilisée par plusieurs protéines membranaires. Par les propriétés de leurs domaines transmembranaires, elles permettent à un système composé d'une seule membrane continue de former des structures complexes. En effet, la courbure des membranes nécessaire à l'existence de tubules est maintenue par différentes protéines membranaires, qui contiennent des domaines particuliers, les domaines d'homologie aux réticulons (RHD, reticulon homology domain). Ces protéines sont de la famille des réticulons ou DP1/REEP5/Yop1. Je détaillerai leurs propriétés dans la seconde partie de l'introduction. D'autres protéines participent à l'organisation des tubules de RE en médiant par exemple la fusion des membranes.

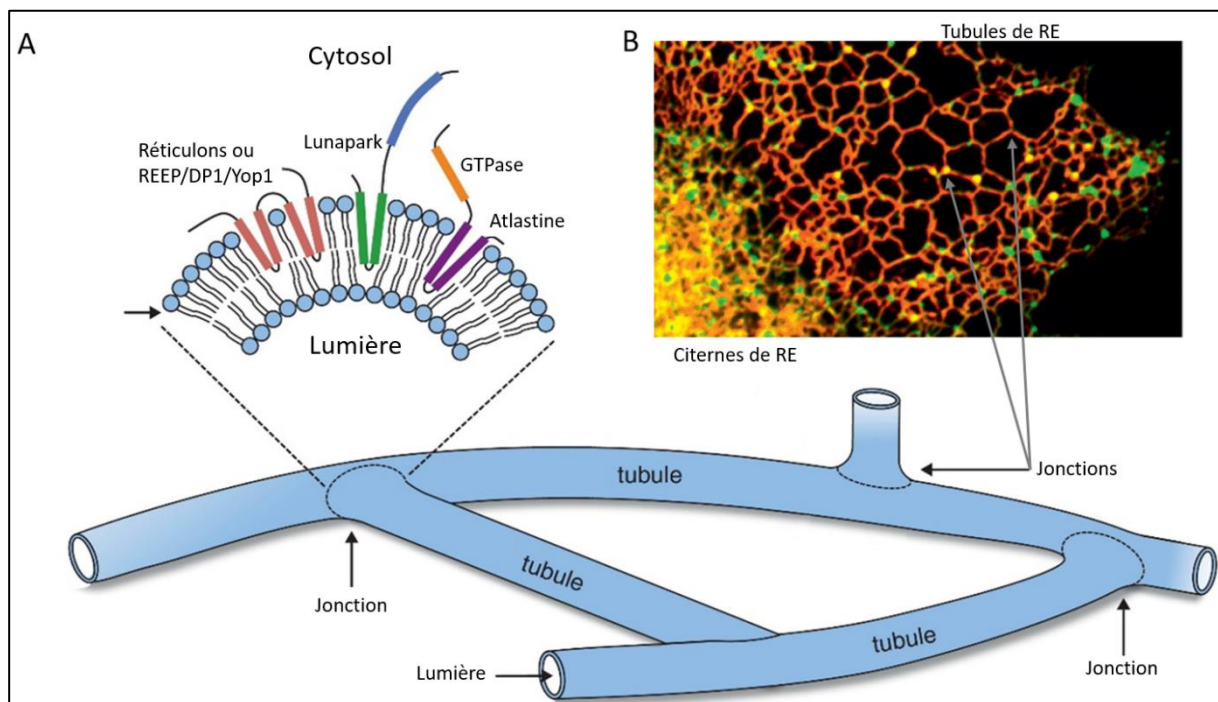


Figure 3 : Différentes protéines du RE organisent la structure et la morphologie du réseau. (A) Schéma indiquant l'insertion des protéines ayant un rôle de courbure des membranes. Celles-ci sont insérées dans le feuillet externe de la bicouche lipidique, côté cytosolique. Les tubules de RE sont reliés entre eux par des jonctions triple. (B) Le réseau de RE dans des cellules COS-7, marqué par mCherry::KDEL (rouge) et les jonctions triples par Lnp1::GFP (vert) (Adapté de Chen et al., 2013b).

En outre, les tubules de RE présentent une importante proximité avec les cytosquelettes de microtubules (MTs) et d'actine. Dans les cellules de mammifère, l'association du RE avec les MTs est critique pour la formation de tubules, la dynamique du RE, et le maintien du réseau (Terasaki *et al*, 1984, 1986). L'élongation des tubules de RE implique les machineries de transport antérogrades et rétrogrades le long des MT (Bola & Allan, 2009; Fehrenbacher *et al*, 2002; Lee & Chen, 1988; Waterman-Storer & Salmon, 1998). Bien que le réseau de RE persiste transitoirement en cas de dépolymérisation des MTs, il perd progressivement sa structure et les tubules se réduisent au profit des feuilletés périnucléaires.

De plus, des études sur les levures et les plantes ont mis en évidence un rôle du cytosquelette d'actine dans le transport du RE (Bola & Allan, 2009; Fehrenbacher *et al*, 2002; Ueda *et al*, 2010). Ce cytosquelette pourrait également avoir un rôle important dans la structure du RE dans les cellules de mammifère puisque plusieurs études ont montré l'interaction entre cytosquelette d'actine et les feuillettes de RE (Sanger *et al*, 1989; Tabb *et al*, 1998; Wagner *et al*, 2011; Wang *et al*, 2002). La dépolymérisation de l'actine par la latrunculine A affecte la structure du RE et sa répartition, et conduit à l'apparition de feuillettes plus nombreuses mais de taille réduite (Joensuu *et al*, 2014). Cette interaction filaments d'actine-RE reste moins caractérisée que le lien entre microtubules et déplacement des tubules de RE.

En effet, des études de la dynamique des tubules de RE par imagerie photonique ont dévoilé trois types de déplacement des tubules de RE dépendant des MTs. Le plus fréquemment observé est un phénomène de glissement : la pointe d'un nouveau tubule apparaît à partir d'un préexistant, et subit une élongation le long d'un MT accolé (Westrate *et al*, 2015). Ce mouvement dépend de moteurs moléculaires, kinésine 1 ou dynéine. L'inhibition de l'un ou de l'autre affecte la dynamique du RE et réduit la portion de tubules. Ces événements de glissement de nouveaux tubules de RE sur des MTs s'effectuent préférentiellement le long de MTs acétylés, plus stables (Friedman *et al*, 2010).

Un autre type de mouvement du RE dépend du TAC (tip attachment complex), un complexe protéique associé à la fois à l'extrémité du tubule de RE ainsi qu'à l'extrémité plus d'un MT, conduisant au fait que le tubule de RE et le MT croissent et rétrécissent ensemble (Bola & Allan, 2009; Waterman-Storer & Salmon, 1998; Waterman-Storer *et al*, 1995). Ce processus se déroule principalement à la périphérie de la cellule, proche de la membrane plasmique. Le dernier type de déplacement caractérisé du RE en lien avec les MTs implique des anneaux de RE se déplaçant le long des MTs. En effet, ce déplacement a été observé le long des MTs à des vitesses correspondant aux moteurs moléculaires (Friedman *et al*, 2010; Lee & Chen, 1988). De petite taille, ces anneaux de RE peuvent devenir de plus en plus petits et se fermer complètement. Des données montrant une proximité de ces anneaux avec d'autres organites comme les mitochondries ou les endosomes pourraient indiquer que la fermeture de ceux-ci pourrait correspondre à des événements de fission (Friedman *et al*, 2011, 2013; Rowland *et al*, 2014).

Des données récentes obtenues par approches de super résolution ont montré que les tubules de RE peuvent se regrouper de façon très dense, dynamiquement, pour former des structures que les auteurs proposent d'appeler matrices de RE (Nixon-Abell *et al*, 2016). Ces matrices, localisées en périphérie, apparaissent en microscopie plus classique comme des patches de signal qui ont pu être interprétées comme des feuillettes ou des citernes. Ces résultats suggèrent

l'importance de la structure du RE et des tubules dans la régulation de différentes fonctions biologiques. Ces matrices, notamment en présentant une surface très grande par rapport au volume de la lumière, pourraient constituer un réservoir de membranes et protéines membranaires pour moduler les interactions avec d'autres organelles.

b- Feuilletts de RE

Les feuilletts, autre type de structure du RE périphérique, consistent généralement en des citernes aplaties, avec une lumière entre les deux bicouches lipidiques parallèles. L'épaisseur de ces feuilletts est similaire au diamètre des tubules, elle est maintenue autour de 30 nm chez la levure et 50 nm chez les mammifères (Bernales *et al*, 2007; West *et al*, 2011). Contrairement aux tubules, les feuilletts présentent une courbure des membranes très réduite, excepté au niveau des bords, où la bicouche lipidique est repliée sur elle-même. Cette forme entraîne un ratio volume/surface plus élevé que les tubules. Ainsi, d'un point de vue purement morphologique, les feuilletts sont plus indiqués dans la réalisation des fonctions du RE dépendant de la lumière, et les tubules dans celles dépendant principalement des membranes (Westrate *et al*, 2015). Les membranes plates sont stabilisées, maintenues l'une face à l'autre, et les membranes des bords sont maintenues courbées.

La mise en lumière de la forte densité de ribosomes au niveau des feuilletts de RE suggère que les ribosomes attachés et les polyribosomes pourraient avoir un rôle dans la régulation de la structure du RE. De plus, le traitement par la puromycine de cellules de mammifère, afin de détacher les ribosomes et de simuler un état de mitose, entraîne une tubulation du RE et une perte des feuilletts (Puhka *et al*, 2007). Les polyribosomes sont associés à une protéine observée enrichie dans les feuilletts, TRAP α , sous unité du complexe translocon, et sont nécessaires à cet enrichissement (Shibata *et al*, 2010). Ces données expérimentales indiquent un rôle des ribosomes associés en polyribosomes dans la stabilisation des feuilletts de RE et du contenu protéique de ces citernes.

La taille stable de l'espace luménal dans les feuilletts de RE (30nm chez la levure, 50 nm chez les mammifères), mise en lumière par la microscopie électronique (Bernales *et al*, 2006; Shibata *et al*, 2010), suggère une régulation de celle-ci. En effet, CLIMP63, une protéine membranaire intégrale du RE de 63kDa agit comme une attache entre les deux bicouches lipidiques du feuillet. Sa structure se compose d'un domaine cytoplasmique N-terminal, qui peut interagir avec les MT (Klopfenstein *et al*, 1998; Schweizer *et al*, 1993), d'un domaine transmembranaire, ainsi que d'un domaine coiled-coil étendu, luménal. Ce sont des interactions

entre ces domaines luménaux qui pourraient conduire à l'oligomérisation de CLIMP63 et ainsi former un pont physique entre les deux bicouches lipidiques et fixer leur écartement (Klopfenstein *et al*, 2001). La déplétion en CLIMP63 n'entraîne pas d'altération de la proportion de feuillet de RE, en revanche la distance entre les bicouches lipidiques est réduite de 45-50nm à 25-30nm (Shibata *et al*, 2010). Sa surexpression augmente drastiquement le nombre de feuillet au détriment des tubules. CLIMP63 fonctionne ainsi en opposition aux réticulons, dont la surexpression augmente le nombre de tubule. Les réticulons et DP1/REEP5/Yop1 pourraient en revanche avoir également un rôle dans l'organisation des feuillet en permettant la courbure des membranes au niveau des bords. En effet, les réticulons sont localisés sur ces bords de feuillet de RE des levures et des cellules animales (Shibata *et al*, 2010). La tomographie électronique sur des levures mutantes pour Rtn1 et Yop1 a révélé une expansion massive des feuillet de RE, ainsi qu'une perturbation légère de l'espace luméal. Ces résultats suggèrent que le rôle des réticulons et protéines contenant des RHD de courbure des membranes au bord des feuillet participe également à l'organisation globale des feuillet de RE.

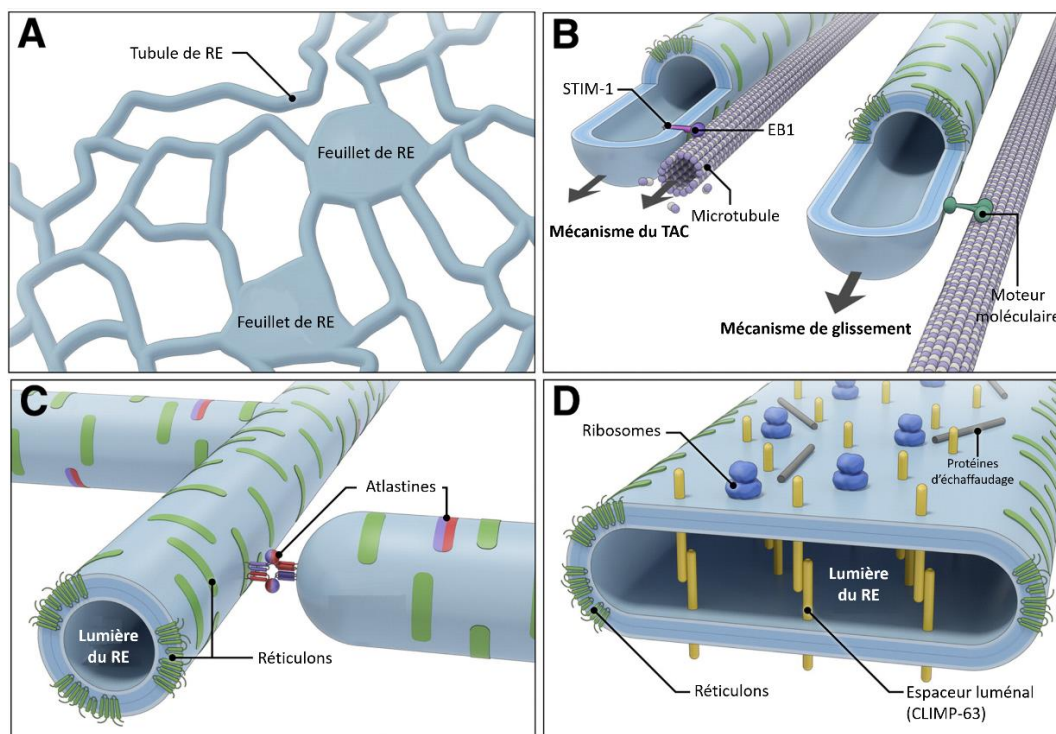


Figure 4 : L'organisation du RE dépend de différentes classes de protéines. Le réseau du RE est composé de tubules et de feuillet (A). Les tubules sont guidés par les microtubules qui participent à leurs déplacements (B). Ils sont stabilisés par les réticulons et leurs jonctions médiées par les atlastines (C). La structure des feuillet est déterminée par les protéines régulant l'espace des membranes (CLIMP-63) et stabilisée par les polyribosomes. La courbure des membranes en bordure de feuillet met en jeu les réticulons (D) (Adapté de Goyal and Blackstone, 2013).

c- Relation entre structure et fonction

Si la distinction principale entre les domaines fonctionnels du RE s'est longtemps faite sur leur aspect en microscopie électronique (RE lisse versus RE rugueux), avec une ségrégation des fonctions semblant évidente, celle-ci pourrait être plus complexe. La présence de ribosomes ainsi que des machineries de translocation et de repliement des protéines au niveau du RE rugueux lie de façon claire ce sous-domaine du RE avec la synthèse protéique. Le RE rugueux semble également spécifiquement impliqué dans d'autres fonctions, comme par exemple la formation des autophagosomes (Hayashi-Nishino *et al*, 2009). Une corrélation peut être faite avec l'organisation tridimensionnelle du RE : les feuillettes ou citernes sont davantage liés aux ribosomes que ne le sont les tubules. Chez la levure, les citernes de RE présentent une densité de ribosomes de 600-1100/ μm^2 contre 250-400 pour les tubules (West *et al*, 2011). Similairement, les protéines associées à la machinerie de translocation sont davantage présentes dans les feuillettes, chez les mammifères (Shibata *et al*, 2010). Les cellules spécialisées dans la sécrétion, comme celles du pancréas, présentent une abondance de citernes, décorées de ribosomes. En revanche, les cellules spécialisées dans les fonctions principalement associées au réticulum endoplasmique lisse comme la synthèse lipidique, la signalisation du calcium ou dépendant de sites de contact présentent un RE composé majoritairement de tubules. La production d'hormones stéroïdiennes, dérivées de lipides, dans les cellules des glandes surrénales, la détoxification dans les cellules du foie et la régulation calcique de la contraction dans les cellules musculaires sont par exemple corrélées avec une forte proportion de réseau de tubules de RE (Baumann & Walz, 2001). Une autre fonction des tubules de RE est de médier les sites de contact entre le RE et les autres organites.

d- Sites de contact membranaires

La présence de nombreux sites de contact du RE tubulaire avec de multiples organites, aux rôles variés, souligne la relation entre structure et fonction du RE. L'amélioration de la résolution spatiale et temporelle de l'imagerie cellulaire, permise par le développement technologique, a permis d'étudier la dynamique de ces sites de contact, et in fine de préciser leurs rôles. En effet, il a été observé que ces sites de contact sont maintenus au cours de processus dynamiques tels que le trafic, la fusion ou la fission des organites au contact, suggérant une importance fonctionnelle de ces structures ou domaines particuliers. Ces sites de contact dépendent de mécanismes différents et assurent des fonctions diverses en fonction des organites concernés.

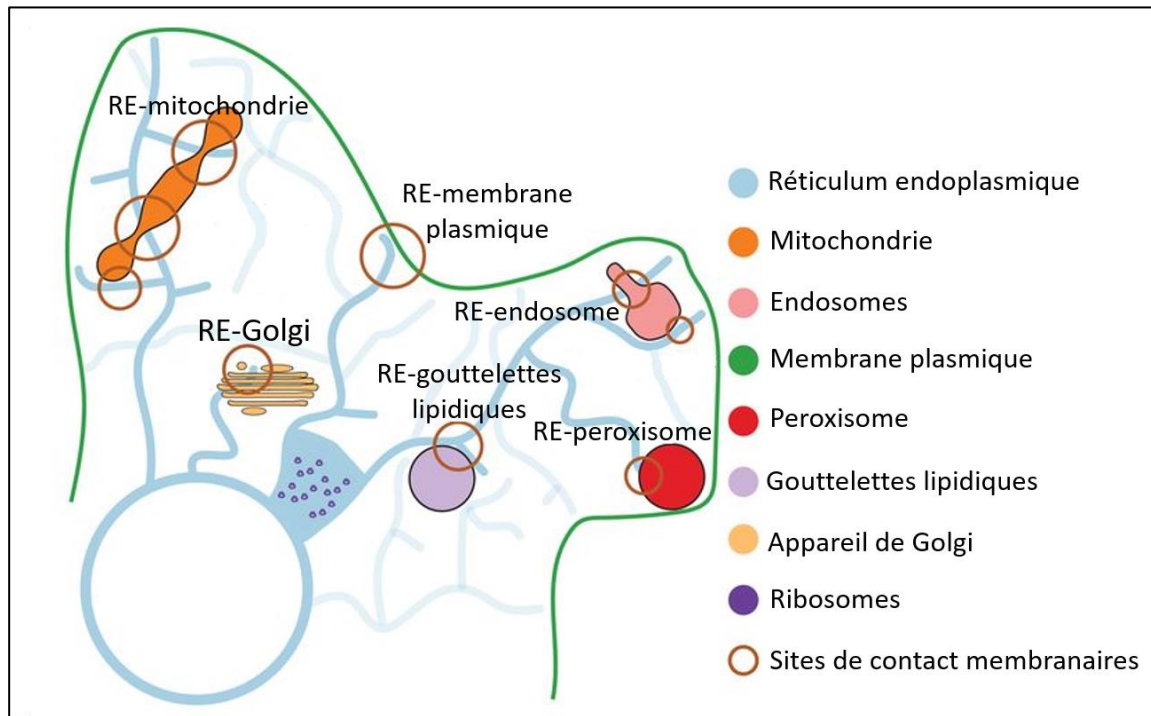


Figure 5 : Les différents sites de contact RE-organites dans les cellules (issu de Wu et al., 2018).

Sites de contact avec les mitochondries

Les sites de contact entre des tubules de RE et les mitochondries ont été observés chez la levure et des cellules animales (Friedman *et al*, 2011). Les tubules sont enroulées autour de mitochondries à une distance de 10nm, sont dépourvus de ribosomes, recouvrent 2 à 5% de la surface mitochondriale et ont une influence directe sur la dynamique du réseau mitochondrial (Friedman *et al*, 2013; Wu *et al*, 2017). Des expériences de fractionnement anciennes ont montré une copurification de membranes associées aux mitochondries, contenant des enzymes du RE impliquées dans la biosynthèse des lipides et la signalisation calcique (Vance, 1990). En effet, les sites de contact RE-mitochondries sont impliqués dans le transport de Ca^{2+} depuis la lumière du RE vers la matrice mitochondriale (Cárdenas *et al*, 2010). Ce transfert se fait dans un premier temps par le relargage de Ca^{2+} via le canal tétramérique récepteur de l'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3R) puis l'entrée dans l'espace intermembranaire mitochondrial via un canal voltage-dépendant anion-sélectif (VDAC) dans la membrane externe mitochondriale (Fan *et al*, 2015; Rapizzi *et al*, 2002; Rizzuto *et al*, 1998; Shoshan-Barmatz & Gincel, 2003; Szabadkai *et al*, 2006). Le Ca^{2+} est ensuite transloqué dans la matrice mitochondriale par l'uniport mitochondrial

du calcium (Baughman *et al*, 2011; De Stefani *et al*, 2011). Un niveau de régulation supplémentaire est apporté par différents acteurs protéiques qui modulent ce flux (de Brito & Scorrano, 2008; Chen *et al*, 2003; Hirabayashi *et al*, 2017; Szabadkai *et al*, 2006). Le RE et les mitochondries sont impliqués dans la biogénèse lipidique, et différentes molécules intermédiaires doivent voyager entre les organites. Différentes expériences suggèrent qu'un complexe impliqué dans ce transport est le complexe ERMES (ER-mitochondria encounter structure), chez la levure (Kornmann *et al*, 2009). Il est composé de Mmm1, Mdm10, Mdm12, et Mdm34. Ces quatre sous unités forment une cavité hydrophobique reliant le RE et la mitochondrie (AhYoung *et al*, 2015). ERMES semble transférer la phosphatidylsérine (PS) et la phosphatidylcholine vers la membrane mitochondriale (Jeong *et al*, 2017; Kojima *et al*, 2016; Kornmann *et al*, 2009). La mécanistique reste cependant à élucider, notamment en établissant précisément la structure du complexe ERMES par cristallographie. L'interaction génétique entre ERMES et d'autres voies de transport lipidique montrent que plusieurs voies sont possibles pour l'apport aux mitochondries. En effet, les mutants pour les membres du complexe ERMES ne présentent pas de défaut important en termes de composition des membranes (Kornmann *et al*, 2009; Nguyen *et al*, 2012). La voie via ERMES devient cependant essentielle dans des contextes de dysfonctionnement d'autres voies (sites de contact entre vacuole et mitochondrie via v-CLAMP, qui implique notamment Vps13 et Vps39) (Elbaz-Alon *et al*, 2014; Hönscher *et al*, 2014; Lang *et al*, 2015; Peter *et al*, 2017; Tan *et al*, 2013). De façon similaire, le complexe ERMES est essentiel en cas de dysfonctionnement de Lam6/Ltc1. Lam6/Ltc1 est une protéine membranaire du RE localisant aux sites de contacts avec la mitochondrie via l'interaction avec Tom70 et Tom71, de la membrane externe mitochondriale. Lam6/Ltc1 a la capacité de transfert de stérols, *in vitro* (Elbaz-Alon *et al*, 2015; Gatta *et al*, 2015; Murley *et al*, 2015). Le transfert de lipide au niveau des sites de contact RE-mitochondries n'a pour le moment pas été caractérisé chez les animaux.

Une fonction importante du RE via les sites de contact avec le réseau mitochondrial a une influence directe sur la dynamique de celui-ci. En effet, le réseau mitochondrial dépend d'un équilibre entre événements de fission et de fusion. Les sites de contact RE-mitochondries définissent les sites de fission des mitochondries chez la levure et dans des cellules animales (Friedman *et al*, 2011). Des tubules de RE sont enroulés autour de mitochondries et forment des sites de contact, entraînant le recrutement des machineries de constriction et de division au niveau de ces anneaux (Friedman *et al*, 2011). La constriction de la membrane interne de la mitochondrie est d'ailleurs antérieure à celle de la membrane externe, suggérant une transduction du signal depuis la matrice mitochondriale pour recruter le RE et ensuite positionner la machinerie de fission (Cho *et al*, 2017). Ce signal pourrait provenir de l'ADN mitochondrial (Lewis *et al*, 2016;

Murley *et al*, 2013). Dans les cellules animales, la dynamine Drp1 (Dnm1 chez la levure) a un rôle clé dans ce processus de fission. Elle est recrutée à la mitochondrie depuis le cytoplasme, au niveau des sites de contacts RE-mitochondrie, via des adaptateurs (Gandre-Babbe & van der Blik, 2008; Osellame *et al*, 2016; Otera *et al*, 2010; Palmer *et al*, 2011; Zhao *et al*, 2011). Ceux-ci et Drp1 localisent au niveau de mitochondries en constriction associées au RE.

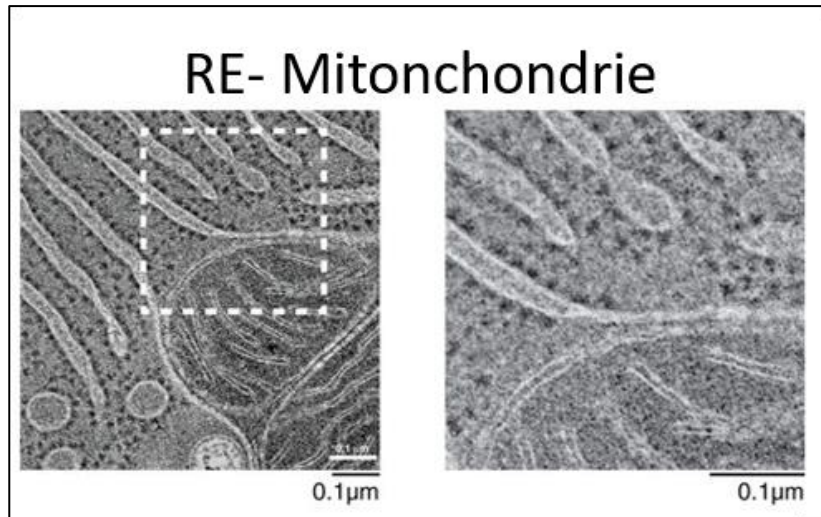


Figure 6 : Images de microscopie électronique des sites de contact membranaires RE-mitochondries, dans des cellules épithéliales de rat, par M. Ladinsky (issu de Wu *et al.*, 2018)

De plus, les sites de contact RE-mitochondries peuvent également jouer le rôle de site de formation des autophagosomes. Dans des cellules de mammifères, les autophagosomes peuvent se former aux MAMs (Mitochondria Associated Membranes) et un défaut de formation de ces sites de contact entraîne une baisse de la formation d'autophagosomes (Hamasaki *et al*, 2013). Chez la levure, l'autophagie non sélective n'est pas affectée par l'absence d'ERMES, mais la dégradation des mitochondries par autophagie sélective nécessite ERMES (Böckler & Westermann, 2014).

Sites de contact avec la membrane plasmique

Le RE forme également de nombreux sites de contacts avec la membrane plasmique (MP), et ce chez tous les eucaryotes. Si la proportion de la surface de la MP impliquée dans ces contacts avec le RE peut être de 40% chez la levure (Schuck *et al*, 2009; West *et al*, 2011), elle est de 2 à 5% dans les cellules animales (Chung *et al*, 2015; Giordano *et al*, 2013; Wu *et al*, 2017). Malgré cette différence, les contacts RE-MP ont les mêmes fonctions de transfert des lipides et d'homéostasie du calcium.

Les phospholipides synthétisés au niveau du RE, comme le phosphatidylinositol (PI) et la phosphatidylsérine (PS), sont transférés à la MP via ces sites de contact. Les protéines de la famille ORP/Osh, particulièrement ORP5 et ORP8 dans les cellules animales, régulent le transfert de lipides notamment en étant davantage recrutés au niveau des sites de contact RE MP quand les niveaux de PI4P sont élevés (Chung *et al*, 2015). Chez la levure, c'est Osh3 qui assume ce rôle (Stefan *et al*, 2011). Une autre famille de protéines régulant le transfert de lipide et la formation de sites de contact est celle des protéines étendues synaptotagmines-likes (E-Systs, tricalbines Tcbs chez la levure) (Giordano *et al*, 2013; Manford *et al*, 2012; Toulmay & Prinz, 2012). Leurs déplétions conjointes entraînent une baisse du niveau de sites de contact (Giordano *et al*, 2013). Les E-Systs/Tcbs sont ancrées à la membrane du RE par un domaine en épingle reticulon-like, transmembranaire, en N-terminal. Un domaine SMP et plusieurs domaines C2 sont localisés au niveau de la partie C-terminale, cytoplasmique (Giordano *et al*, 2013; Min *et al*, 2007). Les domaines SMP permettent la dimérisation et forment alors un long tonneau Beta hydrophobique, par lequel les lipides pourraient être transportés (AhYoung *et al*, 2015; Schauder *et al*, 2014). La longueur de cette structure est de 10 nm, soit la distance la plus faible mesurée entre RE et MP (Fernández-Busnadiego *et al*, 2015; Schauder *et al*, 2014; West *et al*, 2011). Les domaines C2 participent à l'interaction avec des lipides et à détecter le Ca²⁺ cytosolique, dont l'augmentation entraîne une accumulation de certaines E-Systs au niveau des sites de contact RE MP (Giordano *et al*, 2013; Idevall-Hagren *et al*, 2015). Une diminution de PIP2 provoque également une accumulation similaire des E-systs (Saheki *et al*, 2016), ainsi que de Nir2 et des VAPs (vesicles associated membrane protein (VAMP) associated proteins), qui régulent aussi le transfert de PI aux sites de contact RE MP (Kim *et al*, 2013b, 2015). TMEM34 est également impliqué dans la régulation du PI en fonction de la concentration calcique. Son étude a permis de mettre en lumière un lien entre le transfert de lipides et la sécrétion d'insuline (Lees *et al*, 2017). La famille de protéines Lam/Ltc, chez la levure, localise au niveau des sites de contact RE MP, et sont impliqués dans le transfert des stérols. Chez les mammifères, les protéines GRAMD1a et GRAMD2a, apparentés à la famille Lam/Ltc, sont également localisés aux sites de contact RE MP mais présentent des localisations distinctes, suggérant des fonctions différentes (Besprozvannaya *et al*, 2018).

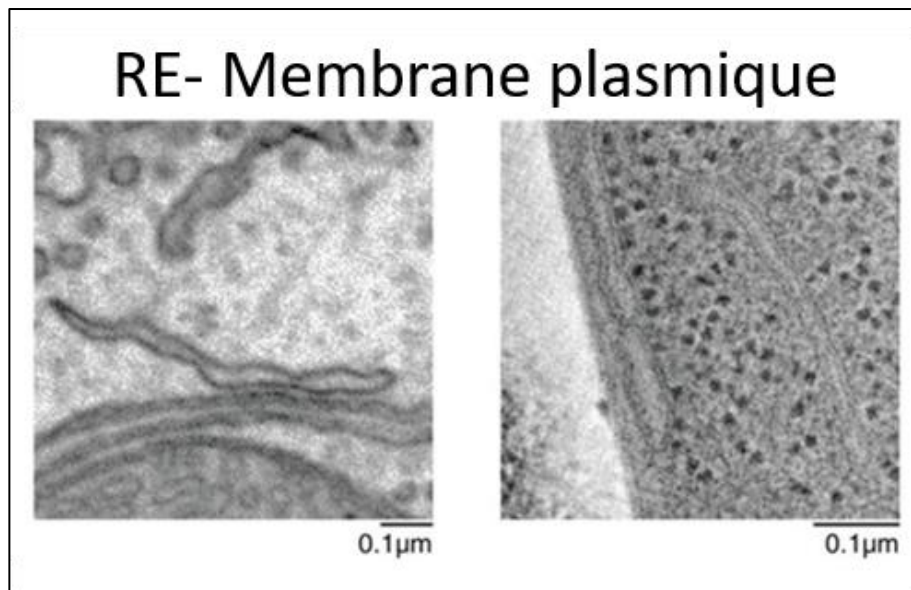


Figure 7 : Sites de contact RE-Membrane plasmique dans les neurones de souris par Y. Wu et P. De Camilli (issu de Wu et al., 2018)

Le RE est un site majeur de stockage de Ca^{2+} dans les cellules animales. Lorsque les concentrations cellulaires sont insuffisantes, le Ca^{2+} doit être capté à partir du milieu extracellulaire, mécanisme pour lequel le rôle des sites de contact RE MP a été suspecté il y a plus de 30 ans (Putney, 1986). Le canal le plus caractérisé permettant le passage de Ca^{2+} depuis le milieu extracellulaire vers le RE au niveau des sites de contacts est ORA1, sous forme hexamérique, localisé à la membrane plasmique. STIM1, protéine membranaire du RE, oligomérise en cas de carence en Ca^{2+} dans le RE, et localise au niveau des sites de contact RE PM, où il se lie et active Orail. Cette interaction provoque l'entrée du Ca^{2+} via SERCA, une pompe Ca^{2+} -adénosine triphosphate du RE et du réticulum sarcoplasmique. Différents facteurs comme CRACR2A et B, junctate, la junctophiline 4, et TMEM110 participent à la régulation de ce complexe, notamment en promouvant le recrutement de STIM1 au niveau des sites de contacts RE MP (Woo *et al*, 2016). Dans les muscles squelettiques, le flux calcique est régulé au niveau des contacts RE MP, celui-ci contrôlant la contraction musculaire. Dans ces cellules, des structures membranaires particulières, les tubules transverses, des invaginations de la MP, forment des sites de contact avec les citernes terminales du réticulum sarcoplasmique. A ce niveau, le récepteur à la ryanodine RyR1 de la membrane sarcoplasmique et Cav1.1, sous unité d'un canal calcique voltage dépendant, coopèrent pour répondre à un potentiel d'action par la libération de Ca^{2+} dans le cytoplasme et provoquer la contraction musculaire (Hernández-Ochoa *et al*, 2016). La pompe SERCA capte ensuite le Ca^{2+} du cytosol afin de régénérer le Ca^{2+} du réticulum sarcoplasmique.

Additionnellement, les sites de contact entre la membrane plasmique et le RE semblent jouer un rôle dans la formation des autophagosomes. Dans des cellules HeLa en conditions d'induction de l'autophagie comme la starvation, le nombre de sites de contact RE-MP est augmenté. La surexpression des E-systs, qui augmente le nombre de sites de contacts RE-MP, entraîne une augmentation de l'autophagie, et à l'inverse, leur inhibition entraîne une diminution de celle-ci. Les E-systs sont en fait nécessaires à la synthèse du PIP3 (Phosphatidyl-inositol-3-phosphate), qui participe à la biostynthèse des autophagosomes (Nascimbeni *et al*, 2017).

Autres sites de contact

En plus des transferts vésiculaires antérogrades et rétrogrades, les lipides peuvent être transférés du RE au Golgi par une voie non vésiculaire. C'est d'ailleurs pour Golgi que le transfert de lipides au niveau des sites de contacts entre RE et d'autres organites a été montré pour la première fois (Hanada *et al*, 2003; Peretti *et al*, 2008). Les seules protéines du RE impliquées dans ce transfert pour l'instant sont les VAPs, VAPa et VAPb dans les cellules animales, Scs2 et Sc22 chez la levure. Ces protéines membranaires intégrales, très conservées, interagissent avec diverses protéines au niveau des sites de contacts ER organites. Les VAPs contiennent notamment un domaine « major sperm protein » (MSP), interagissant avec les motifs FFAT (FF localisés au sein d'un tract acide) des protéines Nir2 (Loewen *et al*, 2003; Peretti *et al*, 2008), CERT (Hanada *et al*, 2003) et OSBP (Mesmin *et al*, 2013), impliquées dans le transfert de lipides.

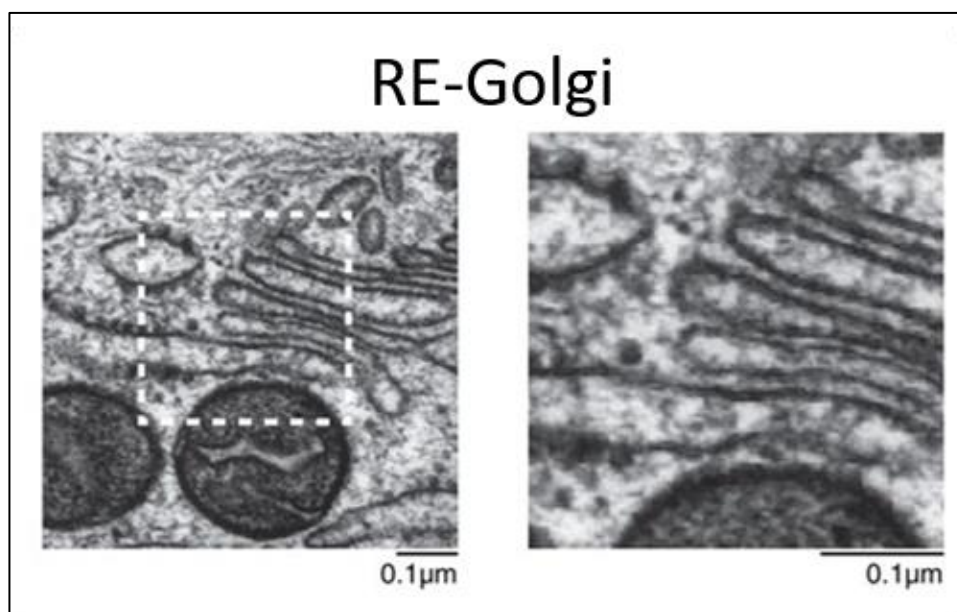


Figure 8 : Images de microscopie électronique des sites de contact membranaires RE-Golgi dans des cellules épithéliales de rat, par M. Ladinsky (issu de Wu *et al.*, 2018)

Les cargos en provenance de la membrane plasmique sont internalisés via des vésicules de la voie de l'endocytose. Durant leur maturation, les endosomes forment avec le RE des sites de contacts membranaires. Ainsi, la majorité des endosomes précoces et la totalité des endosomes tardifs sont liés au réseau tubulaire de RE (Friedman *et al*, 2013; Zajac *et al*, 2013). Ces sites de contact sont stables, et les tubules de RE en contact suivent la migration des endosomes au cours du temps. Un seul endosome peut être lié à plusieurs tubules de RE, et la surface des endosomes concernées par ces contacts représente 2 à 5% de leur surface cytoplasmique. Cette liaison ER-endosome a différents rôles, tels que le transfert de lipides, le tri des cargos, le trafic endosomal et la fission (Phillips & Voeltz, 2016). Les VAPs sont impliquées dans plusieurs de ces fonctions, en interagissant avec des protéines endosomales contenant des motifs FATT, notamment ORP1L. Dans des cellules humaines immortalisées, cette interaction joue un rôle dans le trafic endosomal en déterminant le sens de déplacement des endosomes tardifs le long des MTs, et également dans le transport de cholestérol (Kant *et al*, 2013; Rocha *et al*, 2009). La GTPase Rab7 participe à la régulation de l'interaction des complexes formés par les VAPs et ses partenaires avec la kinésine et la dynéine, suggérant un rôle pour promouvoir le transport antérograde des endosomes (Raiborg *et al*, 2015; Rocha *et al*, 2009).

Les tubules de RE sont également au contact des peroxisomes, et participent à plusieurs rôles métaboliques de ceux-ci. Par exemple, la synthèse des étherlipides est initiée dans le peroxysome et s'achève dans le RE. Le transfert d'intermédiaires lipidiques est donc nécessaire pour cette réaction (Lodhi & Semenkovich, 2014). La caractérisation de machinerie fonctionnelle au niveau de ces sites de contact est relativement récente et encore incomplète. Par exemple, la protéine 5 à domaine de liaison à l'Acyl-coenzyme A (ACBD5), protéine ancrée dans la membrane des peroxysomes, possède un motif FATT interagissant avec les VAPs et établit les sites de contact ER-peroxysomes. Le transfert de lipides entre VAPs et ACBD5 n'est pas encore démontré. Lorsque les sites de contacts sont perturbés, les peroxysomes sont plus mobiles et cela affecte leur localisation (Costello *et al*, 2017), et cela pourrait avoir des conséquences fonctionnelles (Asare *et al*, 2017).

Les sites de contact RE-gouttelettes lipidiques, nombreux, sont différents de ceux avec les autres organites. En effet, une continuité membranaire est souvent observée. Cela est dû à la nature des gouttelettes lipidiques, qui ne présentent à leur surface qu'une monocouche lipidique, et sont générées par accumulation de lipides entre les deux faces d'une bicouche lipidique de RE. Le pont lipidique entre RE et gouttelette permet le transfert de lipides neutres et de certaines

protéines contenant des domaines en épingle (Walther *et al*, 2017). Si les mécanismes sont mal connus, la seipine (protéine membranaire localisée à ces interfaces RE-gouttelettes) joue un rôle majeur (Fei *et al*, 2008; Magré *et al*, 2001; Szymanski *et al*, 2007). Sa déplétion entraîne des sites de contact aberrants, empêchant l'intégration correcte des lipides et affectant la morphologie des gouttelettes lipidiques (Grippa *et al*, 2015; Salo *et al*, 2016; Wang *et al*, 2014, 2016), ce qui a des implications pathologiques chez l'Homme. Ces ponts lipidiques peuvent, après maturation des gouttelettes, être résolus et disparaître, de manière réversible (Jacquier *et al*, 2011; Wilfling *et al*, 2014). D'autres protéines participent à l'établissement de sites de contacts canoniques, qui agissent parallèlement aux ponts pour contrôler la dynamique des gouttelettes. Ces protéines sont organisées en deux complexes, d'une part FATP1 et DGAT2 (Xu *et al*, 2012), d'autre part Rab18 avec le complexe NRZ et des protéines SNAREs (Xu *et al*, 2018, 18).

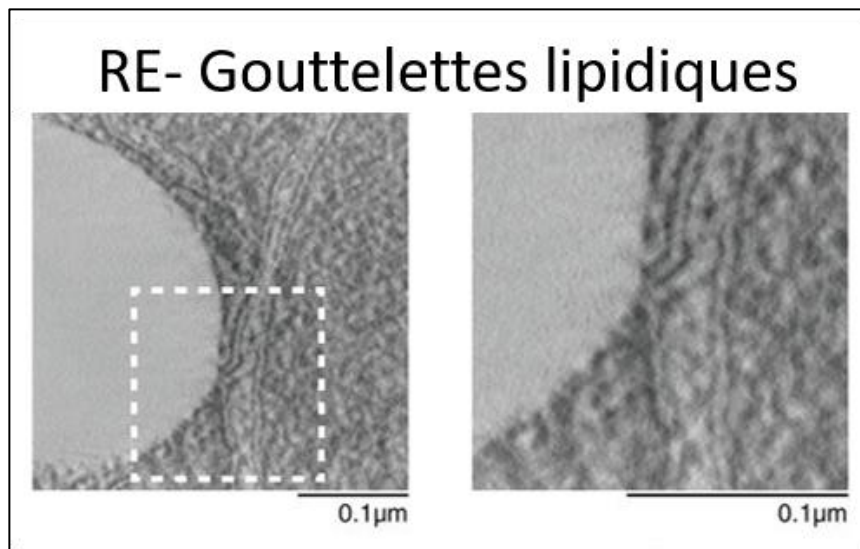


Figure 9 : Images de microscopie électronique des sites de contact RE-Gouttelettes lipidiques chez la levure, par M. Radulovic (issu de Wu *et al.*, 2018)

3- Dynamique du réseau et homéostasie du RE

a- Au cours du cycle cellulaire

Le cycle cellulaire, étape essentielle à la division cellulaire, se décompose en deux grandes phases, l'interphase et la mitose, subissant chacune d'importants réarrangements cellulaires notamment le cytosquelette et le réseau de RE. La mitose est l'un des processus cellulaires entraînant les changements les plus importants au niveau des structures cellulaires, afin d'assurer la ségrégation des chromosomes et autres composants cellulaires au cours de la

division. Par exemple, le cytosquelette de microtubules subit une réorganisation importante conduisant à la formation du fuseau mitotique.

La mitose entraîne ainsi des changements importants de la structure du RE, par différents mécanismes, et ces changements dépendent de l'organisme. En effet, dans les cellules où la mitose est ouverte, l'enveloppe nucléaire se morcèle et autorise les échanges entre noyau et cytoplasme. Cette réorganisation de l'enveloppe nucléaire (Nuclear envelope breakdown, NEBD) commence durant la prophase, et implique notamment la dépolymérisation de la lamina nucléaire et la migration des protéines de l'enveloppe vers le RE. Ces processus sont régulés par des kinases mitotiques, comme cdk1.

Pendant ces changements au niveau de l'EN, le reste du RE change de façon importante de structure. Les études du RE pendant la mitose par imagerie photonique ou électronique ont parfois montré des résultats opposés. D'abord, des études relativement anciennes chez la drosophile et *C. elegans* ont montré que le réseau interphasique, composé de tubules et de feuillettes, changeait en mitose pour ne comporter presque qu'exclusivement des feuillettes (Bobinnec *et al*, 2003; Poteryaev *et al*, 2005). La microscopie électronique sur ces cellules HeLa a également révélé que la majeure partie du RE mitotique était composée de feuillettes (McCullough & Lucocq, 2005). Cependant, d'autres études, dans des lignées cellulaires variées de mammifères, ont observé un RE mitotique majoritairement tubulaire (Puhka *et al*, 2007, 2012). D'autres études suggèrent que le RE reste tubulaire au cours de la mitose et que les tubules sont impliqués dans le réassemblage de l'enveloppe nucléaire en se liant à la chromatine (Anderson & Hetzer, 2007, 2008). Comme le RE mitotique est particulièrement dynamique, il est parfois difficile techniquement d'acquérir des images reflétant sa structure. La combinaison d'approches de haute résolution spatiale et temporelle en photonique et de microscopie électronique a permis dans deux études consécutives de montrer que durant la mitose, le RE est composé presque exclusivement de feuillettes (Lu *et al*, 2009, 2011). Une étude *in vitro* de RE reconstitué extrait des œufs de *Xenopus*, car plus simple à imager, a démontré que le RE issu de cellules mitotiques est majoritairement composé de feuillettes et que le RE interphasique est tubulaire. L'addition de la cyclineB/cdk1 active conduit à la conversion du RE tubulaire en feuillettes. La synthèse de l'ensemble de ces résultats parfois contradictoires est que dans beaucoup d'organismes très variés, il existe une dynamique entre un RE interphasique davantage tubulaire et un RE mitotique composé de davantage de feuillettes. L'observation occasionnelle du cas inverse pourrait être due à l'observation de types cellulaires particuliers où le réseau de RE a déjà une organisation particulière et donc une dynamique différente.

La réorganisation du RE au cours de la mitose n'est pas seulement structurelle : la distribution des protéines est drastiquement affectée. Par exemple, durant l'interphase, le réticulon Rtn4 est exclusivement localisé au niveau du réticulum périphérique et absent de l'enveloppe nucléaire (Anderson & Hetzer, 2008; Lu *et al*, 2009; Voeltz *et al*, 2006). D'autres protéines, comme la laminine B, sont exclues du RE périphérique et restreinte à l'EN, ou bien sont présentes dans tous les compartiments du RE, comme Sec61 β . Durant la mitose, toutes ces protéines se retrouvent mêlées et perdent leurs localisations spécifiques. Rapidement après celle-ci, les protéines sont triées et déplacées de sorte de retrouver leur localisation interphasique. La surexpression de Rtn4 ralentit la vitesse de reformation de l'enveloppe nucléaire, alors que la déplétion pour 3 réticulons (Rtn1, Rtn3, Rtn4) accélère celle-ci. Ces résultats soulignent l'importance des protéines structurales dans cette dynamique. D'ailleurs, cette redistribution de ces protéines suggère également que l'activité de celles-ci peut être modifiée pendant la mitose. Par exemple, la redistribution de Rtn4 dans tout le RE durant la mitose alors que le RE est majoritairement sous forme de feuilletts suggère que l'activité de formation de tubules de RE par Rtn4 est inhibée. L'analyse d'études à grande échelle de phospho-protéomiques a révélé qu'un grand nombre de protéines structurant le RE possèdent un ou des sites de phosphorylation spécifiques à la mitose. Une étude réalisée à partir des cellules humaines HeLa et COS, fibroblastes issus de singes, a montré la présence de trois sites de phosphorylation en N-terminal, spécifiques à la mitose, sur la protéine Climp63, clé dans la structuration des feuilletts de RE (Vedrenne *et al*, 2005). La phosphorylation de ces sites empêche l'interaction de Climp63 avec les microtubules. Des expériences avec des mutants phosphomimétiques ou non phosphorylables montrent respectivement un RE interphasique majoritairement composé de feuilletts et un rapprochement important entre RE et microtubules, affectant la structure du RE. Ces résultats suggèrent que la phosphorylation mitotique de Climp63 bloque l'interaction du RE avec les microtubules et que cela pourrait être un facteur important dans la transition tubules vers feuilletts au cours de la mitose. De plus d'autres études s'intéressant à l'interaction entre RE et microtubules en croissance ont montré que STIM1, protéine du RE, interagit avec EB1, protéine de l'extrémité plus des microtubules en croissance, durant l'interphase, et ainsi couplent la polymérisation des MT avec la répartition du RE dans des cellules en culture (Grigoriev *et al*, 2008). Pendant la mitose, le RE est exclu du fuseau mitotique et ne suit pas la croissance des extrémités plus des MT. De plus, STIM1 est phosphorylé spécifiquement pendant la mitose pour contrôler l'interaction du RE avec les microtubules, en inhibant son interaction avec EB1. En contexte mutant non phosphorylable, le RE est recruté au niveau du fuseau, ce qui montre que cette phosphorylation régule bien l'interaction du RE avec les MT durant la mitose (Smyth *et al*,

2012). La phosphorylation de STIM1 bloque par ailleurs l'activation de SOCE, le mécanisme d'entrée du calcium dépendant de la concentration de Ca²⁺ dans le RE, mais cela est indépendant de l'interaction entre STIM1 et EB1 (Déphoure *et al*, 2008).

La reformation de l'enveloppe nucléaire semble dépendre de processus particuliers. Deux études récentes ont identifié une localisation transitoire du complexe ESCRT-III à la surface de la chromatine à la fin de l'anaphase, lorsque l'enveloppe nucléaire commence à se reformer (Olmos *et al*, 2015; Vietri *et al*, 2015). Le rôle canonique de ESCRT-III est de participer à la formation de corps multi vésiculaires à partir d'endosomes, et a aussi d'autres rôles dans la cytodierèse et dans le bourgeonnement viral à partir de la membrane plasmique (Hurley, 2015). ESCRT-III permettrait donc via sa capacité à déformer et à lier les membranes à reformer l'enveloppe nucléaire. Ces résultats suggèrent en outre que le complexe ESCRT-III pourrait avoir des rôles encore non élucidés dans l'organisation du RE.

b- Suite au stress du réticulum endoplasmique

La perturbation de l'homéostasie, à différents niveaux, entraîne un état de stress du RE, le facteur principal de ce stress étant généralement l'accumulation de protéines mal conformées dans la lumière du RE. Différentes voies de signalisation peuvent être impliquées dans la réponse au stress du RE (Pour revue, Almanza *et al.*, 2019). Celui-ci peut être causé par des perturbations intrinsèques à la cellule, comme des mutations affectant à différents niveaux l'homéostasie, comme dans le cas de certains cancers, ou par exemple la sclérose amyotrophique latérale (ALS), qui peut être liée à un défaut de signalisation de la réponse au stress (Chen *et al*, 2010). Différentes conditions extrinsèques peuvent conduire à un stress du RE. Toujours dans le cas du cancer, la prolifération rapide des cellules entraîne une modification de l'environnement des cellules en réduisant l'oxygène et les nutriments (comme le glucose) disponibles, entraînant un stress du RE, notamment par défaut de glycosylation (Giampietri *et al*, 2015). La présence de certaines molécules affectant la maturation des protéines, l'export de celles-ci, ou la régulation calcique du RE peut induire un stress du RE. Par exemple, la tunicamycine et le 2-deoxyglucose affectent la glycosylation des protéines, et le dihydrothreitol (DTT) inhibe la formation des ponts disulfures, conduisant le plus souvent à des protéines mal conformées (Cleland, 1964; Olden *et al*, 1979; Schwarz & Datema, 1980). De façon plus indirecte, de nombreux facteurs externes peuvent entraîner l'accumulation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS), et affecter la capacité de la cellule à les éliminer. Lorsque cela se produit, le stress oxydatif impacte l'homéostasie du RE (Zeeshan *et al*, 2016). Le processus de formation des ponts disulfures dans le RE génère une

partie des ROS cellulaires. Dans beaucoup de modèles d'études du stress du RE, ce stress et le stress oxydatif s'accroissent mutuellement dans une boucle d'amplification positive, qui interfère avec le fonctionnement normal de la cellule et active des voies de signalisation pro-apoptotique (Malhotra & Kaufman, 2007). La température est un facteur externe ayant une grande influence sur beaucoup de processus physiologiques. Chez les mammifères, une déviation de la température normale de 37°C peut entraîner la dénaturation de protéines ou leur agrégation. Un choc thermique, une élévation transitoire de la température, peut entraîner une fragmentation du système endomembranaire (Lepock, 2005). Des stress induits par un changement de température peuvent avoir un effet hormétique : l'expression de certaines protéines « heat shock » notamment peut faire acquérir à la cellule une résistance au stress (Mollereau, 2015).

La réponse au stress du RE se traduit par l'activation d'une voie de signalisation UPR (unfolded protein response), qui aide la cellule à atténuer le stress en réduisant la synthèse globale de protéines, induit la dégradation des protéines mal conformées ou agrégées, et augmente la capacité du RE à replier les protéines. La voie UPR repose sur trois acteurs principaux : IRE1 (inositol requiring enzyme 1), PERK (protein kinase RNA-activated-like ER kinase), et ATF6 (activating transcription factor 6). Les domaines de ces protéines situés dans la lumière du RE sont, en conditions normales, pris en charge par la chaperonne résidente du RE, BiP (binding immunoglobulin protein), qui les garde inactives (Bertolotti *et al*, 2000). Si les protéines mal conformées s'accumulent dans le RE, BiP est mis à contribution et libère les trois protéines.

D'autres acteurs annexes jouent un rôle activateur ou répresseur en modulant l'interaction de BiP avec IRE1. La dissociation de BiP avec IRE1 entraîne l'oligomérisation de cette dernière, provoquant sa trans-autophosphorylation. IRE1 ainsi activée sur son domaine cytoplasmique participe à la maturation de l'ARNm de XBP1 (X-box binding protein 1), entraînant sa traduction. XBP1 est un facteur de transcription de type *leucine zipper*, qui va induire la transcription de nombreux gènes et ainsi induire l'expression de chaperonnes, foldases, et composants de l'ERAD. XBP1s (s pour spliced, correspondant à l'ARNm mûr) peut également participer à de nombreux autres processus cellulaires, comme notamment la biosynthèse des lipides, le métabolisme du glucose ou la différenciation cellulaire (Lee *et al*, 2005; Reimold *et al*, 2001; Sriburi *et al*, 2004; Zhou *et al*, 2011). IRE1, par son activité de dégradation de l'ARN, peut également cibler d'autres transcrits, ce qui constitue un mécanisme appelé RIDD (regulated IRE1-dependent decay) (Hollien *et al*, 2009). Ce mécanisme est conservé chez les eucaryotes et clive les ARNm contenant une séquence consensus CUGCAG suivie d'une structure en tige-boucle (Han *et al*, 2009), qui sont ensuite dégradés. L'activité de

dégradation des ARNm de IRE1 participe au maintien de l'homéostasie du RE en réduisant la synthèse protéique.

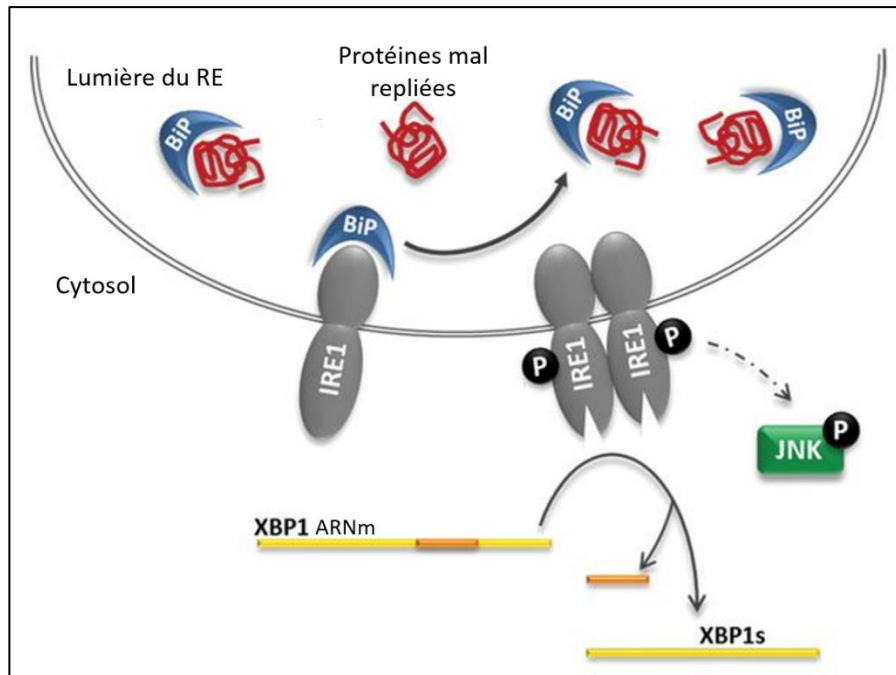


Figure 10 : L'induction de l' UPR via IRE1. La dissociation de BiP et IRE1 lorsque les protéines mal conformées s'accumulent dans le RE provoque l'oligomérisation et l'activation de IRE1. IRE1 activé entraîne la maturation du mRNA de XBP1, facteur de transcripton (issu de Matos et al., 2015).

PERK est une sérine/thréonine kinase transmembranaire possédant un domaine dans la lumière du RE et un domaine kinase cytoplasmique (Harding *et al*, 1999), et est exprimée de façon ubiquitaire (Shi *et al*, 1998). De façon similaire à IRE1, le détachement de BiP du domaine luménal de PERK entraîne l'oligomérisation de celui-ci, à sa trans-autophosphorylation, et ainsi à son activation (McQuiston & Diehl, 2017). PERK phosphoryle eIF2 α , sous unité de l'hétérotrimère eIF2 (eukaryotic translation initiation factor 2), ce dernier régulant la première étape de la traduction en associant un ARNt à une sous unité 40S du ribosome (Harding *et al*, 1999). La synthèse protéique est ainsi réduite au cours du stress du RE, permettant de réduire la quantité protéique à prendre en charge par la machinerie de repliement dans le RE (Harding *et al*, 2000). La phosphorylation d'eIF2 α a cependant un effet positif sur la traduction de certains transcrits, notamment ATF4 (Activating Transcription Factor 4), qui participe à différentes voies de signalisation impliquées dans l'induction de l'apoptose ou de l'autophagie (Liu *et al*, 2015). En effet, des évènements de traduction dépendant de la phosphorylation de eIF2 α conduisent à la régulation positive d'Atg12, ce qui induit la formation du complexe Atg5-Atg12-Atg16, conduisant à la lipidation de LC3 (voir partie Autophagie). De plus, différents gènes

autophagiques comme *Atg3*, *Atg12*, *Atg16*, *Map*, *Becn1* et *Gabarapl2* sont la cible d'ATF4 (B'chir *et al*, 2013). Dans des cellules endothéliales, il a été montré que PERK pouvait moduler la voie AMPK (AMP-activated protein kinase) mTORC1 (mammalian target of rapamycin C1), ce dernier régulant négativement l'autophagie. Dans ces cellules, PERK active AMPK par phosphorylation et AMPK inhibe mTORC1 (Avivar-Valderas *et al*, 2013).

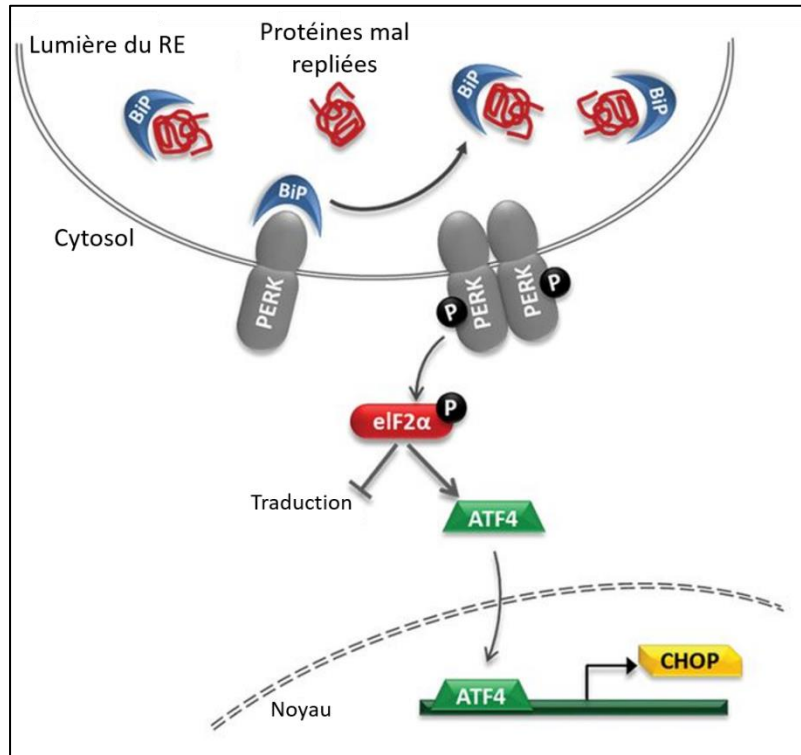


Figure 11 : L'activation de la voie PERK. La dissociation de BiP et PERK lorsque les protéines mal conformées s'accumulent dans le RE provoque l'oligomérisation et l'activation de PERK. PERK phosphoryle eIF2 α , ce qui provoque l'inhibition de la traduction (issu de Matos *et al.*, 2015).

Enfin, ATF6 est un facteur de transcription présent dans le RE, où il est transmembranaire et inactif. Son activation dans le RE conduit à son export vers le Golgi où il est clivé par des enzymes résidentes du Golgi, libérant un fragment N-terminal cytosolique de ATF6, qui importé dans le noyau, pourra induire l'expression de différents gènes liés à la réponse UPR (Shen *et al*, 2002), en induisant notamment la synthèse de XBP1 et CHOP. ATF6 est aussi critique dans la réponse à l'interféron gamma (IFNG) suite à une infection bactérienne. En condition normale, IFNG induit l'autophagie et cela participe à la réponse à l'infection. En l'absence d'ATF6, IFNG n'induit pas l'autophagie, et les souris déplétées en ATF6 sont très susceptibles à des infections bactériennes létales, ce qui indique un lien entre signalisation du stress du RE et autophagie dans la modulation de la défense antibactérienne (Kalvakolanu & Gade, 2012). ATF6 n'est cependant

pas le seul facteur de transcription résidant dans le RE : d'autres, tissu spécifiques, comme CREBH ou Luman, sont également impliqués dans la signalisation en réponse au stress du RE (Asada *et al*, 2011), soulignant la complexité de cette régulation.

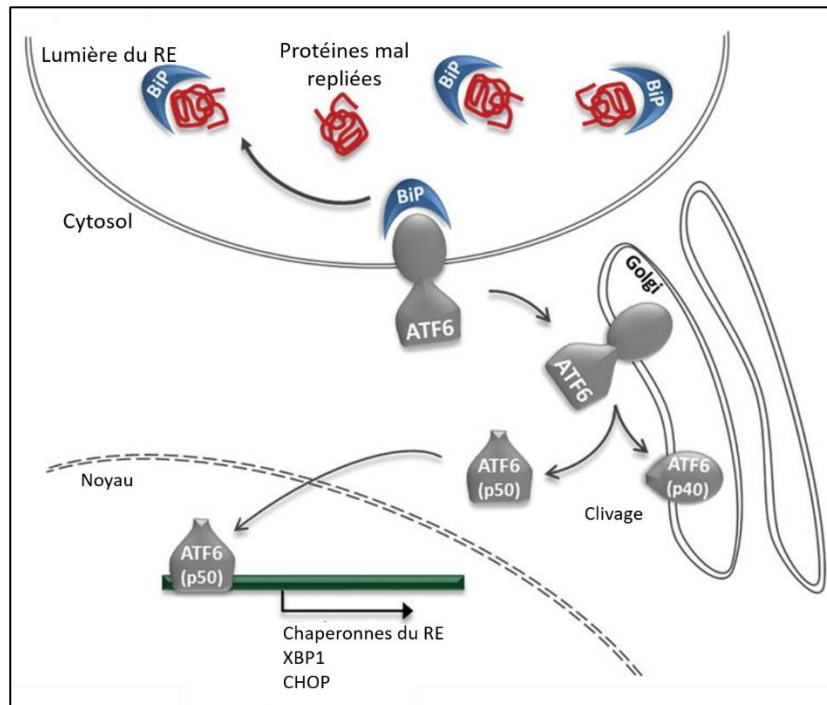


Figure 12 : L'activation de la voie ATF6. . La dissociation de BiP et ATF6 lorsque les protéines mal conformées s'accumulent dans le RE libère ATF6, qui peut alors transiter par le Golgi, étape nécessaire pour son activation (issu de Matos *et al.*, 2015).

Les différentes voies de signalisation impliquées dans l'UPR entraînent une modulation de la transcription de nombreux gènes, codant par exemple des protéines chaperonnes du RE, des facteurs de l'ERAD, du transport des acides aminés ou des enzymes de biosynthèse des lipides. La traduction est également modulée à la suite de l'activation de ces voies de signalisation. La dégradation protéique est également induite par induction de l'expression de différents gènes, dont ceux de l'ERAD, qui consiste à la rétrotranslocation des protéines mal repliées du RE vers le cytoplasme où elles seront dégradées par le protéasome ou par autophagie, comme évoqué précédemment.

La signalisation en réponse au stress du RE a différents rôles physiologiques. Au cours du développement de nombreuses espèces, différents acteurs de ces voies peuvent être activés, et l'absence de ceux-ci peuvent entraîner des défauts de développement. Par exemple, chez *C. elegans*, la déplétion conjointe en XBP-1 et PEK-1, homologue de PERK, entraîne une létalité partielle durant le développement larvaire, qui dépend de la température. A des températures supérieures à 23°C, la létalité atteint 100% (Richardson *et al*, 2011). Au niveau cellulaire, des

événements de différenciation peuvent nécessiter une activation transitoire de l'UPR. Par exemple, l'activation de l'UPR est nécessaire dans différentes lignées résultant de l'hématopoïèse, la production d'immunoglobuline entraînant un stress du RE (Bettigole *et al*, 2015). Les voies de signalisation mises en jeu lors de l'UPR ont également un lien avec le métabolisme. L'activation de ces voies peut entraîner une modulation de l'expression de différents gènes liés au métabolisme des lipides, du glucose ou des acides aminés. Cette régulation peut se faire au niveau du clivage des mRNA par IRE1, ou par induction ou répression de la transcription. Certaines pathologies humaines ont un lien étroit avec le stress du RE et les voies de signalisation qu'il déclenche. En effet, les cellules β pancréatiques comportent un RE très développé afin de soutenir la sécrétion intense d'insuline. Des dysfonctionnements dans la synthèse de l'insuline peuvent entraîner un stress important du RE et conduire à l'apoptose de ces cellules, conduisant à un diabète de type II (Oakes & Papa, 2015). L'accumulation de protéines dans de nombreuses maladies neurodégénératives peut entraîner un effet toxique sur les neurones, notamment en provoquant un stress du RE important, surpassant les capacités de maintien de l'homéostasie.

II/ Les réticulons, une classe de protéines structurant les tubules de RE

Les réticulons sont une famille de protéines membranaires du réticulum endoplasmique, associées préférentiellement avec les tubules de RE et aux bords des citernes. En premier lieu, j'aimerais faire un point sur la nomenclature des réticulons. Les gènes réticulons « vrais » sont les quatre gènes trouvés chez les vertébrés, RTN1, RTN2, RTN3, RTN4, et conduisent à l'expression de nombreuses isoformes. Les « reticulon-like » (RTNL) désignent généralement les homologues de ces gènes présents chez les autres eukaryotes, comme *rtn1* chez la levure, *ret-1* chez *C. elegans*, et plus de 20 gènes différents chez *A. thaliana*, notés RTNLB (reticulon-like B X). Cependant, la désignation de ces « reticulon-like » est maintenant souvent simplifiée en réticulons, comme je le ferai dans la suite de mon manuscrit. De plus, il existe une autre catégorie, les « *reticulon related* » qui désigne en fait les protéines ne faisant pas partie de la famille des réticulons, mais possédant un domaine d'homologie aux réticulons, le RHD. Dans la littérature, ces dernières protéines sont parfois désignées par « reticulon-like ». Cette catégorie comprend par exemple Yop1 (et la famille DP1, pour « deleted in polyposis »), FAM134B ou Atg40, ces deux derniers ayant été identifiés récemment comme récepteurs de la RE-phagie (voir partie RE-phagie). Les réticulons et les autres protéines contenant un RHD ont généralement une fonction

médiée par leur RHD dans la capacité à courber les membranes. Je traiterai dans cette partie majoritairement et plus exhaustivement des protéines réticulons et mentionnerai certaines autres protéines possédant un RHD.

1. Une structure particulière des réticulons, présents chez tous les eucaryotes

a- Une famille de protéines conservée au cours de l'évolution chez les eucaryotes

Une étude relativement complète de l'évolution de la famille des réticulons a été réalisée par T. Oertle et ses collègues (Oertle *et al*, 2003). L'alignement des séquences des RHD de 226 gènes différents de 80 espèces différentes a permis d'établir un arbre phylogénique des gènes de la famille des réticulons. Comme de nombreux gènes associés au système endomembranaire, ils sont retrouvés chez la plupart des eucaryotes mais sont absents des bactéries (Yang & Strittmatter, 2007). La grande majorité des gènes réticulons contiennent de multiples introns et exons, le gain ou la perte d'introns au cours de l'évolution a participé à établir la diversité de la famille des réticulons. Si le RHD est relativement bien conservé au sein de la famille des réticulons, les régions N-terminales des réticulons ne présentent aucune similarité de séquence, même entre les paralogues d'une même espèce. Au sein du RHD, c'est la seconde boucle hydrophobe qui est la plus conservée, puis la première, et enfin la partie C-terminale est moins conservée, ce qui pourrait correspondre en partie à l'hélice amphipatique dont les propriétés semblent plus critiques que sa séquence en acides aminés (voir partie suivante). Chez les mammifères, les gènes de réticulons encodent pour les protéines RTN1-4. La séquence en acides aminés des RHD de RTN1, RTN3 et RTN4 sont relativement similaires (73% d'identité en moyenne), et RTN2 présente davantage de variation (52% d'identité avec RTN4) (Yang & Strittmatter, 2007). La diversité des régions N-terminales entre les différents réticulons de mammifère suggèrent des spécificités de fonction entre espèces ou types cellulaires, alors que le RHD peut conférer aux réticulons une certaine redondance dans l'organisation du RE. D'ailleurs, comme évoqué précédemment, l'une des plus courtes protéines réticulons chez la plante, RTNLB13, constituée presque exclusivement du RHD, a une fonction de courbure des membranes et de formation de tubules (Tolley *et al*, 2008). En outre, les RHD des 4 gènes réticulons présents chez les vertébrés sont plus proches entre eux qu'avec les RHD des autres espèces. De plus, chez les espèces d'invertébrés, un seul gène réticulon (auquel s'ajoute parfois un pseudogène) est présent. Cela suggère que la diversité des gènes réticulons chez les vertébrés

est en cohérence avec l'hypothèse de la quadruplication du génome au cours de l'évolution des vertébrés (Abi-Rached *et al*, 2002). Les gènes réticulons sont chacun responsables de l'expression de plusieurs isoformes, généralement variant par épissage alternatif et/ou par de multiples sites d'initiation de la transcription dans la partie N-terminale.

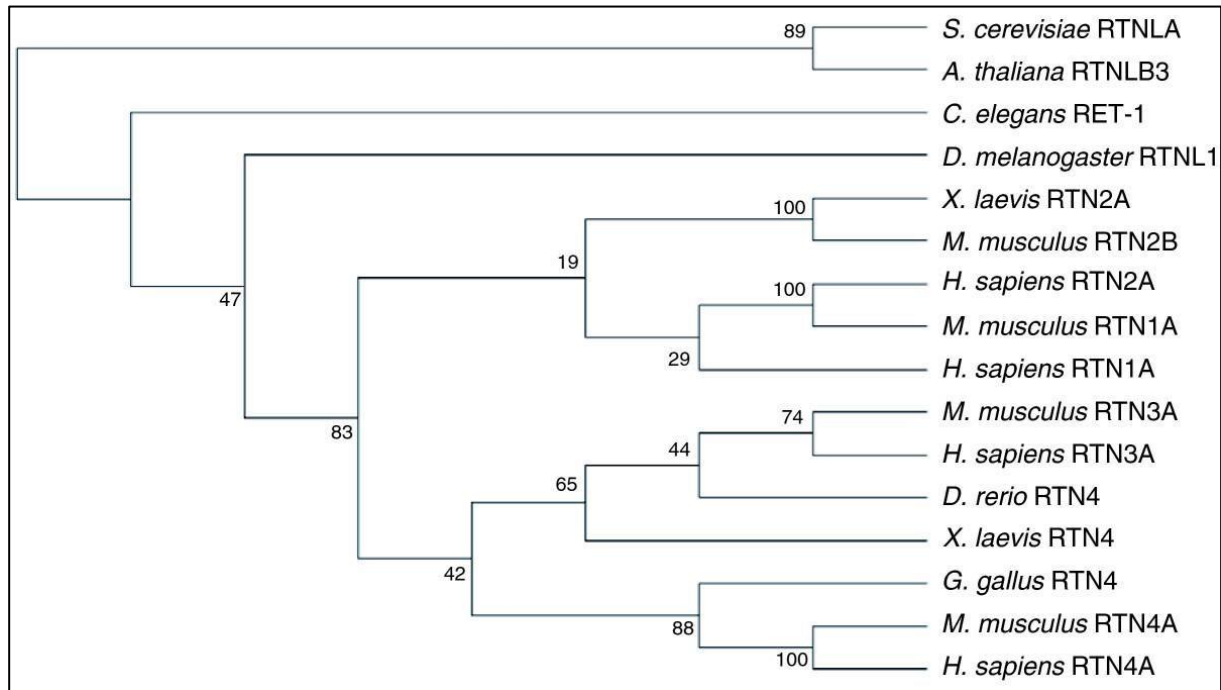


Figure 13 : Analyse phylogénétique des RHD de différents réticulons. Les 4 gènes de réticulons présents chez les vertébrés sont ceux présentant le plus de similitudes dans leur RHD. Les scores ont été obtenus en utilisant le programme ClustalW2 (Adapté de Yang and Strittmatter, 2007).

b- Les domaines caractéristiques des réticulons leur confèrent un rôle dans la formation de tubules de RE

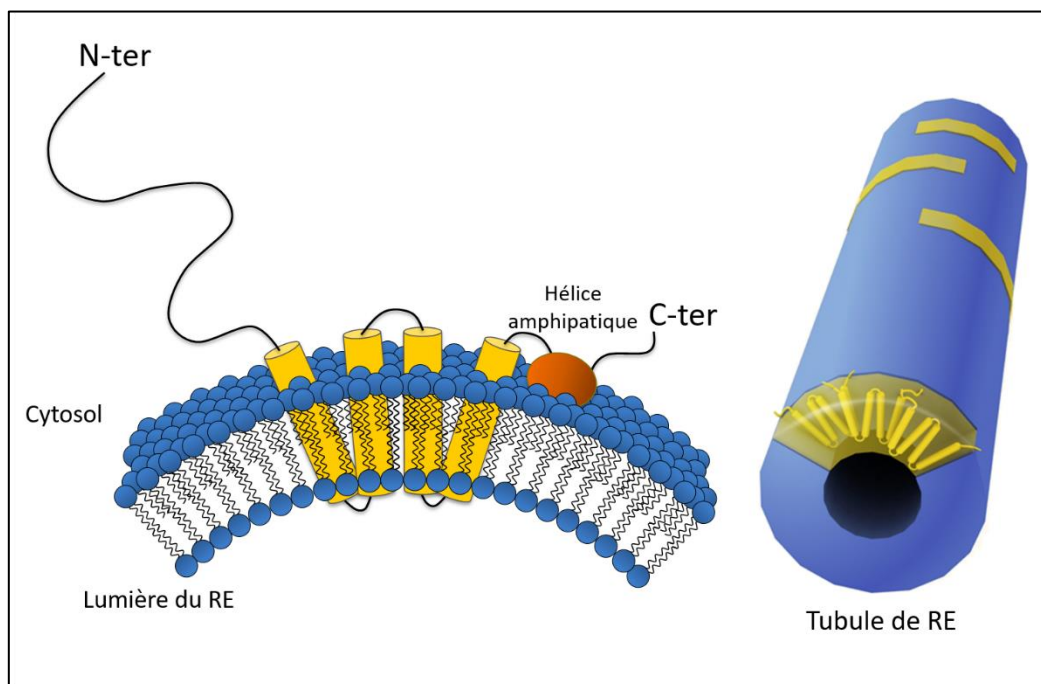


Figure 14 : Structure des réticulons dans les membranes. En jaune, les domaines hydrophobes du RHD, traversant la membrane de part et d'autre, conférant la structure en W des réticulons. En orange, l'hélice amphipatique, dont le côté hydrophobe est associé à la membrane. Cette structure particulière conduit à une courbure positive de la membrane dans laquelle les réticulons sont insérés et s'oligomérisent.

La caractéristique commune des réticulons est de posséder un RHD en partie C-terminale. D'environ 200 acides aminés, ce domaine correspond à deux longs domaines hydrophobes espacés d'une boucle hydrophile, ainsi que la plus récemment découverte hélice amphipatique. Au fil des années, les données de la littérature ont proposé plusieurs modèles de conformations de ces domaines hydrophobes afin d'expliquer leur topologie au sein des membranes permettant de comprendre leur fonction. Aujourd'hui, devant le nombre croissant de protéines réticulons étudiées, il apparaît clair que la grande majorité des RHD sont insérés dans les membranes suivant une conformation en W : chacun des longs domaines hydrophobes correspond en fait à deux domaines transmembranaires successifs, sans réelle séparation (Breeze *et al*, 2016). D'après les derniers modèles, les deux domaines transmembranaires de chaque région hydrophobe traversent de part et d'autre la bicouche lipidique, arrivant à la surface interne de celle-ci mais sans avoir de boucle luménale (Breeze *et al*, 2016). Une différence notable entre les RHD présents chez les réticulons et les autres protéines contenant des RHD est la longueur de la boucle hydrophile située au milieu du RHD, plus longue chez les réticulons (66 acides aminés dans Rtn4/Nogo).

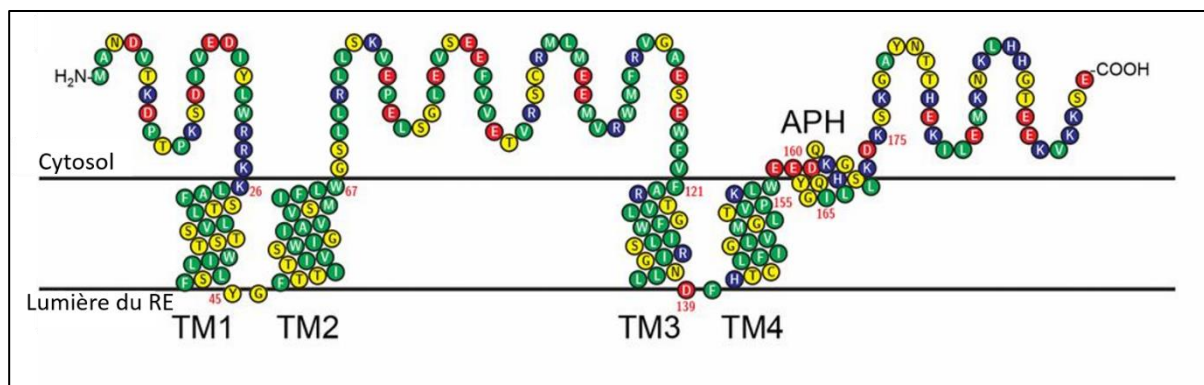


Figure 15 : Représentation schématique de l'insertion de RTN13 dans les membranes, basée sur l'analyse du caractère hydrophatique des acides aminés : Rouge représente acide, bleu basique, jaune polaire non chargé, et vert hydrophobe. TM1-4 identifient les domaines transmembranaires du RHD et APH l'hélice amphipatique (adapté de Breeze et al., 2016).

Cette conformation particulière ainsi que les dimensions de ces domaines transmembranaires confèrent différentes propriétés aux protéines les contenant. En effet, le RHD module l'oligomérisation de ces protéines, formant des oligomères peu mobiles dans les membranes, et conduisant à la courbure des membranes. *In vivo*, la surexpression de RTNs conduit à une constriction des tubules de RE ainsi qu'une diminution de la quantité de feuillettes au profit de tubules (Anderson & Hetzer, 2008; Sparkes *et al*, 2010; Tolley *et al*, 2008). *In vitro*, la seule présence de Rtn1 purifié depuis la levure dans des protéoliposomes génère des tubules de membrane, propriété partagée avec Yop1 (Shibata *et al*, 2008). La taille précise des domaines transmembranaires semble critique pour la capacité de ces protéines à induire une courbure des membranes. En effet, un raccourcissement de ceux-ci dans RTNLB13, plus petite protéine réticulon chez *A. thaliana*, entraîne une perte par celle-ci de sa capacité à induire des tubules, à former des oligomères et perd sa localisation aux membranes présentant une courbure élevée (Tolley *et al*, 2010). De façon similaire, l'allongement des domaines transmembranaires du RHD de RTN4 dans des cellules humaines en culture entraîne une perte de fonction de celui-ci dans la détermination de la courbure des membranes et dans l'induction des tubules de RE (Zurek *et al*, 2011), mais sont correctement insérés dans les membranes et sont capables d'oligomérisation. Cette étude montre, par des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching), que la mobilité de RTN4 sauvage au sein du RE est très réduite, alors que les RTN4 mutants comprenant des domaines transmembranaires allongés sont plus mobiles.

Plus récemment, un autre domaine caractéristique, proche du RHD et localisé en C-terminal, a été montré comme nécessaire pour la fonction de formation de tubules du réticulon RTNLB13 chez *A. thaliana* (Breeze *et al*, 2016). Une hélice amphipatique (APH) est en effet située en continuité du domaine transmembranaire du RHD le plus proche de l'extrémité C-

terminale. Cette hélice a dans un premier temps été identifiée dans la protéine Yop1p de la levure (Brady *et al*, 2015). Des versions mutées de RTNLB13 tronquées pour la partie C-terminale après le RHD par insertion d'un codon stop ou par l'excision de la partie codant pour l'APH conduisent à la perte de leur capacité, en cas de surexpression, à induire une constriction des tubules (Breeze *et al*, 2016). Les protéines ainsi modifiées maintiennent cependant leur localisation au RE. Des résultats similaires sont obtenus en cas de perte du caractère amphipatique de cette hélice, indiquant que la présence de l'hélice intacte en C-terminal est nécessaire pour la fonction de courbure des membranes de RTNLB13 *in vivo*. De plus, l'analyse de l'hydrophobicité de 250 séquences similaires à celle de l'APH de RTN13LB montre que la grande majorité de celles-ci sont également amphipatiques. Cela suggère que les protéines réticulons possèdent très majoritairement une hélice amphipatique similaire.

Les protéines de type réticulons ont donc une structure très particulière, et la question des mécanismes conduisant à leur insertion dans les membranes du RE se pose. En effet, les réticulons sont dépourvus de peptide signal, et pour la grande majorité deux domaines transmembranaires particuliers situés en partie C-terminale. Une première expérience pour expliquer la translocation a consisté à traduire RTN3 *in vitro* à partir d'un plasmide en présence ou non d'une préparation de microsomes d'origine canin (He *et al*, 2007). Lorsque cette dernière est présente lors de la traduction, RTN3 est détecté ensuite en quantité et est présent dans la fraction correspondant aux membranes. Lorsque la préparation est ajoutée après la traduction, ou lorsqu'elle n'est pas ajoutée, RTN3 reste dans la fraction soluble. Cela suggère que la translocation dans les membranes de RTN3 est un évènement co-translationnel, mais le mécanisme précis n'a pas encore été élucidé. Plus récemment, un autre mécanisme possible de translocation a été proposé pour RTN4C ainsi qu'une protéine contenant un RHD, Arl6P1. Les chercheurs Y. Yamato et T. Sakisaka ont synthétisé *in vitro* des versions taguées de ces protéines avant de les incuber avec des cellules HeLa semi-perméabilisées. A partir de leurs localisations au RE et leur détection par Western blot dans la fraction membranaire, ils montrent que RTN4C et Arl6P1 sont insérées post-translationnellement dans les membranes du RE. Le traitement au carbonate de sodium, éliminant les protéines membranaires périphériques, n'élimine pas RTN4C et Arl6P1, ce qui permet de montrer que ces deux protéines sont véritablement insérées dans les membranes (Yamamoto & Sakisaka, 2018). Le facteur de biogénèse des peroxysomes Pex19 est impliqué dans la reconnaissance des protéines contenant un RHD en cours de traduction, et coopère avec Pex3 pour leur insertion post-translationnelle dans les membranes du RE. Il reste

cependant à déterminer si ces mécanismes proposés concernent l'ensemble des réticulons et des protéines contenant des RHD, et s'ils sont évolutivement conservés.

La fonction principale des réticulons et des protéines contenant des RHD dans les cellules, conférée par la structure particulière de leur RHD, est d'induire des courbures dans la bicouche lipidique du RE, et ainsi participer à l'organisation tridimensionnelle du réseau de RE. En effet, et comme mentionné auparavant, la présence et l'oligomérisation de réticulons fonctionnelles promeuvent et sont suffisantes pour induire la formation de tubules. La surexpression de réticulons dans différents types cellulaires conduit à une présence plus grande de tubules de RE ainsi que de la constriction de ceux-ci. Leur présence *in vitro* conduit à la formation de tubules lorsqu'ils sont mis en présence de phospholipides (Hu *et al*, 2008). Des observations similaires ont été faites avec une autre classe de protéines, DP1/Yop1/REEP (Receptor expression-enhancing protein), qui contiennent également des RHD. Cela a permis de proposer un modèle de la formation des tubules de RE où les réticulons et les REEPs agissent de façon synergique pour établir la courbure des membranes et la morphologie du réseau de RE en stabilisant les tubules.

c- Autres aspects fonctionnels des réticulons

Bien que majoritairement localisés au RE, en particulier au niveau des tubules, les réticulons peuvent également être présents au niveau de l'appareil de Golgi et à la membrane plasmique. Différentes données vont dans le sens d'un rôle des réticulons dans le transport vésiculaire de membranes. La surexpression de RTN3 dans des cellules HeLa entraîne un défaut de transport rétrograde depuis le Golgi vers le RE (Wakana *et al*, 2005). Des réticulons ont été montrés comme interacteurs de différents acteurs du transport vésiculaire : par exemple, RTN1C co-immunoprécipite avec des composants des complexes SNAREs comme les syntaxines, ou VAMP2 (Steiner *et al*, 2004). L'expression ectopique d'un fragment de RTN1C dans des cellules PC12, cellules issues de tumeur des glandes surrénales de rat, entraîne une augmentation de la sécrétion d'hormone de croissance (Steiner *et al*, 2004), et RTN2B régule positivement le transport pour l'exposition du transporteur neuronal de glutamate EAAC1 (Liu *et al*, 2008). Chez *C. elegans*, la première étude sur la caractérisation de RET-1, alors indiqué comme RTN-1, a montré une interaction avec RME-1, un régulateur de l'endocytose (Iwahashi *et al*, 2002). Le locus *ret-1* étant le seul locus de gène réticulon dans cette espèce, cela suggère que l'implication des réticulons dans le transport vésiculaire est apparu rapidement au cours de l'évolution des eucaryotes (Di Sano *et al*, 2012).

Une autre fonction de certains réticulons est la modulation de l'apoptose, en particulier en liaison avec la signalisation pro-apoptotique liée au stress du RE. La surexpression de RTN1C ou RTN4A/B conduit à induire l'apoptose en inhibant les facteurs anti-apoptotiques Bcl-XL et Bcl-2, et celle de RTN1C, RTN3, et RTN4B induit l'apoptose par induction du stress du RE. Dans des cellules de neuroblastome, la surexpression de RTN1C conjointe à un stress du RE entraîne une augmentation de la mort cellulaire (Di Sano *et al*, 2007). RTN3 active indirectement, dans les cellules HeLa, des caspases et entraîne la libération du cytochrome C suite à la perte du potentiel de membrane mitochondrial (Xu *et al*, 2006). Cependant, RTN4B pourrait avoir un effet anti-apoptotique, et RTN3, lors d'un stress du RE, pourrait participer à l'effet protecteur en contribuant à la translocation de Bcl-2 à la mitochondrie (Wan *et al*, 2007). RTN3 interagit avec Bcl-2 *in vivo* et *in vitro* et module son accumulation dans les mitochondries (Zhu 2007).

Les réticulons peuvent avoir des rôles plus spécifiques. RTN1C peut par exemple se lier à l'ADN en fonction de son état d'acétylation (Fazi *et al*, 2009). L'extrémité N-terminale de RTN1C a un rôle régulateur d'une chaperonne impliquée dans la réponse au stress du RE, la PDI (Protéine Disulphide Isomérase) (Bernardoni *et al*, 2013). RTN3 a quant à lui un rôle dans l'autophagie. D'une part, c'est un récepteur de l'autophagie sélective des tubules de RE (voir partie autophagie) et d'autre part, il participe à la formation d'un complexe inactif Bcl-2/Beclin-1, inhibant ainsi Beclin-1 et donc l'induction de l'autophagie (Chen *et al*, 2011). Les protéines RTN4, aussi appelées Nogo, sont impliquées dans différents processus en lien avec des inflammations, comme le recrutement des leucocytes (Schanda *et al*, 2011), l'inhibition de la migration des cellules endothéliales (Wälchli *et al*, 2013), ou la régulation de la plasticité synaptique, de façon indépendante de leur motif RHD (Tews *et al*, 2013). De plus, le premier effet élucidé de Nogo-A/RTN4A est d'inhiber la régénération neuronale. Cet effet serait médié par l'exposition extracellulaire de Nogo66, la boucle reliant les deux domaines hydrophobes du RHD, au niveau des oligodendrocytes, déclenchant une voie de signalisation via un récepteur spécifique.

De façon plus inattendue, il a été montré que des réticulons chez *A. thaliana*, RTN20 et RTN19, n'ont pas de rôle dans la courbure des membranes : contrairement aux autres réticulons, leur surexpression n'entraîne pas la constriction des tubules. Alors que RTN19 est localisé à l'ensemble du RE, RTN20 se localise en points le long de la membrane du RE. Ces deux réticulons ont un rôle dans la régulation des lipides. Leur déplétion entraîne une diminution de la présence de stérols dans les racines (Kriechbaumer *et al*, 2018).

2. Localisation des différents réticulons

a- Localisation subcellulaire des réticulons

Dans les cellules, les réticulons sont très majoritairement localisés dans les membranes du RE, en particulier au niveau des tubules. Cependant, les réticulons peuvent ne pas marquer chaque sous-compartiment du RE, et ils peuvent être présent au niveau d'autres membranes comme celles de l'appareil de Golgi, ou la membrane plasmique. Par exemple, chez la drosophile, l'immunolocalisation de Rtn11, dans des cellules en culture S2, coïncide majoritairement avec un marquage anti-HDEL. Rtn11 ne présente qu'une colocalisation très partielle avec une autre protéine du RE, Boca, chaperone de récepteurs lipidiques, et elles semblent présentes dans des domaines séparés, alors que Rtn11 colocalise avec l'immunomarquage de Golgi (Wakefield & Tear, 2006). De plus, des différences de localisation subcellulaires peuvent être mises en évidence entre plusieurs protéines de réticulons au sein d'une même espèce. Chez *A. thaliana*, AtRTNLB2 et AtRTNLB4 localisent principalement aux tubules de RE, mais AtRTNLB4 est particulièrement présent, comparativement à AtRTNLB2, aux tubules associés aux chloroplastes, et est retrouvé au niveau des feuillettes.

b- Patrons d'expression des différents réticulons et de leurs isoformes

Les réticulons avec leurs différentes isoformes présentent des patrons d'expression différents, dont certains sont associés à une spécificité tissulaire ou à certains organes. Chez les invertébrés, les isoformes issues d'un locus unique sont exprimées spatio-temporellement très différemment. Une souche exprimant Rtn11-GFP (caractérisée parmi une librairie de souches où des exons correspondant à la GFP ont été introduits au hasard dans des introns) permet d'observer le patron d'expression des isoformes E et F, qui sont enrichies dans le système nerveux mais retrouvées ubiquitairement. L'utilisation de sondes ARN ciblant les exons spécifiques des différents ARNm issus de *Rtn11* a montré en outre que les transcrits G et D sont exprimés au cours du développement, au pôle postérieur de l'embryon, puis provisoirement ubiquitairement, avant de disparaître. Enfin, le transcrit A est exprimé faiblement au cours du développement avant d'être présent dans l'épiderme et l'intestin, et est absent du système nerveux (Wakefield & Tear, 2006). Chez *C. elegans*, le gène *ret-1* (précédemment noté *rtn-1*) est à l'origine de l'expression de multiples isoformes (voir partie Résultats). Une étude utilisant le promoteur des transcrits des isoformes G (plusieurs transcrits avec la même séquence codante) fusionné à une

séquence codant pour la GFP a montré que cette isoforme est très majoritairement exprimée dans les neurones (Torpe *et al.*, 2017).

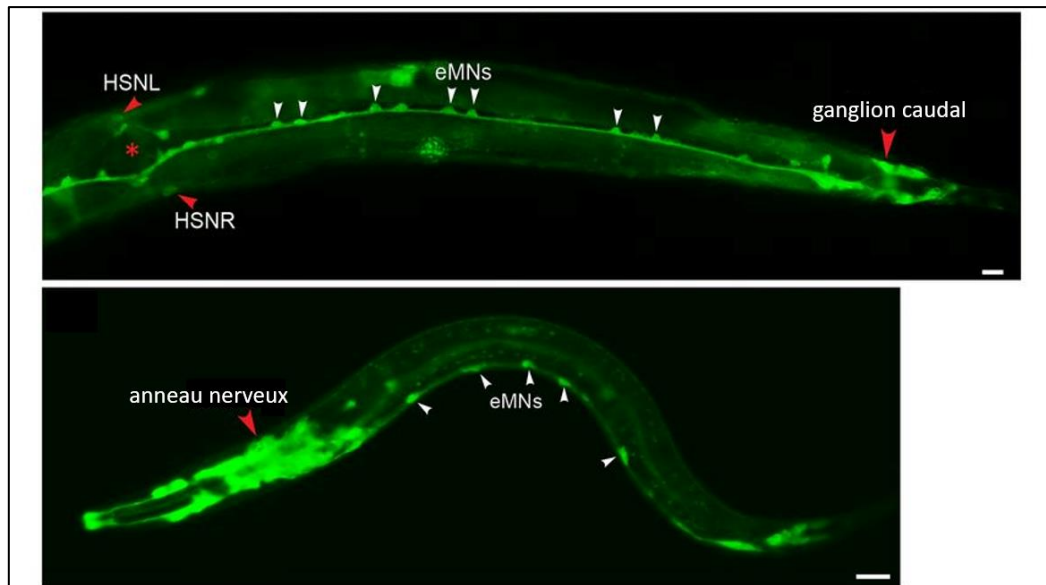


Figure 16 : L'isoforme G de RET-1 est exprimée dans les neurones. L'expression de la GFP sous le contrôle de la région promotrice des transcrits codant pour les isoformes G de RET-1 révèle une expression neuronale forte. eMNs : embryonic motor neurons, HSN : hermaphrodite-specific neurons. Barre d'échelle : 10 μ m (adapté de Torpe *et al.*, 2017).

De plus, au cours d'une étude antérieure, n'identifiant alors que trois isoformes, il a été observé par immunolocalisation que RTN-C, correspondant à une des actuelles isoformes courtes de RET-1, était exprimée uniquement au cours de l'embryogénèse (Iwahashi *et al.*, 2002).

Chez les mammifères, les quatre protéines réticulons, indistinctement de leurs isoformes, présentent des expressions différentes : chez l'Homme, d'après « The human protein atlas », RTN-1 est exprimé dans les tissus nerveux ainsi que dans le pancréas, RTN2 est présent dans les muscles striés et lisses, ainsi que dans le sein, RTN3 principalement dans le système nerveux, et dans certaines glandes endocrines, les muscles, les poumons, le colon et des tissus mous, et RTN4 est principalement présent dans le système nerveux et le testicule, et de façon moindre dans le colon. De plus, les isoformes peuvent présenter des patrons d'expression très différents, à l'instar de ce qui s'observe chez les invertébrés. Par exemple, RTN2-B est localisé dans le système nerveux, RTN2-C est exprimé fortement dans les muscles squelettiques (Geisler *et al.*, 1998; Roebroek *et al.*, 1998). Chez la souris adulte, une isoforme courte (25 kDa) de RTN3 est exprimée très fortement dans le cortex, et est retrouvée dans les poumons, le foie, l'œil, l'ovaire et le testicule, et est absent du cœur et des muscles squelettiques (Figure 17, Shi *et al.*, 2014). L'isoforme la plus longue prédite par les auteurs a été quant à elle détectée uniquement dans les tissus adipeux. En outre, dans les jeunes souris de stade P5, l'isoforme de 25 kDa est également

très exprimée dans le cerveau, ainsi que dans les tissus périphériques de façon moindre, mais aussi dans le cœur, indiquant que cette expression dans le cœur est contrôlée au cours du développement. Une autre isoforme de 95 kDa est par contre exprimée dans le cerveau des adultes mais pas dans celui des souris néonatales (Shi *et al*, 2014).

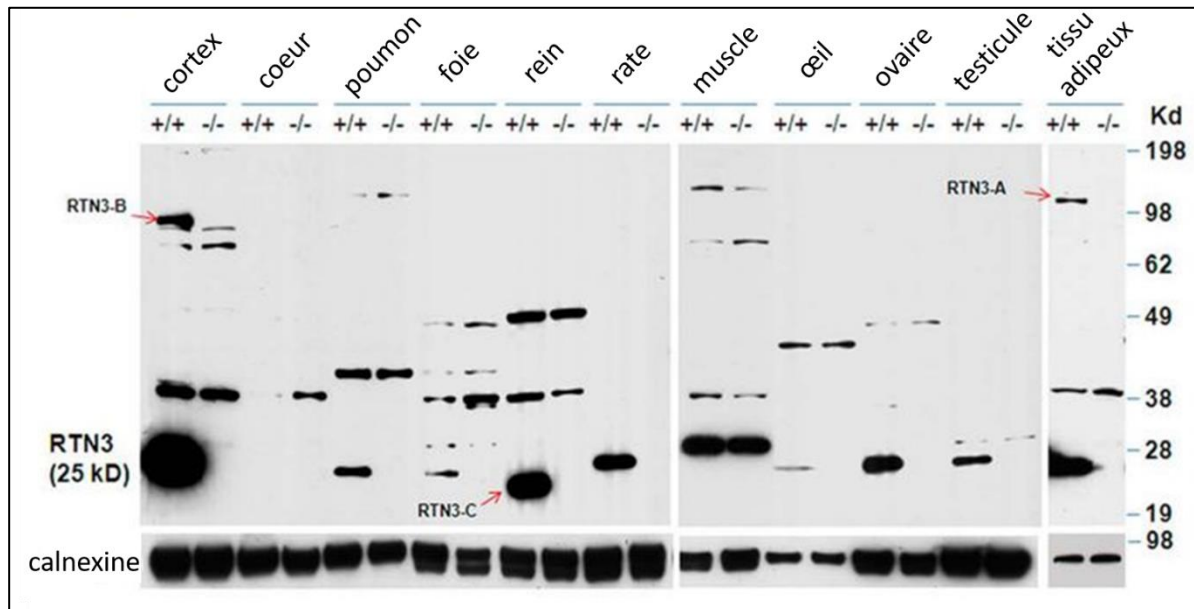


Figure 17 : Western-blot à partir de lysats de tissus de souris adultes sauvages (WT) ou mutantes nulles RTN3. L'anticorps utilisé ; R458, reconnaît toutes les isoformes de RTN3. Un anticorps contre la calnexine a été utilisé pour contrôler la quantité de protéine. Les isoformes présentent des patrons d'expression différents (adapté de Shi *et al.*, 2014).

RTN1-A, seule isoforme détectée dans ces conditions chez la souris, est également fortement exprimé dans le système nerveux, et faiblement dans des tissus périphériques comme la rate et le poumon (Shi *et al*, 2017). Les isoformes de RTN4 ont des patrons d'expression différents. RTN4A est exprimé majoritairement dans le système nerveux, ainsi que plus minoritairement au niveau de la peau, des muscles squelettiques, le cœur, et des cellules du système immunitaire (Schwab, 2010, 20). RTN4B est exprimé dans le système nerveux et d'autres tissus périphériques comme l'endothélium vasculaire (Acevedo *et al*, 2004), et RTN4C dans les cellules musculaires, et dans certains neurones (Josephson *et al*, 2001). Dans les cellules en culture, RTN4A et RTN4B sont exprimés dans les cellules épithéliales, les fibroblastes et les cellules neuronales (Rämö *et al*, 2016).

3. Implications physiopathologiques

Les réticulons ont un lien avec des pathologies humaines graves comme les cancers ou des maladies associées au système nerveux (Chiurchiù *et al*, 2014). La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative progressive la plus courante. Elle résulte d'une dégénérescence des neurones au niveau de l'hippocampe et est caractérisée par l'accumulation de plaques amyloïdes, composées de peptides amyloïdes- β ($A\beta$) et des enchevêtrements neurofibrillaires de protéine tau hyperphosphorylée (Holtzman *et al*, 2011). Les 4 réticulons humains co-immunoprécipitent avec BACE1 (Beta-site amyloid precursor enzyme 1), impliquée dans la maturation des peptides amyloïdes- β ($A\beta$) (He *et al*, 2004), et la régulent négativement. La surexpression de RTN3 *in vitro* dans des cellules HEK-293 réduit le niveau de $A\beta$, et sa déplétion entraîne une augmentation de celui-ci (He *et al*, 2004). De plus, chez certains patients, le niveau de RTN3 est réduit (Yokota *et al*, 2006). Les domaines RHD de RTN3 et RTN4 semblent être critiques pour réguler négativement BACE1 (Kume *et al*, 2009) qui colocalise notamment avec RTN3. Cependant, RTN3 peut également être accumulé dans les neurites dystrophiques chez des patients Alzheimer, et sa surexpression chez la souris entraîne des défauts morphologiques des neurones similaires à ceux observés dans le cas d'Alzheimer (Hu *et al*, 2007).

Dans le cas de la sclérose latérale amyotrophique (ALS), ou maladie de Charcot, maladie neurodégénérative fatale entraînant la mort cellulaire de nombreux neurones moteurs, la quantité de d'ARNm codant pour RTN4A/B, faible en condition normale, est augmentées, et celle pour RTN4C est réduite (Dupuis *et al*, 2002; Jokic *et al*, 2005). Un lien a été établi avec la surexpression de RTN4A dans les cellules musculaires et un défaut de la jonction neuromusculaire, menant à la dégénération des neurones moteurs (Jokic *et al*, 2005). Cependant, l'expression forte de RTN4A n'est pas nécessairement liée à cette pathologie, et peut aussi être détectée dans d'autres types de myopathies, comme la polymyosite ou la dermatomyosite (Wojcik *et al*, 2006). La spécificité de RTN4A comme biomarqueur de l'ALS est donc controversée. La surexpression de *rtn4a1* (homologue de RTN4A) dans les muscles du poisson zèbre adulte entraîne cependant des défauts similaires à ceux observés dans le cas de l'ALS (Lin *et al*, 2019).

RTN4A semble également en lien avec la sclérose multiple (MS), maladie inflammatoire chronique dégénérative, caractérisée par des épisodes intermittents de démyélinisation et de perte d'axone dans le système nerveux central. Plusieurs observations, comme par exemple la présence d'auto anticorps contre RTN4A chez des patients, suggèrent un effet aggravant de RTNA4 sur

cette pathologie, et la déplétion en RTN4 chez des souris modèles de la pathologie cause un effet protecteur (Karnezis *et al*, 2004). Le ciblage de RTN4A et de la signalisation dépendant de Nogo66 pourrait ainsi être une piste thérapeutique dans cette pathologie.

La paraplégie spastique familiale (HSP) est un ensemble de maladies rares affectant le système nerveux central, de cause génétique. Elle entraîne une faiblesse musculaire progressive des membres inférieurs, résultant d'une dégénérescence des motoneurons liée à un défaut de transport le long de l'axone (Blackstone *et al*, 2011). Plusieurs mutations observées dans cette maladie touchent des protéines liées à l'organisation tridimensionnelle du RE, comme la spastine, l'atlastin-1, REEP1, et RTN2 (Blackstone, 2012). Ces protéines peuvent interagir avec les réticulons RTN1, 3 ou 4. Les mutations dans le gène codant pour RTN2 peuvent entraîner une paraplégie spastique autosomale dominante, vraisemblablement par haplo-insuffisance (Montenegro *et al*, 2012).

Les différents réticulons ont donc un lien avec plusieurs maladies neurodégénératives, même si les mécanismes sont seulement partiellement élucidés. Ce lien semble souvent dépendre de la fonction canonique des réticulons dans l'organisation du RE, mais pourrait également dépendre de fonctions plus spécifiques, potentiellement encore à découvrir.

RTN4 a également une relation avec les cancers. En effet, une expression plus faible de RTN4 dans des cancers issus de patients est associée à une meilleure survie, dans des types variés de cancers (Pathak *et al*, 2018). La déplétion en RTN4 retarde en outre la prolifération cellulaire de lignées cellulaires cancéreuses, et l'absence de RTN4 dans ces lignées augmente la sensibilité au paclitaxel, utilisé en chimiothérapie. Dans les cancers colorectaux, RTN4B a une fonction de répression de l'apoptose et ainsi participe au développement du cancer (Kawaguchi *et al*, 2018).

III/ L'autophagie, processus dégradatif clé des cellules eucaryotes

1. Généralités

L'autophagie est un processus cellulaire dégradatif exclusif aux cellules eucaryotes. Elle conduit à la dégradation de composants cytoplasmiques et d'organites tels que des mitochondries, des peroxysomes, le réticulum endoplasmique. Ce processus permet à la fois de renouveler les organites et maintenir l'homéostasie cellulaire, et de mobiliser en condition de stress des réserves énergétiques de la cellule comme des acides gras et des acides aminés.

La découverte de ce processus a commencé avec la découverte par Christian de Duve (De Duve *et al*, 1955) des lysosomes, puis de l'observation dans des cellules rénales de souris par C. Clark notamment, en microscopie électronique, de vésicules à double membrane distinctes des lysosomes contenant notamment des mitochondries altérées (Clark, 1957) . Ce processus cellulaire par lequel des organites et des portions de cytoplasme sont séquestrés par des structures membranaires a été nommé "autophagie" par Christian de Duve en 1963, terme dérivé de la langue Grecque et signifiant « se manger soi-même » (De Duve, 1963; De Duve & Wattiaux, 1966). L'étude chez la levure de ce processus, dans les années 1990, ont permis de montrer les premières bases moléculaires de ce mécanisme. Baba et Oshumi observent ainsi, en condition de restriction nutritionnelle, des vésicules à double membrane à contenu cytoplasmique dans le cytoplasme, et à simple membrane dans la vacuole, équivalent du lysosome, après fusion de la membrane de cette dernière avec la membrane externe de l'autophagosome (Baba *et al*, 1995; Takeshige *et al*, 1992). Le laboratoire d'Oshumi publie en 1993 le premier crible identifiant une centaine de mutants de l'autophagie, basée sur l'absence d'accumulation d'autophagosomes en conditions de carence nutritionnelle (Tsukada & Ohsumi, 1993). Après le clonage du premier gène autophagique ATG1 par le même laboratoire, de nombreux autres gènes autophagiques, essentiels ou non, ont été mis en évidence. Les découvertes d'Oshumi sur l'autophagie lui ont valu d'être récompensé par le prix Nobel de physiologie ou médecine en 2016.

Il existe trois types d'autophagie : la macroautophagie, la microautophagie et l'autophagie médiée par les chaperones (montrée uniquement dans les cellules de mammifère). Ces types ont en commun la dégradation des cargos par le lysosome mais diffèrent par leurs mécanismes moléculaires. La macroautophagie est la forme la plus étudiée et semble être la plus importante en terme de flux. Elle consiste en la formation d'une structure à double membrane, le phagophore, qui va subir une élongation progressive et va englober les composants

cytoplasmiques à dégrader avant de se refermer et de séquestrer ceux-ci dans les autophagosomes. La fusion avec le lysosome forme l'autolysosome et permet par l'apport d'enzymes lysosomales la dégradation de son contenu. Le processus de macroautophagie sera appelée « autophagie » dans le reste du manuscrit.

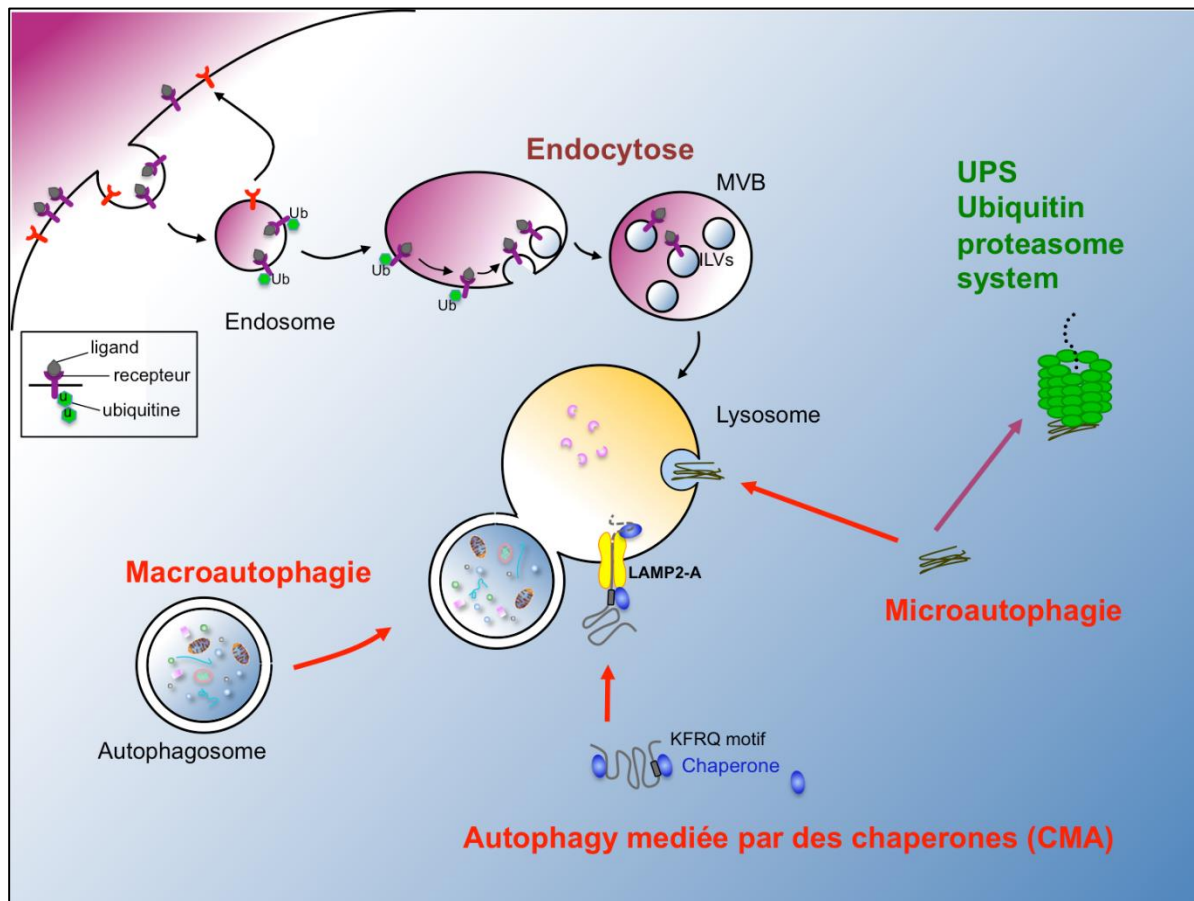


Figure 18 : Principaux systèmes de dégradation dans les cellules eucaryotes.

La microautophagie est un processus consistant en l'internalisation de portions de cytoplasme directement dans le lysosome par invagination de la membrane lysosomale. Au cours de ce processus, la membrane lysosomale s'invagine et forme progressivement des structures caractéristiques appelées tubes autophagiques (Müller *et al*, 2000). Une vésicule à l'extrémité du tube se forme et s'étend avant de se détacher dans le lysosome. Comme la macroautophagie, la microautophagie peut être sélective ou non. Les mécanismes à l'origine de ce processus et son intérêt physiologique sont encore mal connus, mais il est établi qu'il est en relation étroite avec les autres types d'autophagie. En effet, le flux résultant de l'invagination de la membrane lysosomale permet de réguler la taille des lysosomes en dégradant les excès de membrane accumulés, lors de la macroautophagie par exemple.

Le dernier type d'autophagie, observé pour la première fois en 1981, est l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) (Cuervo, 2004; Xilouri & Stefanis, 2015). Elle cible individuellement les protéines contenant le motif KFERQ, présent dans environ 30% des protéines cytosoliques. La CMA entraîne la translocation directement dans le lysosome des protéines mal repliées grâce à la protéine chaperonne Hsc70 (Heat shock cognate 70) et au récepteur membranaire LAMP-2A (Lysosome Associated Membrane Protein type 2A). Ce type particulier d'autophagie n'implique pas la formation de vésicules, contrairement aux deux autres.

a- Un processus dégradatif à plusieurs étapes

Le processus dynamique de la macroautophagie consiste en différentes étapes de formation et de fusion membranaires, telles que l'initiation, l'élongation et la maturation, impliquant un grand nombre d'acteurs moléculaires.

L'autophagie débute par la formation d'une structure membranaire, aplatie, en forme de coupe, appelée phagophore. Cette structure va ensuite subir une élongation progressive par apport de membranes. La source de ces membranes reste débattue aujourd'hui, et semble dépendre à la fois de l'espèce et du type d'autophagie. Ainsi, chez la levure, l'origine de la nucléation du phagophore a été montrée comme étant un unique site près de la vacuole, nommé structure pré-autophagosomale (PAS) (Suzuki & Ohsumi, 2010; Suzuki *et al*, 2001). Chez les eucaryotes supérieurs, l'origine semble plus diverse. Il a cependant été montré qu'en cas d'autophagie induite suite à une starvation, la nucléation des phagophores se fait au niveau d'une structure particulière, l'omégasome (nommée d'après sa ressemblance à la lettre de l'alphabet grec en microscopie électronique). Différents acteurs moléculaires sont requis pour la formation de cette structure, qui seront discutés dans la partie « machinerie moléculaire ». Si les omégasomes sont localisés au niveau du RE, ils peuvent être particulièrement présents aux sites de contact RE-mitochondries (Hamasaki *et al*, 2013), ce qui pourrait participer à la contribution en lipide de la membrane externe de la mitochondrie pour le phagophore, montré auparavant (Hailey *et al*, 2010). La transition entre omégasome et phagophore n'est pas encore claire, et notamment la question d'une continuité physique entre les membranes de l'un et de l'autre demeure. D'autres études ont montré que le phagophore peut recevoir des membranes d'autres sources. Ainsi, les sites de sortie du RE (ERES, ER exit sites), le compartiment intermédiaire RE-Golgi (ERGIC) (Ge *et al*, 2013), l'appareil de Golgi (Bodemann *et al*, 2011; Geng & Klionsky, 2010; van der Vaart *et al*, 2010), la membrane plasmique (Ravikumar *et al*, 2010) et les endosomes de recyclage (Knævelsrud *et al*, 2013; Longatti *et al*, 2012; Puri *et al*, 2013) ont

été montré comme étant impliqués comme source de membranes pour les phagophores. Il reste cependant difficile de discriminer entre site de nucléation du phagophore ou source de membrane pour l'élongation. Comme la plupart de ces données proviennent d'expériences de starvation (carence en nutriments), la ou les sources de membrane pourraient dépendre du type de signal induisant l'autophagie, et du cargo à dégrader. Ces apports de membrane permettent l'élongation du phagophore autour des cargos. Dans le cas de l'autophagie sélective, il est probable qu'un dialogue s'établisse entre le cargo et les protéines du phagophore afin de guider son élongation et sa courbure (Carlsson & Simonsen, 2015).

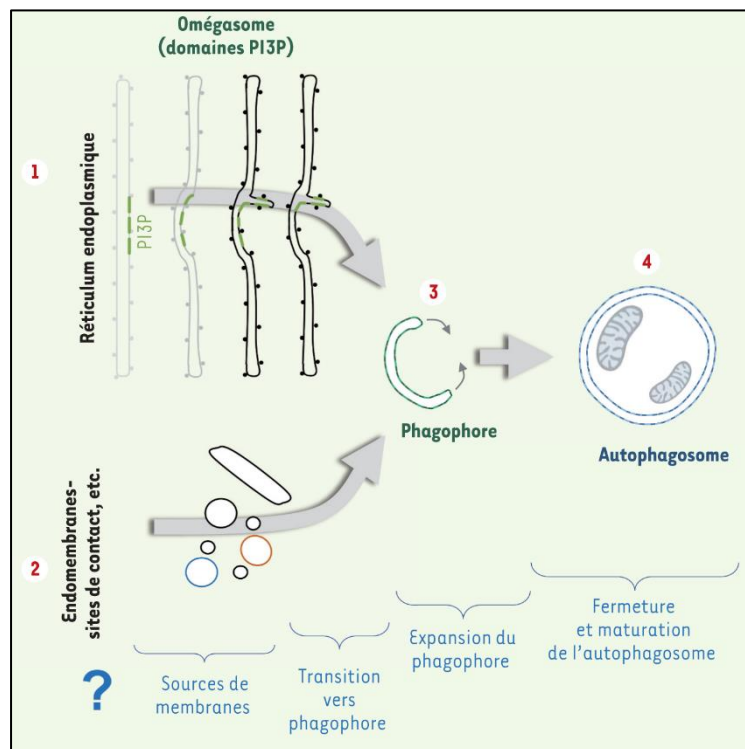


Figure 19 : Formation des autophagosomes et apport de membrane au phagophore. La biogénèse de l'autophagosome nécessite un sous domaine du RE , l'omégasome, qui pourrait être une matrice, en continuité membranaire ou non, de la formation du phagophore. D'autres membranes sont apportées simultanément ou postérieurement par d'autres sources, telles que les mitochondries, les sites de contact RE-mitochondries, les gouttelettes lipidiques, la membrane plasmique ou encore les endosomes de recyclages (issu de Morel, 2017).

La fermeture du phagophore marque la formation de l'autophagosome, séquestrant les constituants cytoplasmiques à dégrader, et ainsi la fin de la phase d'élongation. La membrane externe de l'autophagosome fusionne ensuite avec le lysosome, ou la vacuole chez la levure, formant ainsi l'autolysosome. Cette fusion nécessite auparavant le désassemblage de la machinerie autophagique de la membrane externe de l'autophagosome. Les hydrolases lysosomales comme les cathepsines et les lipases dégradent ainsi la membrane interne de l'autophagosome et son contenu. Cette dégradation permet ensuite la libération dans le

cytoplasme par les perméases du matériel dégradé, qui est donc recyclé et peut permettre la synthèse de nouvelles biomolécules ou de générer de l'ATP (Kovsan *et al*, 2010). Alors que la fusion se fait systématiquement avec la vacuole chez la levure, chez les mammifères l'autophagosome peut également fusionner avec les endosomes précoces ou tardifs pour former une structure appelée amphisome. Les amphisomes fusionnent ensuite avec les lysosomes. La maturation des amphisomes, d'abord du même pH que le cytoplasme, entraîne leur acidification progressive par fusions avec d'autres endosomes ou des lysosomes (Klionsky & Codogno, 2013; Lamb *et al*, 2013).

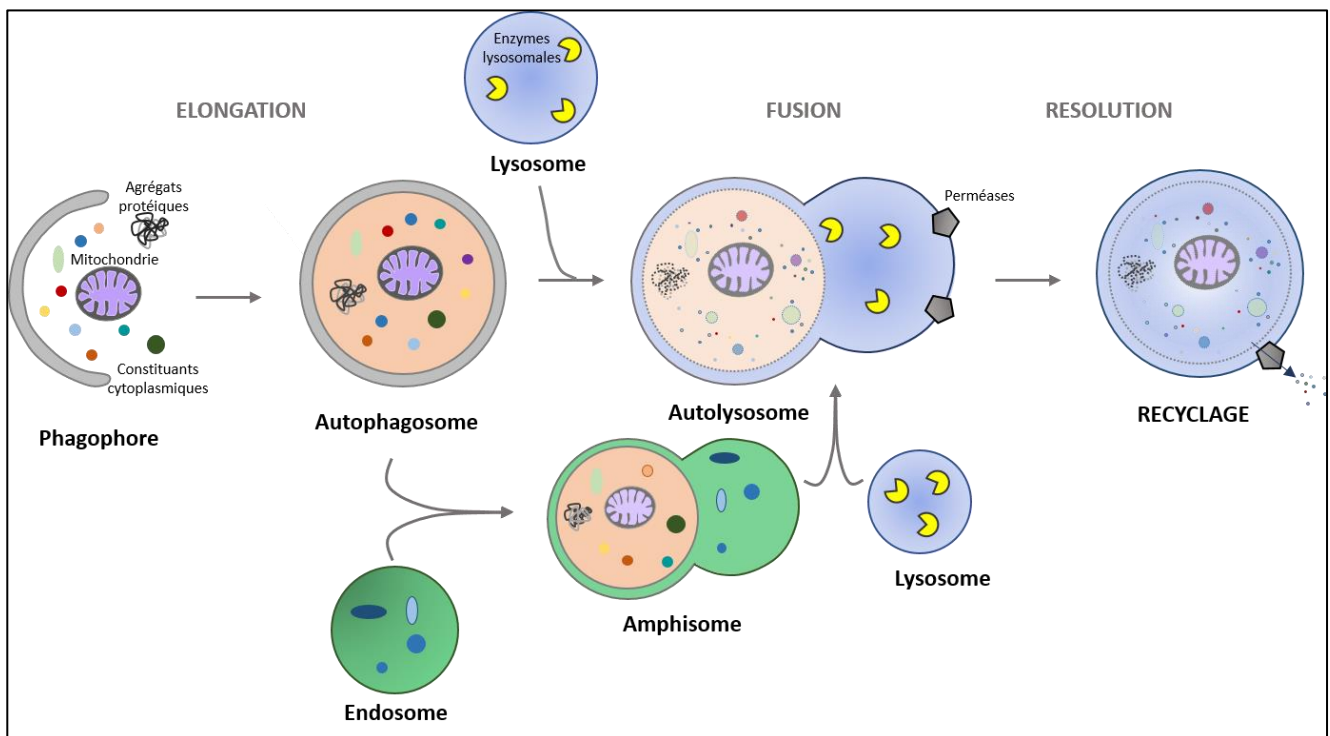


Figure 20 : Les différentes étapes de la voie autophagique. Le phagophore se forme et croît progressivement, et englobe le matériel cytoplasmique à dégrader. Sa fermeture forme l'autophagosome, dont la maturation nécessite la fusion avec le lysosome. Celui-ci apporte les enzymes nécessaires à la dégradation du contenu de l'autophagosome. L'autophagosome peut également fusionner avec l'endosome, et forme alors l'amphisome, qui nécessite également la fusion avec le lysosome. Les produits finaux de dégradation sont relâchés dans le cytosol (Adapté de Céline Jenzer).

a- Machinerie moléculaire

Un grand nombre d'acteurs moléculaires interviennent au cours des différentes étapes du processus d'autophagie, notamment les protéines Atg. Les protéines constituant la machinerie de formation des autophagosomes peuvent être réparties en différents groupes en fonction de l'étape dans lesquelles elles interviennent. Je décris ici succinctement les acteurs moléculaires impliqués chez la levure et les mammifères, davantage d'informations sur les spécificités de *C. elegans*

étant données dans la revue « *Approaches for studying autophagy in Caenorhabditis elegans* » présentée en fin d'introduction.

Étapes précoces de l'autophagie

Le complexe Atg1/ULK, initiateur du processus, comporte une protéine kinase Atg1. Il est médiateur de l'amplitude de l'autophagie (Cheong *et al*, 2005; Kabeya *et al*, 2005; Kawamata *et al*, 2008). Son activité est finement régulée, via des signaux provenant de différentes voies. Chez la levure, elle est principalement régulée par les voies de signalisation dépendant de la présence de nutriments. Atg1 est la seule kinase de la machinerie principale de l'autophagie, et son activité est nécessaire pour la formation d'autophagosomes. La formation de la membrane du phagophore est régulée par le complexe de classe III phosphatidylinositol 3-kinase (PtdIns3K), qui comprend notamment Vps34, Atg14 et Vps30/Beclin1 (He & Klionsky, 2009). Ce complexe forme du phosphatidylinositol-3-phosphate à partir de phosphatidylinositol, et il cible chez la levure le PAS (Structure Pré-Autophagosomale). Par son activité, il participe à recruter au PAS des protéines de l'autophagie, dont Atg18, et est nécessaire au recrutement des vésicules Atg9. Atg9 est la seule protéine transmembranaire de la machinerie autophagique, requise pour l'expansion du phagophore. Chez la levure, Atg9 est localisé au niveau de petites vésicules qui participeraient à l'apport de membranes au phagophore. Elle participe au recrutement des protéines Atg ayant un rôle plus tardif dans le processus d'autophagie, comme Atg18 et Atg8 (Papinski & Kraft, 2014). Le recrutement des protéines essentielles à l'autophagie, Atg8 et Atg12, présente dans les deux cas un système de conjugaison présentant de nombreuses similitudes avec celui de l'ubiquitine. Atg8 est dans un premier temps synthétisé avec un résidu arginine C-terminal, clivé ensuite par Atg4 (Kim *et al*, 1999; Kirisako *et al*, 1999). Atg7 et Atg3 sont ensuite impliquées dans les conjugaisons successives d'Atg8 résultant à la formation de Atg8-PE, soit la lipidation de Atg8 au niveau d'un phosphatidyléthanolamine présent dans la membrane des phagophores et autophagosomes. Un second clivage par Atg4 peut ensuite libérer Atg8 de sa liaison avec le PE (Kirisako *et al*, 2000). De manière similaire, par conjugaisons successives, Atg12 est liée de manière covalente à Atg5, et elles forment un complexe avec Atg16. Atg7 est aussi impliquée dans cette première étape de conjugaison, et Atg10 ensuite. Ce complexe participe ensuite à la conjugaison finale de Atg8. Chez les mammifères, ce système de conjugaison est très conservé. Les différences majeures sont d'une part qu'il existe pas moins de 6 homologues d'Atg8, divisés en deux sous-familles, LC3 et GABARAP (Weidberg *et al*, 2010), d'autre part qu'Atg4 a 4 homologues, ATG4B étant l'homologue ayant un rôle majeur dans l'autophagie (Li *et al*, 2011). ATG4B clive le précurseur proLC3 après sa glycine C-terminale,

et génère ainsi LC3-I cytosolique, qui devient LC3-II suite à sa conjugaison au PE. Cette lipidation d'Atg8 et homologues est donc régulée et a un rôle important dans la biogénèse des autophagosomes.

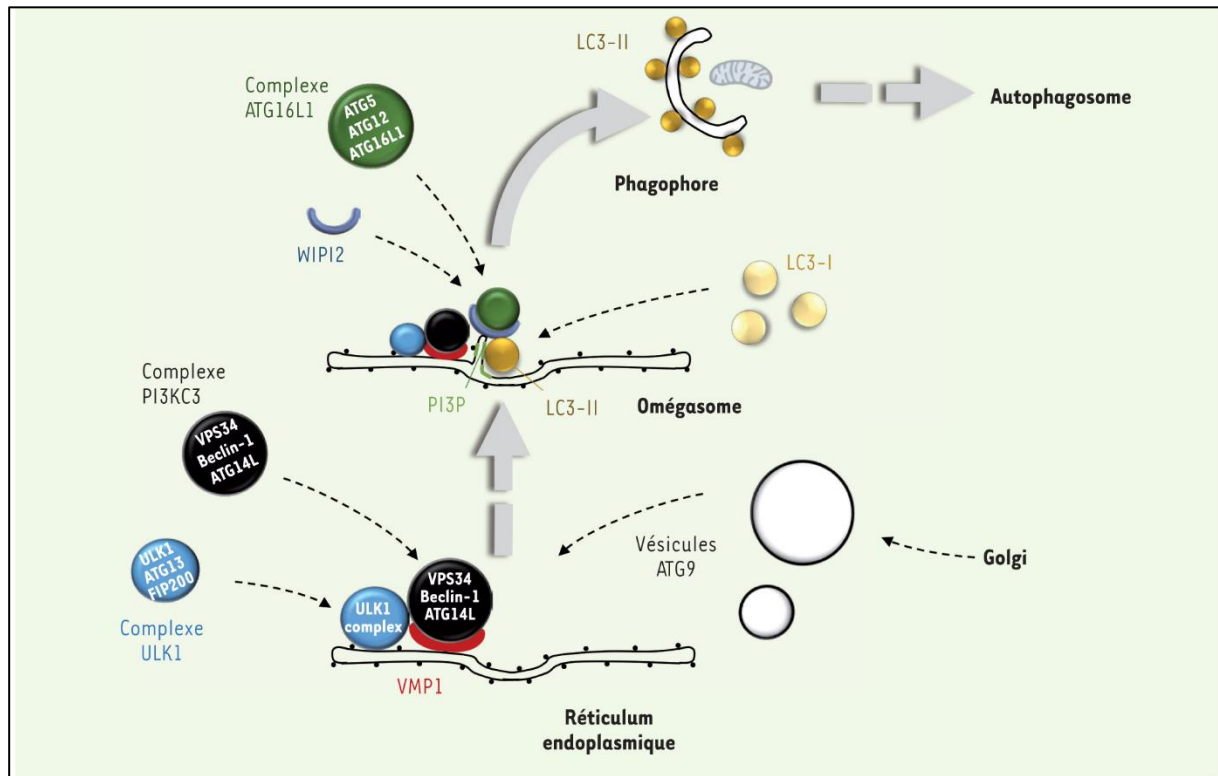


Figure 21 : Initiation de l'autophagie chez les mammifères en cas de starvation. Le complexe ULK-1 alors activé est recruté au niveau du RE et y adresse le complexe PI3KC3. Des vésicules présentant la protéine ATG9 apportent les membranes pour la formation du phagophore. Les différentes protéines de l'autophagie sont recrutées au niveau de l'oméga-some et conduisent in fine à la lipidation de LC3 (issu de Morel, 2017)

Chez *C. elegans*, il existe seulement deux homologues d'Atg8. Basé sur un alignement de séquences, LGG-1 est l'homologue des membres de la famille GABARAP, et LGG-2 de la famille LC3. Atg8 et ses homologues participent notamment à la reconnaissance des cargos (cibles de la dégradation) ou des récepteurs (protéine faisant le lien entre cargo et autophagosome en formation) par interaction protéine-protéine (voir autophagie sélective).

Fusion avec le lysosome et dégradation

Si la majorité des gènes de l'autophagie connus sont impliqués dans les étapes précoces de l'autophagie, peu de données existent à propos des protéines impliquées spécifiquement dans la fusion des autophagosomes à la vacuole ou au lysosome. Ainsi, la machinerie endo-lysosomale est impliquée dans cet évènement et fait intervenir de nombreux acteurs. Les protéines Rab, des GTPase Ras-like, dont l'activité est régulée en fonction de leur liaison au GTP (actif) ou GDP

(inactif), ont des rôles clés au cours des différents processus impliquant le trafic vésiculaire. Une dizaine d'entre elles sont impliquées au cours du processus autophagique, à différentes étapes. Rab4 par exemple a un rôle au début de celui-ci (Talaber *et al*, 2014) et Rab7, de façon similaire à son rôle dans la maturation endosomale, est impliqué dans le transport et la fusion des autophagosomes au lysosome (Hyttinen *et al*, 2013), bien qu'il ait été montré que la fusion directe entre autophagosomes et lysosomes dépend des SNAREs, indépendamment de Rab7 (Itakura *et al*, 2012; Takáts *et al*, 2013). Les protéines SNAREs ont un rôle majeur dans les événements de fusion de membranes. Chez la levure, les SNAREs Vam3 et Vam7 sont impliquées dans la fusion entre autophagosomes et vacuole (Darsow *et al*, 1998; Sato *et al*, 1998). Chez les mammifères, VAMP3 et VAMP7 (vesicle associated membrane protein 7) sont médiateurs respectivement de la fusion entre endosomes et autophagosomes, et entre autophagosomes ou amphisomes et lysosomes (Fader *et al*, 2009). La syntaxine 17 (Stx17) a par ailleurs un rôle essentiel dans les étapes tardives du processus autophagique : recrutée sur des autophagosomes fermés, elle interagit avec d'autres SNAREs pour permettre la formation d'autolysosomes (Itakura & Mizushima, 2013; Itakura *et al*, 2012). Des résultats similaires ont été obtenus chez la drosophile (Takáts *et al*, 2013). Dans des cellules de mammifère, Stx17 est un interacteur d'Atg14 au niveau des sites de contact entre RE et mitochondries, site privilégié de formations d'autophagosomes (Hamasaki *et al*, 2013). Atg14, en plus de son activité précoce dans le processus autophagique, contrôle également l'activité de Stx17 et des SNAREs interagissant avec celle-ci. De plus, Stx17 interagit avec plusieurs membres du complexe HOPS (homotopic fusion and protein sorting), qui ont été tous co-précipités avec STX17 (Jiang *et al*, 2014). La déplétion en VPS33A, VPS16 ou VPS39 entraîne en effet un blocage du flux autophagique, comme la déplétion en STX17. Chez *C. elegans*, il a été montré que VPS39 interagit avec LGG-2, cette interaction jouant un rôle dans la fusion des autophagosomes avec les lysosomes au cours du processus d'alophaque correspondant à la dégradation des composants cellulaires d'origine paternels après la fécondation (Manil-Ségalen *et al*, 2014).

D'autres protéines sont impliquées dans ces étapes tardives du processus, comme les protéines LAMPs, localisées à la membrane endolysosomale et essentielles à la dégradation des autophagosomes (Eskelinen, 2006). L'acidification progressive des autophagosomes suite aux fusions avec le système lysosomal, dépend d'ATPases vacuolaires (v-ATPases) qui établissent l'acidité des lysosomes, à un pH de 4,5. Ces ATPases pompent les protons pour les transloquer du cytosol vers le lumen, et le blocage de leur activité entraîne un dysfonctionnement des enzymes lysosomales, actives à faible pH. Le flux autophagique est alors bloqué (Yamamoto *et al*, 1998).

Après la fusion entre autophagosome et lysosomes, différentes hydrolases comme les cathepsines et les lipases dégradent le contenu de l'autolysosome, la membrane interne autophagique et son contenu. Les produits finaux de la dégradation sont les acides aminés, les acides gras, le glucose et les nucléotides, et sont relargués dans le cytosol par des permeases, ce qui conduit à leur recyclage (Kovsan *et al*, 2010). Les lysosomes peuvent ensuite être reformés à partir des autolysosomes, et cela entraîne un recyclage des constituants membranaires comme les SNAREs et Rab7 (Yu *et al*, 2010).

Comme il s'agit d'un processus dépendant grandement de transport vésiculaire, les microtubules sont impliqués à différents stades du processus autophagique. En effet, plusieurs protéines Atg impliquées dans les étapes précoces (ULK1, Beclin-1, Atg5, Atg12) sont enrichies dans la fraction cellulaire correspondant aux microtubules, suggérant une association des sites de formation des autophagosomes avec la dynamique des microtubules (Mackeh *et al*, 2013). De plus, LC3 est capable de s'associer avec des protéines liées aux microtubules MAP1A (Microtubule associated protein A1), MAP1B, et MAP1S (Mann & Hammarback, 1994). Le nom développé des protéines LC3 est d'ailleurs MAP1LC3 (Microtubule-associated proteins 1 Light chain 3). De plus, les microtubules sont impliqués dans le transport des autophagosomes vers les lysosomes via l'action de la dynéine (Jahreiss *et al*, 2008). Le désassemblage des microtubules entraîne une perte de colocalisation entre autophagosomes et lysosomes (Webb *et al*, 2004), mais les microtubules n'ont pas de rôle direct dans le processus de fusion.

Acteurs de la régulation de l'autophagie

Ce processus à nombreuses étapes dans lequel de nombreux acteurs moléculaires sont impliqués est finement régulé par différentes voies de signalisation, notamment les voies TOR (target of rapamycin), AMPK (adenosin mono phosphate activated protein kinase), insuline/IGF (insuline like growth factors) et la voie de signalisation calcique. De nombreuses revues décrivent les mécanismes connus régulant l'autophagie (Feng *et al*, 2015; Kim & Guan, 2015; Russell *et al*, 2014; Yang *et al*, 2013). La voie qui semble la mieux caractérisée pour l'induction de l'autophagie est celle en réponse à la carence nutritionnelle. TOR (Target of rapamycin) fait partie du complexe TOR 1 et contrôle plusieurs types de facteurs de transcription en réponse à la starvation. Chez les mammifères, mTOR peut faire partie de deux complexes fonctionnellement différents : mTORC1 et mTORC2. La présence d'acides aminés libres entraîne l'activation de mTORC1, ce qui entraîne une inhibition de l'autophagie. En effet, l'inactivation de mTORC1 en présence de nutriments déclenche l'induction de l'autophagie (Kanazawa 2004). Bien que les

mécanismes varient en fonction des espèces, TOR inactive Atg1/ULK1, de laquelle dépend l'induction de l'autophagie, par phosphorylation (Russell *et al*, 2014). TOR inhibe également VPS34, qui fait partie du complexe PI3K, impliqué dans la formation de l'autophagosome (Yuan *et al*, 2013). mTORC1 régule également la maturation des autophagosomes en modulant la biogénèse des lysosomes via la régulation de TFEB (Transcription factor EB) (Martina *et al*, 2012). TOR est ainsi capable de réguler négativement l'initiation et la maturation de l'autophagie. De plus, TOR peut également jouer un rôle dans la dégradation des ARNm correspondant aux protéines Atg, participant également à la répression de l'autophagie en présence de nutriments (Hu *et al*, 2015). A l'inverse, l'AMPK, sérine thréonine kinase, agit positivement sur la régulation de l'autophagie (Egan *et al*, 2011; Kim *et al*, 2011). La présence de glucose entraîne en revanche l'inactivation de l'AMPK. Active, l'AMPK peut directement activer le complexe Atg1/ULK1 en le phosphorylant (Bach *et al*, 2011; Kim *et al*, 2011). Toujours en présence de glucose, l'AMPK régule le complexe PI3K (Kim *et al*, 2013a) pour induire l'autophagie. En l'absence de glucose, l'AMPK phosphoryle et active le complexe TSC1/2 qui inhibe alors l'activation de TOR, et provoque l'inhibition du complexe par phosphorylation, et donc induit l'autophagie. Globalement, les kinases TOR et AMPK participent à la régulation fine, par phosphorylations de différentes cibles, de l'induction de l'autophagie.

b- Fonctions physiologiques dans la différenciation

L'autophagie a de nombreux rôles physiologiques dans différents processus, notamment développementaux. Dans la partie autophagie chez *C. elegans*, je décris différents processus développementaux dans lesquels l'autophagie joue un rôle crucial, ainsi que le lien entre autophagie et vieillissement. Je décrirai donc ici succinctement l'implication de l'autophagie dans les processus d'organogénèse et de différenciation cellulaire, puis les implications physiopathologiques des défauts de l'autophagie.

Par son rôle de dégradation et de recyclage, l'autophagie est un outil clé dans le changement rapide du contenu d'une cellule, en dégradant des protéines ou des organites clés. Elle participe donc à plusieurs processus de différenciation. Lors de l'hématopoïèse, les noyaux et les organites des érythroblastes sont dégradés, pour devenir des érythrocytes contenant les molécules d'hémoglobine. L'autophagie est nécessaire pour cette dégradation, en effet des mutants pour plusieurs gènes *ATG* (*Atg7*, *Atg1*) entraînent un défaut de dégradation dans les

érythrocytes et leur différenciation (Kundu *et al*, 2008; Mortensen *et al*, 2011). De plus, la protéine GATA-1, régulateur maître de l'hématopoïèse, active directement la transcription de des gènes LC3 et GABARAP (Kang *et al*, 2012). La délétion de gènes de l'autophagie affecte également la différenciation des lymphocytes B et T (Bronietzki *et al*, 2015; Miller *et al*, 2008). Chez la souris, la déplétion en Atg7, Atg5 et Vps34 entraîne une forte diminution du nombre de lymphocytes, et ceux restant présentent des mitochondries endommagées (Jia *et al*, 2011; Mortensen *et al*, 2011; Parekh *et al*, 2013; Pua *et al*, 2007). La production d'anticorps dans les cellules plasmiques, effecteurs terminaux du lignage des lymphocytes B est impactée par un défaut de l'autophagie causé par la déplétion en Atg5. De plus, Atg7 joue un rôle dans la maintenance des cellules souches hématopoïétiques (Mortensen *et al*, 2011), et l'autophagie contrôlerait le cycle cellulaire de ces cellules en fonction de la présence de nutriments (Cao *et al*, 2015).

Dans la différenciation des tissus adipeux, l'absence d'Atg5 affecte la différenciation en adipocytes dans des cellules en culture (Baerga *et al*, 2009). De plus, l'inhibition de la voie de signalisation Notch serait impliquée dans cette différenciation via une activation de l'autophagie (Song *et al*, 2015). Chez la souris, la déplétion en Atg5 ou Atg7 entraîne une réduction du nombre d'adipocytes (Singh *et al*, 2009; Zhang *et al*, 2009). Les effecteurs de la différenciation via l'autophagie, notamment la protéine C/EBP α , facteur adipogénique important qui active Atg4, ont été mis en évidence (Guo *et al*, 2013). L'autophagie pourrait également participer à réguler le métabolisme lipidique (Mizushima & Levine, 2010).

Lors des débuts de la découverte de l'autophagie, la présence d'autophagosomes englobant des fractions cytoplasmiques dans les neurones a été mise en évidence (De Duve & Wattiaux, 1966). Depuis, un lien étroit entre autophagie et développement du système nerveux central (SNC) a été établi par de nombreuses études. Chez la souris, l'inactivation de Atg5 ou Atg7 affecte le système nerveux des souriceaux, entraînant un handicap pour s'allaiter (Komatsu *et al*, 2006; Kuma *et al*, 2004). Atg5 a depuis été montrée comme impliquée dans la différenciation des précurseurs neuronaux (Lv *et al*, 2014). Un régulateur autophagique, Ambra1 (activating molecule in Beclin-1-regulated autophagy) s'associant à la kinase Vps34 et impliquée de fait dans la biogénèse des autophagosomes, est fortement exprimé dans le SNC au cours de l'embryogénèse. L'inactivation de Ambra1 chez la souris entraîne une létalité embryonnaire associée à des défauts du SNC (Fimia *et al*, 2007). Dans des embryons de poulets, l'inhibition de l'autophagie par la 3-MA change le patron d'expression spatio-temporel de plusieurs marqueurs de différenciation neuronale et affecte la neurogénèse otique (Aburto *et al*, 2012). Un apport

d'ATP restaure ces défauts de différenciation, suggérant que l'autophagie a un rôle d'apport d'énergie dans ces événements de différenciation. Chez *C. elegans*, il a été montré que l'autophagie est impliquée dans la différenciation neuronale des cellules tumorales de la lignée germinale (Gomes *et al*, 2016). De plus, Atg7, Beclin-1 LC3 et Ambra1 sont impliqués dans la neurogenèse des bulbes olfactifs de souris (Vázquez *et al*, 2012). Beclin-1 et Ambra1 sont également impliquées dans la survie des cellules souches neuronales (Yazdankhah *et al*, 2014). L'autophagie peut participer à la différenciation des cellules souches neuronales en dégradant un récepteur essentiel de la voie Notch (Wu *et al*, 2016b). Chez la drosophile, la protéine autophagique ALFY participe à la dégradation par autophagie des constituants essentiels à la voie Wnt (Wingless integration 1 pathway) et ainsi contrôle la taille du cerveau donc la neurogenèse (Kadir *et al*, 2016). Son inactivation entraîne une forte diminution de la taille du cerveau.

L'autophagie participe également à la différenciation des cellules cardiaques. La signalisation FGF, en inhibant l'autophagie, empêche la différenciation des progéniteurs cardiaques en cardiomyocytes (Zhang *et al*, 2012a). Chez le poisson-zèbre, l'inactivation de gènes autophagiques entraîne des défauts de morphogénèse du cœur, notamment des valves (Lee *et al*, 2014). L'inactivation de Atg5, Atg7 ou Beclin-1 dans les cellules cardiaques de souris entraîne également des problèmes de morphologie du cœur (Lee *et al*, 2014). Dans les embryons de souris, Atg13 est essentiel au développement cardiaque (Kaizuka & Mizushima, 2016), et sa déplétion entraîne une létalité embryonnaire. Si des défauts de l'autophagie peuvent entraîner des défauts dans les étapes précoces de la différenciation cardiaque, comme la formation du tube cardiaque dans l'embryon de poulet (Wang *et al*, 2015), une induction de l'autophagie peut également avoir un effet délétère : des malformations du tube cardiaque et des défauts de différenciations des cardiomyocytes (Li *et al*, 2015; Wang *et al*, 2016).

L'autophagie a un rôle primordial dans la régulation de la formation du cil primaire. Elle dégrade en conditions d'induction de l'autophagie une protéine inhibant la formation du cil, OFD1 (Tang *et al*, 2013, 2014). L'autophagie à son niveau basal participe en revanche à la dégradation d'IFT20, protéine essentielle à la formation du cil, et dans ces conditions inhibe celle-ci (Pampliega *et al*, 2013). L'autophagie, en fonction de son niveau et éventuellement de paramètres non élucidés, a donc un rôle à la fois répresseur et activateur de la formation du cil primaire.

Une fois les cellules différenciées, l'autophagie peut jouer un rôle essentiel dans la régulation de l'homéostasie de celles-ci. Par exemple, l'inactivation de l'autophagie par déplétion en Atg5, Atg7 ou FIP2000 dans les neurones entraîne une accumulation anormale d'agrégats protéiques et de mitochondries endommagées, accélérant la dégénérescence neuronale (Hara *et al*, 2006; Komatsu *et al*, 2006). De la même façon, l'accumulation de défauts cellulaires par insuffisance de l'autophagie peut entraîner des problèmes dans les cellules cardiaques (Chen *et al*, 2013a; Nakai *et al*, 2007). Des pistes thérapeutiques d'activation de l'autophagie sont d'ailleurs envisagées pour réduire l'hypertrophie cardiaque (Gu *et al*, 2016; Lu *et al*, 2016). L'autophagie, de façon dépendante de la voie TOR, a un rôle dans le remodelage et le maintien de la fonction des cellules cardiaques (Nishida & Otsu, 2015; Taneike *et al*, 2016). Dans plusieurs autres tissus comme les hépatocytes, le muscle squelettique, les cellules pancréatiques ou les podocytes, une inactivation ciblée de l'autophagie entraîne une accumulation d'agrégats protéiques (Hartleben *et al*, 2010; Jung *et al*, 2008; Komatsu *et al*, 2005; Masiero *et al*, 2009), entraînant des défauts dans la fonction de ces tissus, illustrant le rôle important de l'autophagie dans l'homéostasie une fois les cellules différenciées.

c- Pathologies liées à l'autophagie

Le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire mettant en jeu l'autophagie, une dérégulation de cette dernière peut être liée à de nombreuses pathologies humaines. Ainsi, un défaut d'autophagie a été mis en évidence dans des cancers, des maladies neurodégénératives, des maladies cardiaques, certaines maladies infectieuses, le diabète de type II et la mucoviscidose (Jiang *et al*, 2015; Kiriyaama & Nochi, 2015; Levine & Kroemer, 2008; White, 2015; Xu *et al*, 2015). Je m'intéresse particulièrement ici au lien avec le cancer et les maladies neurodégénératives.

L'autophagie a un rôle bivalent connu en ce qui concerne les cancers. D'un rôle suppresseur de tumeur en veillant au bon fonctionnement de la cellule, l'autophagie est mise à contribution dans les cellules engagées sur la voie tumorale pour permettre à celles-ci de survivre et de se multiplier. Ainsi, l'inactivation de certains gènes autophagiques chez la souris (Atg7, Atg5, ou Beclin-2) est liée à l'apparition de tumeurs ou l'augmentation de la susceptibilité de tumorigénèse dans de nombreux tissus (Qu *et al*, 2003; Takamura *et al*, 2011, 201; Yue *et al*, 2003). Chez l'humain, un lien a été établi entre certains types de cancers et l'inactivation ou la faible expression de Beclin-1 (Choi *et al*, 2013; Liang *et al*, 1999; Miracco *et al*, 2007). Les hypothèses proposées du rôle antitumoral de l'autophagie suggèrent que l'activité autophagique

basale empêche l'accumulation de p62, de mitochondries défectueuses, réduit le niveau de stress oxydatif et ainsi prévient le risque de dégâts de l'ADN. Elle participe ainsi à éviter les inflammations et les mutations, qui peuvent être la cause de tumorigenèse. L'autophagie participe également au bon fonctionnement du système immunitaire, notamment à la réponse immunitaire anti-tumorale (Deretic *et al*, 2013). Les résultats obtenus sur la contribution de l'autophagie à la protection contre l'apparition de tumeurs montrent aujourd'hui que l'autophagie joue un rôle suppresseur de tumeur et que la diminution de son activité pourrait être un marqueur de cancer (Xu *et al*, 2015).

L'autre aspect de la relation entre autophagie et cancer est le rôle homéostatique du flux autophagique dans les cellules cancéreuses. En effet, une fois les cellules engagées sur la voie tumorale et la tumeur augmentant de taille, elles subissent différents stress en raison d'un apport de nutriments et d'oxygène transitoirement insuffisant. Lors de la progression de la tumeur, une vascularisation plus importante va progressivement s'établir. Cependant, lors de cette transition, l'autophagie est induite et fournit par recyclage de l'énergie aux cellules cancéreuses, ce qui leur permet de survivre et de proliférer (Degenhardt *et al*, 2006). Dans certaines conditions, l'inhibition de l'autophagie peut entraîner une réduction de la croissance tumorale et de la survie des tumeurs (Huo *et al*, 2014; Strohecker *et al*, 2013). La modulation fine de l'autophagie présente donc un potentiel pour le développement de thérapies anticancéreuses.

Comme évoqué auparavant, les cellules du système nerveux mettent à contribution l'autophagie pour leur différenciation et le maintien de leur homéostasie. De nombreuses pathologies humaines sont liées à des dysfonctionnements des neurones, et ceux-ci peuvent être liés à des défauts de l'autophagie. Par exemple, chez la souris, l'inactivation d'*Atg5* et *Atg7* dans le système nerveux entraîne un phénotype de neurodégénérescence associé à l'accumulation d'agrégats protéiques ubiquitinés normalement dégradé par autophagie (Hara *et al*, 2006; Komatsu *et al*, 2006). La maladie d'Alzheimer est la maladie neurodégénérative progressive la plus courante et est caractérisée par l'accumulation de plaques amyloïdes, composées de peptides amyloïdes- β ($A\beta$) et des enchevêtrements neurofibrillaires de protéine tau hyperphosphorylée (Holtzman *et al*, 2011). Le premier lien établi entre Alzheimer et l'autophagie a été l'observation d'une accumulation d'autophagosomes dans les neurones issus de patients atteints (Nixon *et al*, 2005). Des cas de maladie d'Alzheimer familiale sont en outre associés à un défaut d'acidification des lysosomes via la dysfonction de la préséline 1. De plus, l'expression de Beclin1, nécessaire à l'initiation de l'autophagie, est réduite dans le cerveau de patients atteints (Jaeger *et al*, 2010). Dans des modèles de souris pour la maladie d'Alzheimer Beclin1 est moins

exprimée et les peptides A β sont accumulés (Pickford *et al*, 2008). Dans un modèle de maladie d'Alzheimer chez la souris, l'induction de l'autophagie par la rapamycine effectuée avant la formation de plaques amyloïdes réduit le niveau de peptides A β et atténue les problèmes cognitifs (Caccamo *et al*, 2010; Majumder *et al*, 2011; Spilman *et al*, 2010). La maladie de Parkinson, seconde maladie neurodégénérative la plus courante, est causée par la mort spécifique des neurones dopaminergiques dans la substance noire, les patients atteints présentent notamment des tremblements, une rigidité musculaire, et des problèmes du contrôle des mouvements volontaires. Même si la grande majorité des cas est sporadique, des mutations dans certains gènes ont été identifiées dans des formes familiales. Les mutations entraînant des défauts des protéines PINK1 et Parkin sont la première cause génétique du parkinsonisme (Hardy, 2010). PINK1 et Parkin sont des acteurs importants de la modulation de la dégradation par autophagie des mitochondries, la mitophagie (voir Autophagie sélective).

La maladie de Huntington est une maladie neurodégénérative autosomale dominante provoquée par l'expansion d'une répétition codant pour une polyglutamine (polyQ) à l'extrémité N-terminale de la huntingtine (HTT). Elle provoque une dégénérescence neurologique entraînant des dysfonctionnements moteurs cognitifs et psychiatriques importants. L'inactivation de la HTT chez la souris entraîne également la neurodégénération (Dragatsis *et al*, 2000). HTT présente des similarités avec trois protéines autophagiques de levure, Atg23, Vac8, et Atg11 (Ochaba *et al*, 2014; Steffan, 2010). HTT interagit avec ULK1 : elle entre en compétition avec mTORC1 pour la libération de ULK1 et ainsi participer à l'initiation de l'autophagie (Rui *et al*, 2015). HTT interagit également avec p62, qui est un récepteur entre substrats ubiquitinés et LC3 pour leur dégradation par autophagie. De plus, la délétion de l'extension polyQ dans la HTT chez la souris augmente le flux autophagique dans les neurones (Zheng *et al*, 2010).

La sclérose latérale amyotrophique (SLA, en anglais ALS), ou maladie de Charcot, est une maladie neurodégénérative des motoneurones de l'adulte. Pour cette maladie également, une grande majorité de cas sont sporadiques, mais différents gènes sont associés aux formes familiales, et notamment le récepteur à Sigma 1 (SigmaR1) (Al-Saif *et al*, 2011) : très exprimée dans les neurones moteurs du cerveau et de la corde spinale (Mavlyutov *et al*, 2010), sa déplétion chez la souris entraîne des problèmes moteurs associés à une dégénération des neurones moteurs (Bernard-Marissal *et al*, 2015). SigmaR1 régule le transport du calcium entre les mitochondries et le RE au niveau des sites de contact. La déplétion en SigmaR1 cause notamment une dépolarisation du potentiel de membrane mitochondrial, mais aussi une inhibition du flux

autophagique et de la dégradation par autophagie (Vollrath *et al*, 2014). Des défauts dans d'autres gènes liés à la mitophagie ont été détectés pour des cas de SLA, comme TBK1 et OPTN (Cirulli *et al*, 2015; Maruyama & Kawakami, 2013). Une relation entre dysfonctionnement mitochondrial et SLA a été montrée (Cozzolino & Carrì, 2012; Palomo & Manfredi, 2015). Ainsi, le contrôle qualité des mitochondries dépendant de l'autophagie semble un facteur important dans la sclérose latérale amyotrophique.

Le rôle de l'autophagie dans la dégradation des agrégats et des organelles dysfonctionnelles semble donc de première importance pour le fonctionnement normal des neurones. En effet, une fois différenciés, les neurones ne peuvent plus diluer les composants cytoplasmiques problématiques par mitose et dépendent de l'autophagie pour maintenir leur homéostasie. Des défauts dans le processus autophagique ou sa régulation peuvent donc participer à des événements de neurodégénération, pouvant conduire à des pathologies lourdes.

2. Autophagie sélective

L'autophagie a longtemps été considérée comme une voie de dégradation non sélective, présente constitutivement, pouvant être induite de façon globale par différents stimuli externes ou internes. Au cours des 10 dernières années, de plus en plus de résultats montrent une sélectivité importante des cibles à dégrader, au cours de différents processus (Stolz *et al*, 2014). L'autophagie sélective met en jeu des interactions entre protéines autophagiques et soit directement les cargos à dégrader soit avec des récepteurs qui en font la liaison (Gatica *et al*, 2018). Ces récepteurs sont des protéines interagissant à la fois avec les protéines de l'autophagie et avec les cargos. Si le terme récepteur est aujourd'hui établi, ces protéines sont parfois appelées adaptateurs. L'autophagie sélective est notamment impliquée dans la dégradation des protéines susceptibles de provoquer des agrégats retrouvés dans certaines maladies neurodégénératives. Je décrirai ici différents types d'autophagie sélective, en fonction de la cible à dégrader, et m'intéresserai ensuite plus particulièrement à la dégradation du réticulum endoplasmique par autophagie.

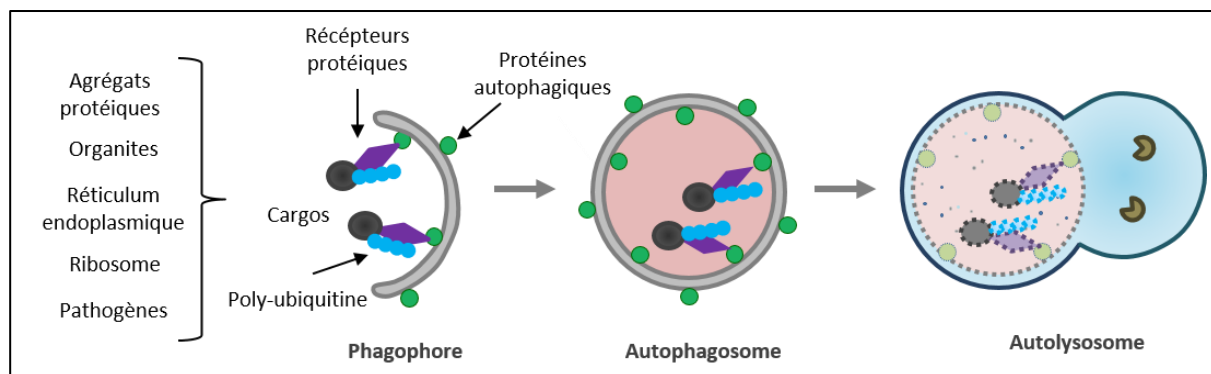


Figure 22 : Principe général de l'autophagie sélective. Les protéines de l'autophagie, situées sur le phagophore, interagissent avec des cargos ou des récepteurs protéiques faisant la liaison avec les cargos. Cette interaction conduit à l'englobement des cargos lors de l'expansion et la fermeture du phagophore. Les cargos sélectionnés par l'interaction directe ou indirecte sont ainsi séquestrés dans l'autophagosome et sont ensuite dégradés (adapté de Céline Jenzer).

a- Types d'autophagie sélective

Bien qu'il soit particulier, le premier type d'autophagie sélective à avoir été observé est la voie Cvt (pour Cytoplasm-to-vacuole targeting). Ce processus consiste en l'internalisation d'enzymes vacuolaires au départ cytoplasmiques dans des structures autophagiques afin de les adresser à la vacuole. Certaines protéines particulières sont impliquées dans ce processus, qui dépend également de protéines autophagiques comme Atg19 et Atg11, et met en jeu la lipudation d'Atg8 à ces vésicules. Dans ce processus la sélectivité des cargos à adresser à la vacuole est réalisée par Atg19 qui agit comme un récepteur (Leber *et al*, 2001; Scott *et al*, 2001), et dépend de la protéine d'échafaudage Atg11 pour la formation du complexe Cvt (Pfaffenwimmer *et al*, 2014). Cette dernière est également impliquée dans d'autres types d'autophagie sélective chez la levure (Farré *et al*, 2008; Kanki *et al*, 2009). Atg19 interagit avec Atg8 via un motif WXXL, similaire à SQSTM1/P62 (Noda *et al*, 2008; Pankiv *et al*, 2007). Ces motifs AIM/LIR (pour Atg8 interacting motif ou LC3 interacting region) sont conservés au cours de l'évolution.

La dégradation sélective d'agrégats protéiques par autophagie est appelée agréphagie. De nombreuses protéines susceptibles de s'agréger sont des substrats de l'autophagie, comme par exemple les petites amyloïdes β , la Huntingtine HTT ou la SNCA/ α -synucléine. Chez la levure, le récepteur entre protéines pouvant s'agréger, contenant des polyQ (poly-glutamines) et les protéines de l'autophagie est Cue5. Par des domaines spécifiques, il peut interagir avec l'ubiquitine et avec Atg8. L'ubiquitination des substrats a été montré comme un facteur clé de leur reconnaissance et leur dégradation par autophagie. Trois récepteurs supplémentaires sont connus chez les mammifères, SQSTM1, NBR1 et OPTN, et se lient à l'ubiquitine. Ils possèdent tous des LIRs, et servent de lien entre les protéines ubiquitinées et LC3/GABARAP (Ichimura *et*

al, 2000; Kirkin *et al*, 2009; Pankiv *et al*, 2007; Shen *et al*, 2017). L'ubiquitination sert donc à la fois de marqueur de dégradation pour la voie de l'ubiquitine et du protéasome (UPS), et de l'autophagie sélective, interrogeant sur les relations entre ces deux processus. Des récentes données chez la levure indiquent que c'est l'état d'oligomérisation des récepteurs qui va déterminer le type de dégradation : lorsque les récepteurs sont oligomérisés, ils se lient aux protéines de l'autophagie, sinon ils sont pris en charge par la voie du protéasome (Lu *et al*, 2017).

La dégradation des peroxysomes par autophagie est appelée pexophagie. Dans certaines conditions toxiques, un excès de peroxysome se forme dans les levures. Ceux-ci sont rapidement dégradés par autophagie (Klionsky & Ohsumi, 1999), de façon sélective via Atg36 chez *S. cerevisiae* (Nazarko *et al*, 2009), qui relie Atg8 et la membrane des peroxysomes, via l'interaction avec Pex3 (Motley *et al*, 2012). Des AIMs alternatifs sont retrouvés sur Atg36 mais leur mutation n'entraîne pas la disparition de la dégradation des peroxysomes par autophagie mais simplement un délai (Farré *et al*, 2013). Atg11 est également nécessaire à la pexophagie (Kim *et al*, 2001). Chez les mammifères, il n'y a pas de récepteur connu de la pexophagie. Celle-ci dépend de l'ubiquitination de protéines peroxysomales et de leur reconnaissance par SQSTM1 (Kim *et al*, 2008) et NBR1 (Deosaran *et al*, 2013). PEX5, protéine navette entre cytosol et la membrane peroxysomale, peut être ubiquitinée et s'accumuler dans la membrane du peroxysome, ce qui déclenche la pexophagie. Cet évènement peut notamment être déclenché par la présence de ROS (reactive oxygen species), et cela entraîne la reconnaissance de PEX5 ubiquitinée par SQSTM1 (Zhang *et al*, 2015). Cependant, dans des conditions de starvation, c'est PEX14 qui peut interagir directement avec LC3-II. Le récepteur principal de pexophagie semble donc dépendre des conditions d'induction. De plus, l'homologue d'Atg34 des mammifères, ACBD5, est essentiel pour la pexophagie.

Le contrôle qualité des mitochondries est particulièrement important pour le maintien de l'homéostasie cellulaire. La mitophagie, la dégradation sélective par autophagie des mitochondries, permet d'éliminer les mitochondries endommagées ou surnuméraires (Liu *et al*, 2014). Deux rôles importants des mitochondries sont la production d'énergie et la régulation de l'apoptose. La disruption de l'un ou l'autre rôle peut entraîner une augmentation des ROS dans la cellule ou une dérégulation de l'homéostasie cellulaire. De plus, le maintien des mitochondries en fonctionnement demande un coût énergétique important. La régulation de la qualité et de la quantité des mitochondries par mitophagie est donc de première importance pour la cellule. Comme évoqué précédemment, une déficience dans ce processus peut être liée à différentes pathologies humaines, notamment des maladies neurodégénératives (Redmann *et al*, 2016). Chez

la levure, la sélectivité de la mitophagie dépend de la protéine de la membrane externe des mitochondries Atg32 (Kanki *et al*, 2015). Atg32 interagit avec Atg11 (Mao *et al*, 2013) ce qui entraîne le recrutement des mitochondries ciblées au PAS, puis interagit avec Atg8 via son AIM cytosolique (Liu *et al*, 2014). La mutation de l'AIM entraîne seulement un défaut partiel de la mitophagie, suggérant que l'interaction entre Atg32 et Atg8 n'est pas indispensable pour ce processus (Aoki *et al*, 2011; Kanki *et al*, 2015; Kondo-Okamoto *et al*, 2012). Les mitochondries, organisées en réseau, sont généralement trop volumineuses pour être dégradées nativement par autophagie. La mitophagie pourrait ainsi avoir un lien avec la fission des mitochondries. En effet, chez *S. cerevisiae*, la déplétion de facteurs impliqués dans la fission des mitochondries comme Dnm1 ou Fis1 entraîne une diminution importante de la mitophagie (Abeliovich *et al*, 2013; Kanki & Klionsky, 2008). Dnm1 interagit d'ailleurs avec Atg11, permettant le recrutement de cette dernière aux mitochondries (Kanki & Klionsky, 2008). Un mécanisme important de la fission des mitochondries est l'interaction fonctionnelle avec des tubules de RE au niveau de sites de contact RE-mitochondries. Les protéines associées à ces sites de contact (ERMES, pour ER-mitochondrial encounter site) pourraient être impliquées dans les événements de fissions au cours de la mitophagie (Mao *et al*, 2013).

Chez les mammifères, la mitophagie fait appel à une machinerie plus complexe que chez la levure, et au-delà du maintien de l'homéostasie, elle peut être impliquée dans des processus développementaux. Comme évoqué précédemment, la mitophagie joue un rôle important dans certains processus de différenciation cellulaire comme le développement des érythrocytes, ainsi que lors du développement embryonnaire lors de la dégradation sélective des composants d'origine paternels (Wei *et al*, 2017). Dans les cellules de mammifères, la perte du potentiel de membrane des mitochondries par traitement chimique entraîne la mitophagie, mais l'effet drastique de ces traitements ne permet pas d'étudier toutes les régulations de ce processus (Narendra *et al*, 2010). L'hypoxie est un autre stimulus induisant la mitophagie dans les cellules de mammifères (Liu *et al*, 2014). La voie la mieux caractérisée dans la modulation de l'autophagie chez les mammifères est la voie PINK1-PRKN/PARK2/parkin. PINK1 est une Ser/Thr kinase avec un domaine kinase en C-terminal et une séquence d'adressage en N-terminal, alors que PRKN est une ubiquitine ligase de type E3. Lorsque l'intégrité de la mitochondrie est affectée, la dépolymérisation que cela entraîne affecte l'import de PINK1, normalement importé dans la matrice mitochondriale où elle est clivée (Trempe *et al*, 2013). Cette absence d'import fait que PINK1 s'accumule dans l'espace intermembranaire et s'active par autophosphorylation (Aerts *et al*, 2015; Kondapalli *et al*, 2012; Narendra *et al*, 2010). Il phosphoryle ensuite

différentes protéines, dont PRKN, qui devient active et polyubiquitine différentes protéines de la membrane externe mitochondriale. Le modèle classique de la mitophagie implique la reconnaissance par les récepteurs SQSTM1 et OPTN des mitochondries polyubiquitinées, faisant le lien avec LC3 (Geisler *et al*, 2010; Kondapalli *et al*, 2012).

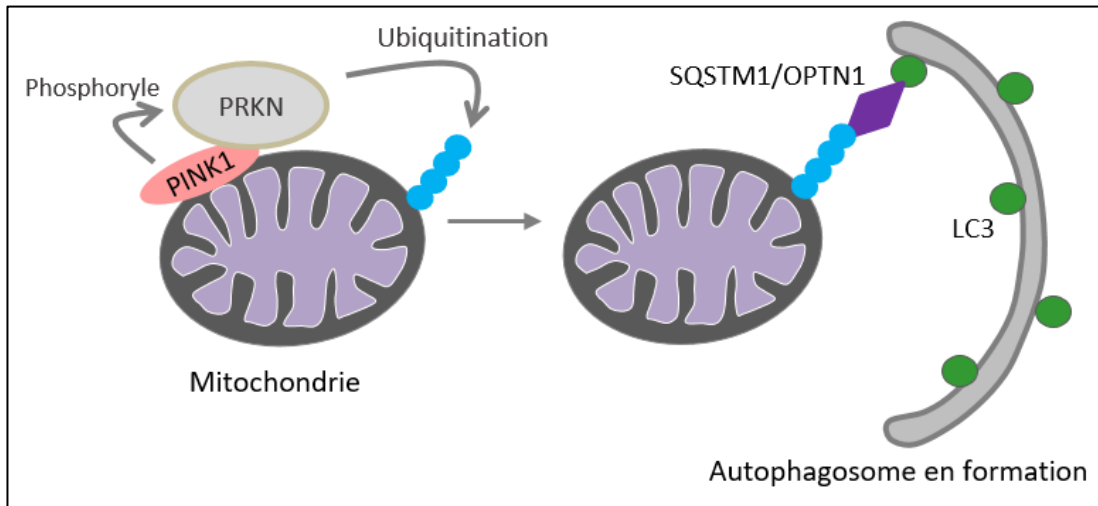


Figure 23 : Principe général de la mitophagie chez les mammifères. L'accumulation de PINK1 la conduit à activer par phosphorylation PRKN, qui ubiquitine des protéines de la membrane externe de la mitochondrie. Les récepteurs de la mitophagie interagissent avec les protéines polyubiquitinées et font le lien avec LC3, ce qui entraîne la dégradation de la mitochondrie par autophagie.

Cependant, l'activité kinase de PINK1 sur l'ubiquitine pourrait être suffisante, indépendamment de l'activité de PRKN, pour recruter les récepteurs autophagiques CALCOCO2/NDP52 et OPTN, et ainsi induire l'autophagie dans des proportions moindres (Lazarou *et al*, 2015). Un autre récepteur de la mitophagie semble être PHB2 (prohibitine 2), protéine de la membrane interne de la mitochondrie contenant un LIR. L'exposition de cette protéine dépendrait de la désintégration de la membrane externe, induite par l'extraction de nombreuses protéines de celle-ci suite à leur polyubiquitination (Wei *et al*, 2017). PHB2 induit la mitophagie de façon dépendante à Pink1-PRKN. Un autre rôle de Pink1-PRKN est de médier une voie alternative à la mitophagie, la formation de vésicules dérivées des mitochondries (MDVs, mitochondria derived vesicles) (McLelland *et al*, 2016; Sugiura *et al*, 2014). Ces MVDs se forment en cas de défaut des mitochondries limité et localisé. Dans ce cas, seules des portions de l'organe sont dégradées. PINK1 et PRKN sont aussi impliquées dans la régulation de la mobilité des mitochondries (Wang *et al*, 2011), en participant à la perte de l'interaction indirecte entre une protéine de l'OMM RHOT1 et la kinésine KIF5, transportant les mitochondries le long des microtubules. Les mitochondries endommagées sont donc stoppées (Hsieh *et al*, 2016).

Si PINK1-PRKN sont des récepteurs majeurs de la mitophagie, tous les types cellulaires ne les expriment pas chez les mammifères, et de nombreux autres récepteurs de la mitophagie, localisés à la mitochondrie, existent. Par exemple, BNIP3L est un récepteur de la mitophagie impliqué lors de la différenciation des réticulocytes en érythrocytes (Matsushima *et al*, 1998; Sandoval *et al*, 2008). BNIP3L est localisé à l'OMM et possède un domaine LIR, la mutation de ce dernier n'entraînant qu'une perte partielle de la mitophagie (Novak & Dikic, 2011), c'est un autre motif court qui est indispensable à la fonction de BNIP3L dans les réticulocytes (Zhang *et al*, 2012b). BNIPL3 et un autre récepteur FUNDC1 sont également impliqués dans la mitophagie en réponse à l'hypoxie. FUNDC1, phosphorylé et inactivé en conditions normales, est déphosphorylé notamment au niveau de son LIR par PGAM5 (Chen *et al*, 2014). L'élucidation de la régulation de la mitophagie en conditions d'hypoxie est particulièrement importante pour mieux comprendre la physiopathologie des tumeurs (Palikaras *et al*, 2015; Zhang *et al*, 2008).

Chez les mammifères, un lien existe également entre fission des mitochondries et mitophagie. La fission est régulée par la GTPase DNM1L, connue également comme DRP1 (Bordi *et al*, 2017). L'induction de la mitophagie entraîne également une diminution de la fusion entre mitochondries et une augmentation de la fission (Ni *et al*, 2014). L'activation de PINK1 entraîne d'ailleurs la dégradation de facteurs pro-fusion des mitochondries (Gegg *et al*, 2010). FUNDC1 participe au recrutement de DNM1L en cas de mitochondrie endommagée, ce qui induit la fission (Chen *et al*, 2016). De façon similaire aux ERMES chez la levure, les MAMs (mitochondria associated membrane sites), sites de contact entre ER et mitochondries, pourraient moduler la fission des mitochondries en lien avec la mitophagie (Wu *et al*, 2016a).

La plupart des récepteurs de l'autophagie sélective sont des protéines. Dans le cas de la mitophagie, un lipide uniquement présent aux mitochondries, la cardiolipine, pourrait jouer ce rôle dans les neurones corticaux de mammifères. Le fait d'endommager les mitochondries via un traitement de rotenone entraîne une translocation importante de la cardiolipine depuis la membrane interne vers l'externe, et interagit avec l'extrémité N-terminale de LC3. L'inhibition de la synthèse ou de la translocation de la cardiolipine réduit la mitophagie dans les neurones (Chu *et al*, 2013). La cardiolipine pourrait avoir un rôle similaire chez la levure (Shen *et al*, 2017), et d'autres lipides pourraient être impliqués comme récepteurs de la mitophagie, comme la céramide dans des lignées cellulaires cancéreuses (Sentelle *et al*, 2012).

Afin d'éviter que des enzymes lysosomales ne soient libérées dans le cytoplasme suite à la rupture d'une membrane lysosomale et ainsi entraîner la mort cellulaire lysosomale, le contrôle

qualité des lysosomes doit être effectué. La dégradation sélective des lysosomes endommagés est appelée lysophagie. La galectine 3 (LGALS3) se lie aux glycoprotéines exposées lorsque la membrane lysosomale est endommagée, et colocalise avec LC3 lors des événements de lysophagie. GAL3 recrute la protéine tripartite motif TRIM16, qui sert de plateforme de recrutement des protéines d'initiation de l'autophagie et de formation du phagophore (Chauhan *et al*, 2016). La dégradation des lysosomes par autophagie semble dépendre d'une liaison entre l'ubiquitine, SQSTM1 et LC3, de façon similaire à d'autres types d'autophagie sélective (Maejima *et al*, 2013). De façon indépendante à l'ubiquitine, Gal8 peut directement se lier au récepteur autophagique NDP52, qui recrute ensuite des phagophores positifs pour LC3 et entraîne la lysophagie (Thurston *et al*, 2012).

La xenophagie est un terme générique englobant la dégradation par voie autophagique de tout pathogène intracellulaire, comme des virus ou des bactéries. L'ubiquitination des cibles pour leur prise en charge par les récepteurs de l'autophagie va permettre la sélectivité. Par exemple, à la suite de l'infection par *Salmonella typhimurium* et sa présence dans le cytosol, les protéines bactériennes sont rapidement ubiquitinées et reconnues par les récepteurs SQSTM1 (Zheng *et al*, 2009), CALCOCO2 et OPTN (Thurston *et al*, 2009). Si les trois récepteurs fonctionnent de manière équivalente avec des domaines de liaison à l'ubiquitine et des LIRs et peuvent se lier en même temps à la même bactérie, la déplétion individuelle en SQSTM1 CALCOCO2 et OPTN entraîne une augmentation de la réplication de *S. typhimurium* (Wild *et al*, 2011). Cela suggère que ces trois récepteurs pourraient avoir des rôles individuels, non complètement redondants.

La lipophagie (pour revue Schulze *et al*, 2017), la dégradation sélective des gouttelettes lipidiques par autophagie, participe à réguler, en conditions basales ou de déprivation nutritionnelle, la disponibilité intracellulaire des triglycérides (Singh *et al*, 2009). Différents types d'autophagies semblent impliqués dans la dégradation des gouttelettes lipidiques (LD pour lipid droplets). Une étude a montré que la dégradation des protéines de surface des LD, les perilipines (PLINs) pouvait dépendre de l'activité de l'autophagie médiée par les chaperones (Kaushik & Cuervo, 2015), qui semble être un événement en aval nécessaire à l'initiation de la lipophagie. L'ATGL, l'adipose triglyceride lipase, possède un LIR et interagit avec LC3 à la surface des LDs. L'ablation de ce LIR entraîne un défaut de localisation d'ATGL aux LDs (Martinez-Lopez *et al*, 2016). Bien que ATGL soit capable de dégrader des lipides, le rôle principal d'ATGL dans la dégradation des LDs semble lié à sa capacité à réguler l'autophagie (Khan *et al*, 2015). Parmi les protéines localisées au niveau des LDs, on retrouve de nombreuses Rab GTPases, dont Rab7, impliquée notamment dans la maturation des autophagosomes.

D'autres Rab comme Rab10 participent également au recrutement des marqueurs de la macroautophagie et des lysosomes aux LDs, et la déplétion de Rab7 ou Rab10 entraîne une accumulation des LDs dans les hépatocytes en condition de starvation (Li *et al*, 2016; Schroeder *et al*, 2015). Ceci suggère un rôle de ces deux Rab dans la régulation de la macroautophagie des LDs. Chez la levure, la microautophagie participe également à la dégradation des LDs, en adressant directement les LDs à la vacuole, à des sites d'invagination de la membrane de celle-ci. Les acteurs protéiques et les mécanismes de mise en jeu de la microlipophagie semblent dépendre grandement du type de stimulus entraînant celle-ci (Vevea *et al*, 2015; van Zutphen *et al*, 2014).

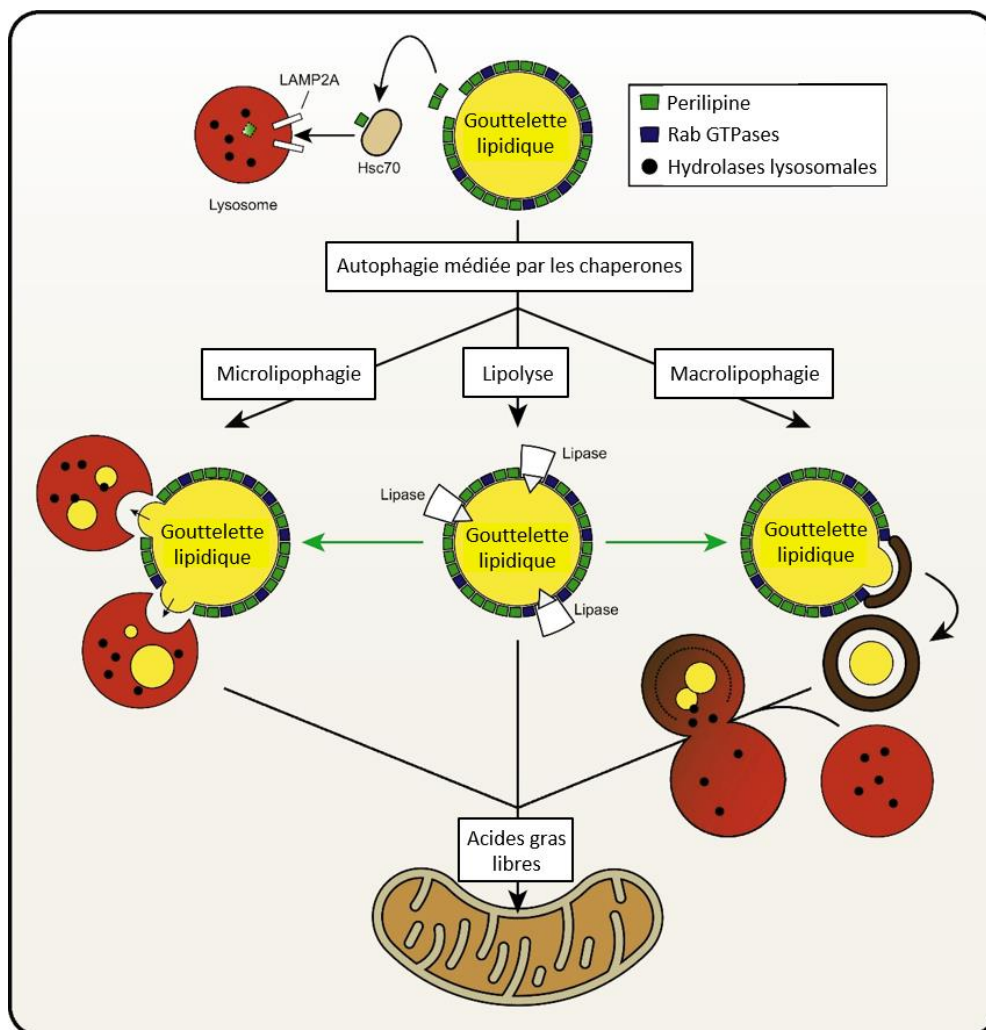


Figure 24 : Voies de dégradation des gouttelettes lipidiques. La CMA dégrade la perlipine à la surface des gouttelettes lipidiques, et ainsi promeut leur dégradation en rendant accessible les lipides par les lipases et les mécanismes de lipophagie. La dégradation des LD conduit à la libération d'acides gras, ensuite utilisables (adapté de Schulze *et al*, 2017).

La RE-phagie, dégradation sélective du reticulum endoplasmique par autophagie, ainsi que la nucléophagie seront traitées plus en détail dans la partie suivante.

L'autophagie sélective de différents composants de la cellule peut prendre des formes variées et assumer différents rôles. Le principe général cependant est qu'un récepteur fait le lien entre les protéines de la machinerie autophagique et le cargo à dégrader (ou fait partie intégrante du cargo). Ces mécanismes présentent différents niveaux de régulations, dont certains restent à élucider afin de mieux comprendre les différentes implications physiopathologiques.

b- RE-phagie, dégradation sélective du RE par autophagie

Le terme RE-phagie (Pour revue, Grumati *et al*, 2018) a été utilisé pour la première fois pour décrire chez la levure la dégradation du RE à la vacuole lors de la réponse UPR (Unfolded Protein Response) (Bernales *et al*, 2006; Schuck *et al*, 2009). Lors de cette UPR, le volume du RE et sa quantité de membrane augmentent. Rapidement, les levures rétablissent l'homéostasie du RE en éliminant les membranes superflues (Schuck *et al*, 2014). Cette voie de dégradation peut également être mise à contribution pour la détoxification : des compartiments du RE peuvent stocker des protéines agrégées ou surnuméraires, et ensuite être adressés à la vacuole pour dégradation (Cebollero *et al*, 2012; Yorimitsu & Klionsky, 2007). Des spirales de RE se formant après stress du RE provoqué par des traitements au DTT et à la tunicamycine sont dégradées par un mécanisme de microautophagie directement à la vacuole (Schuck *et al*, 2014). Des fragments du RE peuvent également être séquestrés dans des vésicules Atg8-positives, en cas de starvation ou de traitement par la rapamycine qui inhibe la voie TOR. Cette voie nécessite la présence de deux récepteurs, Atg39 et Atg40, qui interagissent via un AIM avec Atg8 (Mochida *et al*, 2015). Ces interactions ont été confirmées par approche double hybride chez la levure ainsi qu'en immunoprécipitation, et des mutations des AIMs entraînent une perte d'interaction. Atg39 est une protéine transmembranaire localisée spécifiquement au niveau de l'enveloppe nucléaire, et Atg40 (reticulon-like) est une protéine membranaire contenant un domaine RHD très majoritairement localisée au niveau du RE cortical. La surexpression d'Atg39-GFP ou Atg40-GFP entraîne la présence de points Atg8 et Atg11 positifs près de la vacuole. De plus, la déplétion en Atg39 affecte grandement la dégradation d'un marqueur de l'enveloppe nucléaire (Hmg1-GFP), alors que l'effet de la déplétion en Atg40 sur celle-ci est moindre. La dégradation de Rtn1-GFP, marqueur du réticulum cortical, est très affectée par la déplétion en Atg40, alors que les levures déplétées en Atg39 ne présentent pas de différence

significative avec le sauvage. Ces résultats indiquent une implication de Atg39 et Atg40 dans la dégradation sélective de sous domaines différents du RE.

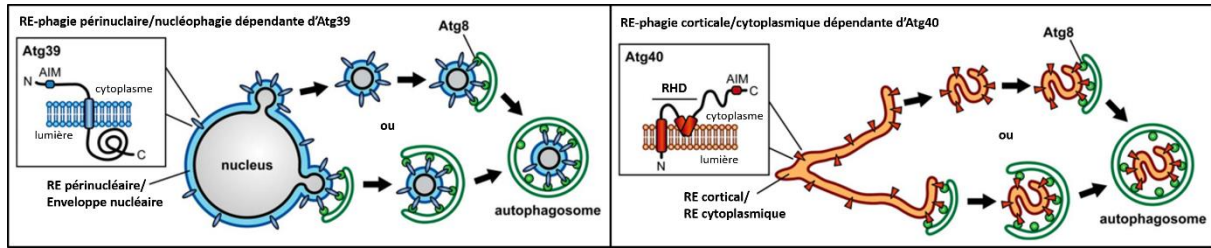


Figure 25 : Le réticulon-like Atg40 permet l'élimination du RE tubulaire alors que le récepteur Atg39 permet la dégradation du RE périnucléaire. Les deux récepteurs comportent un AIM, Atg8 Interacting Motif, entraînant leur interaction avec Atg8 et médiant leur prise en charge par le processus autophagique (adapté de Nakatogawa and Mochida, 2015).

Chez les mammifères, c'est maintenant six récepteurs différents qui ont été mis en évidence. FAM134B, SEC62 et CCPG1 ont un rôle dans la dégradation sélective des feuillettes de RE, et ATL3 et RTN3 dans la dégradation des tubules.

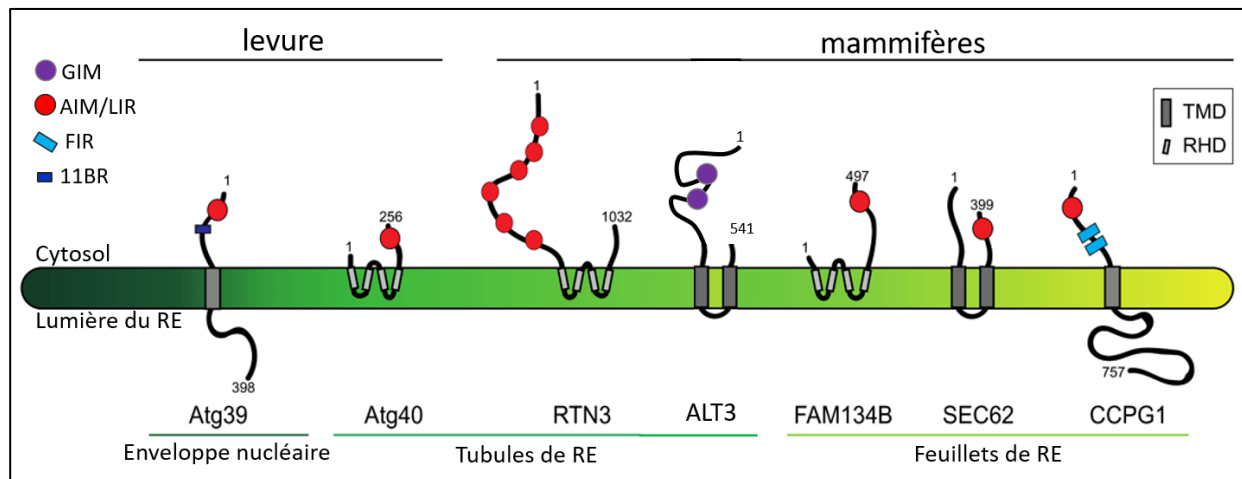


Figure 26 : Récepteurs de la RE-phagie chez la levure et les mammifères. La figure montre la topologie, l'orientation et la localisation membranaire des deux récepteurs de levure Atg39 et Atg40 et des cinq récepteurs de mammifère RTN3, ALT3, FAM134B, SEC62 et CCPG1. (11BR, région de liaison à Atg-11 ; AIM/LIR et GIM, motif d'interaction à Atg8/LC3 et GABARAP respectivement ; FIR, région d'interaction à FIP200 ; RHD, domaine réticulon-homologie, TMD, domaine transmembranaire) (adapté de Fregno & Molinari, 2018).

FAM134B (reticulon-like) (ou RETREG1) est le premier récepteur de la RE-phagie chez les mammifères à avoir été identifié dans des cellules humaines en culture (Khaminets *et al*, 2015). FAM134B partage une structure similaire à Atg40, avec la présence d'un RHD près de l'extrémité N-terminale et un LIR en C-terminal. FAM134B est une protéine de l'appareil de Golgi, également présente au niveau du réticulum endoplasmique, particulièrement au niveau des feuillettes. FAM134B a notamment pour propriété de courber les doubles membranes

lipidiques. L'inactivation de *FAM134B* ou du LIR entraîne un blocage de la fragmentation du RE et sa dégradation par la voie lysosomale, en conditions basales ou de starvation. La fragmentation du RE lors de la dégradation des feuilletts dépendant de *FAM134B* implique l'atlastine *ATL2* (Liang *et al*, 2018). En outre, *FAM134B* interagit avec la chaperonne transmembranaire *CANX* (Calnexine), qui agit comme un co-récepteur en reconnaissant le procollagène mal conformé. Ce processus conduit à l'adressage au lysosome par autophagie du procollagène (Forrester *et al*, 2019). Cela constitue le seul exemple bien caractérisé de la médiation par un récepteur de la RE-phagie de la dégradation par autophagie de protéines de la lumière du RE.

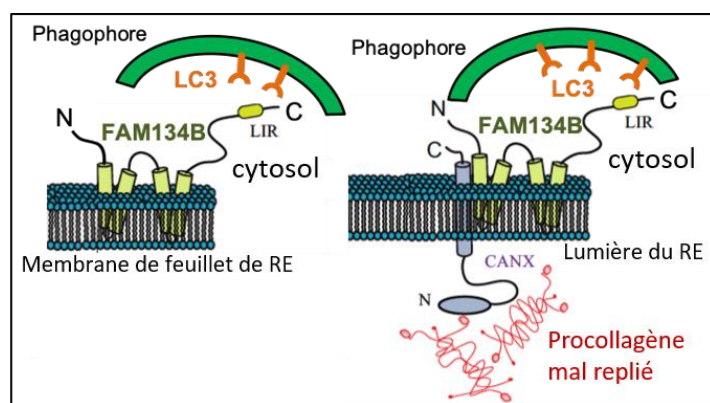


Figure 27 : Rôles connus de *FAM134B* dans la RE-phagie des feuilletts de RE et l'élimination des procollagènes. *FAM134B* interagit avec LC3 via son LIR (LC3-Interacting Region), ce qui entraîne sa prise en charge par la voie autophagique et la RE-phagie. La calnexine *CANX* peut interagir avec *FAM134B*, et s'associer à du procollagène mal conformé, et entraîne ainsi la dégradation du RE contenant cette accumulation de procollagène (adapté de Forrester *et al*, 2019).

SEC62, protéine transmembranaire faisant partie du complexe translocon, est un récepteur autophagique intervenant dans une forme particulière de RE-phagie, la *recovER-phagy* (Fumagalli *et al*, 2016). Lors d'un stress de type UPR, les cellules de mammifère peuvent répondre par l'expansion du RE. Alors que chez la levure, le rétablissement de l'homéostasie et du volume peuvent passer par des évènements de micro-autophagie, chez les mammifères c'est la macroautophagie sélective médiée par *SEC62* qui est mise à contribution. Ce rôle de *SEC62* dépend de son LIR situé en C-terminal, et semble indépendant du complexe translocon.

Lorsque le RE est surchargé de protéines agrégées ou mal repliées, *CCPG1* agit en tant que récepteur de la RE-phagie (Smith *et al*, 2018). *CCPG1*, protéine transmembranaire, présente en N-terminal un LIR et deux domaines d'interaction à *FIP200*. Elle est présente uniquement chez les vertébrés et n'a pas d'autre fonction physiologique connue. La partie C-terminale semble pouvoir interagir avec les cargos dans la lumière du RE, alors que la partie N-terminale

cytosolique recrute les membranes autophagiques. CCPG1 interagit avec LC3B, LC3C et GABARAP, et également avec FIP200, via deux séquences FIR (FIP200 interacting region). En conditions normales, CCPG1 est localisé principalement au RE périnucléaire ainsi qu'à des foci au niveau du RE périphérique, dont le nombre augmente en cas de condition de starvation, et ceux-ci colocalisent avec des marqueurs de l'autophagie comme DFCP1, FIP200, WIPI2 et LC3B. Si l'interaction avec LC3/GABARAP ou avec FIP200 est empêchée, les foci ne sont plus formés. CCPG1 nécessite l'interaction avec les deux partenaires pour pouvoir assurer sa fonction. Le traitement par la bafilomycine A1, qui bloque la fusion avec le lysosome, entraîne une accumulation de CCPG1, qui peut être colocalisée avec LC3B ou STX17 sans marqueurs précoces, indiquant que CCPG1 est présent du début à la fin du processus autophagique. De plus, l'induction de la réponse UPR notamment par la tunicamycine ou le DTT entraîne une augmentation de l'expression de CCPG1. *In vivo*, la RE-phagie médiée par CCPG1 a un effet protecteur dans les cellules acinaires pancréatiques contre l'agrégation de protéines dans la lumière du RE. CCPG1 pourrait ainsi mettre en relation la signalisation UPR et la RE-phagie dans certains contextes.

L'atlastine 3 (ATL3) a été très récemment identifiée comme un récepteur de la RE-phagie des tubules, spécifiquement (Chen *et al*, 2019). Il existe 3 atlastines, (ATL1-3), GTPases fonctionnant dans la fusion des membranes du RE (Hu *et al*, 2009). ATL1 est exprimée principalement au niveau du système nerveux central, et ATL2 et ATL3 sont ubiquitaires (Rismanchi *et al*, 2008). La déplétion en ATL3 n'affecte pas la morphologie du RE, au contraire de celle en ATL2, qui conduit à un RE moins ramifié. En conditions de starvation, seule la déplétion en ATL3 affecte la dégradation de protéines des tubules du RE comme REEP5 ou RTN4 (Chen *et al*, 2019), alors que la déplétion en ATL2 affecte uniquement la dégradation de protéines des feuillettes (Kinectine, Climp63), de façon cohérente avec son implication dans la RE-phagie dépendant de FAM134B (Liang *et al*, 2018). L'utilisation de la fusion de la GFP et de la mCherry sur le même marqueur REEP5 a permis de suivre l'adressage au lysosome des tubules de RE. En effet, l'acidité du lysosome provoque un arrêt de la fluorescence de la GFP mais pas de la mCherry (voir partie *Autophagie chez C. elegans*). La starvation entraîne une augmentation de la localisation de REEP5 aux lysosomes chez les cellules COS-7 sauvage, ce qui n'est pas visible en cas de déplétion d'ATL3. Des expériences d'immunoprécipitation ainsi que de précipitation GST ont montré que ATL3 interagit spécifiquement avec les membres de la famille GABARAP, mais pas LC3, via deux GIMs (*GABARAP interacting motifs*), dont les mutations affectent l'interaction et la colocalisation d'ATL3 avec GABARAP. Ces mutations affectent

l'adressage d'ATL3 aux lysosomes en conditions de starvation. L'interaction entre ATL3 et GABARAP est nécessaire à sa fonction dans la RE-phagie des tubules. Les auteurs ont également testé des versions d'ATL3 comportant des mutations associées à la pathologie HSAN I (hereditary sensory and autonomic neuropathy type I) (Fischer *et al*, 2014; Kornak *et al*, 2014). Ces mutations entraînent une réduction de l'interaction avec GABARAP et une dysfonction dans la dégradation des protéines des tubules de RE en starvation. Le défaut de RE-phagie provoqué par ces mutations pourrait être responsable de la pathologie. ATL1 présente en outre des homologies avec ATL3, et comporte un GIM fonctionnel. ATL1 interagit donc également avec GABARAP. Une mutation de ce GIM est d'ailleurs associée à la paralysie spastique familiale (HSP) (McCorquodale *et al*, 2011), et elle entraîne une diminution de l'interaction avec GABARAP.

Le gène *RTN3* est un gène de type réticulon conduisant à l'expression de plusieurs isoformes, dont seule la plus longue (notée RTN3L par les auteurs (Grumati *et al*, 2017)) est impliquée dans la RE-phagie. Identifiée suite à la surexpression dans des cellules UOS d'une isoforme courte et d'une isoforme longue issue de chacun des 4 gènes de réticulons (RTN1-4), seule la surexpression de RTN3L en conditions de starvation affecte la morphologie des tubules décorés par RTN3L.

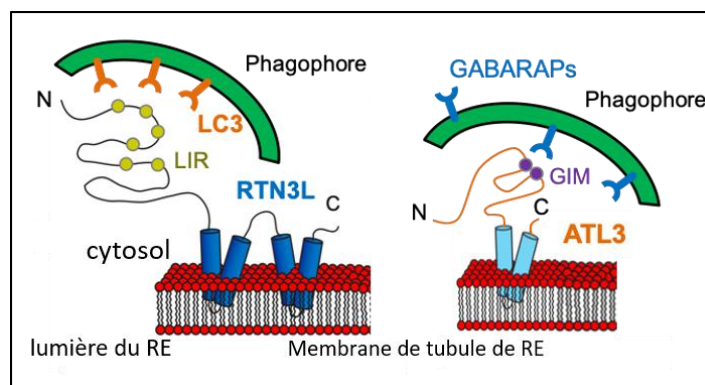


Figure 28 : L'élimination des tubules de RE par le réticulon RTN3L et le récepteur ATL3. RTN3 comporte 6 LIR (LC3-Interacting Region) sur sa partie N-terminale, et interagit avec LC3, entraînant la dégradation des tubules de RE par autophagie. ATL3 comporte deux GIM (GABARAP Interacting Motif), et peut recruter GABARAP associé aux phagophores et ainsi entraîner la RE-phagie des tubules. (adapté de Chen *et al.*, 2019; Grumati *et al.*, 2017).

Suite à la starvation, les tubules présentant un marquage pour RTN3L se fragmentent progressivement et colocalisent avec LC3B, et sont ensuite adressés au lysosome. De façon intéressante, l'homodimérisation de RTN3L est nécessaire à leur effet de fragmentation des tubules de RE. Les isoformes longues ont la particularité de présenter, sur leur partie N-terminale,

6 LIRs fonctionnels : seule la mutation simultanée des 6 LIRs entraîne la perte totale d'interaction avec LC3/GABARAP. Cette interaction est d'ailleurs nécessaire à la fragmentation du RE, qui nécessite également la machinerie autophagique. Grumati et ses collaborateurs ont également mis en évidence une distinction entre FAM134B et RTN3L. D'une part, les protéines agissent de manière indépendante, et présentent des interactomes seulement partiellement similaires. D'autre part, FAM134B interagit de façon préférentielle avec MAP1LC3, et RTN3L favorise GABARAP-L1.

Tout dernièrement, un autre récepteur de la RE-phagie a été identifié dans des études utilisant des MEF et des cellules HeLa (An *et al*, 2019; Chino *et al*, 2019). TEX264, originellement identifiée comme une protéine exprimée dans les testicules (Testis-expressing membran protein), interagit avec LC3B via un LIR et colocalise avec les autophagosomes en condition de starvation, au niveau de fragments du RE, et apparaît comme un récepteur majeur de la RE-phagie.

La RE-phagie semble liée à différentes pathologies humaines. Il existe différentes maladies infectieuses qui exploitent le RE pour leur cycle de réplication, virus ou bactéries. Si les mécanismes ne sont pas encore complètement connus, FAM134B et RTN3 peuvent restreindre la réplication de différents virus (Chiramel *et al*, 2016; Lennemann & Coyne, 2017) et peuvent être la cible de certains virus. Par exemple, le virus de l'hépatite C (HCV) possède une protéase capable de cliver FAM134B dans son RHD, ce qui entraîne son incapacité à promouvoir la RE-phagie (Lennemann & Coyne, 2017). La protéine NS3A du flavivirus interagit avec RTN3 pour moduler son activité de courbure de membranes et de générer des vésicules (Aktepe *et al*, 2017). De plus en plus de liens sont établis, notamment suite à l'identification de ATL3 comme récepteur, entre maladies neurodégénératives et RE-phagie. FAM134B est lié à la neuropathie héréditaire sensorielle HSAN-II. L'inhibition de la RE-phagie modulée par FAM134B entraîne un stress du RE dans les neurones autonomes et sensoriels et affecte leur survie (Khaminets *et al*, 2015). Si RTN3 a été lié à des maladies neurodégénératives, ce sont principalement les isoformes courtes qui ont été exploitées expérimentalement, rendant difficile le lien entre ces pathologies et le type de RE-phagie dépendant de RTN3L. Comme indiqué précédemment, l'ATL3 est également impliquée dans la HSAN-I, et l'ATL1 dans la HSP. De plus, FAM134B et SEC62 sont impliquées dans certains types de cancer. Des mutations de FAM134B ont un rôle bivalent : dans le carcinome des cellules squameuses de l'œsophage, FAM134B agit comme un oncogène et participe au développement du cancer (Islam *et al*, 2019). A l'inverse, un effet suppresseur de tumeur a été établi dans les cancers du côlon et du sein (Islam

et al, 2017; Tang et al, 2007). L'expression de SEC62 a été détectée comme amplifiée dans plusieurs cancers, sans que le mécanisme ne soit identifié. De façon similaire, TEX264 est fortement exprimé dans le cancer colorectal (Liu & Liu, 2015).

3. L'autophagie chez *Caenorhabditis elegans*

Depuis plus de 15 ans, *Caenorhabditis elegans* a émergé comme un modèle puissant pour l'étude de l'autophagie, en particulier au cours du développement. Ce nématode est un vers transparent de 1mm de long à l'âge adulte, existant principalement à l'état hermaphrodite, alors capable d'auto-fécondation. Des mâles peuvent émerger de façon spontanée avec une fréquence faible et sont capable de féconder les hermaphrodites, ce qui permet des approches génétiques. Le cycle de vie de *C. elegans* est composé d'une phase de développement embryonnaire, dont les différents stades sont décrits d'abord par le nombre de cellules puis par la morphologie de l'embryon (Figure 27).

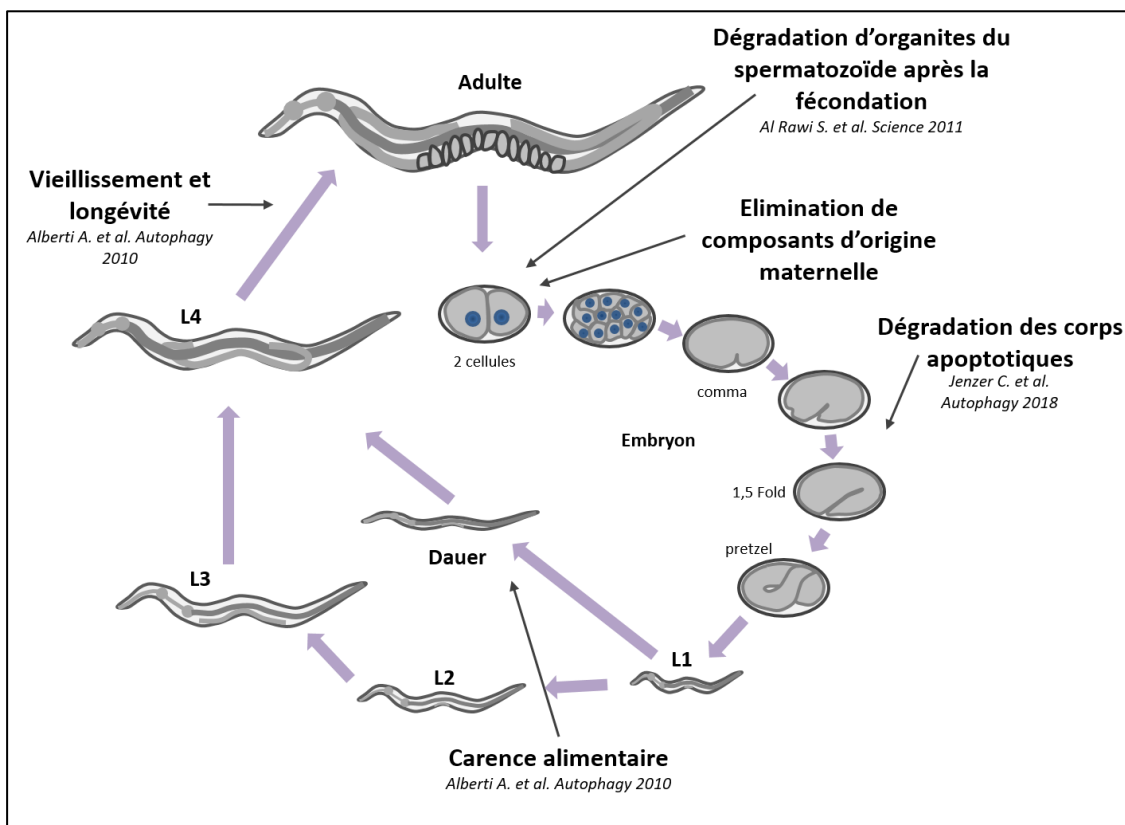


Figure 29 : Cycle de développement de *C. elegans* et implications développementales de l'autophagie. Le cycle de développement est composé d'un stade embryonnaire suivi de 4 stades larvaires et un stade adulte. L'autophagie est impliquée tout au long du développement dès la fécondation pour la dégradation des organites en provenance du spermatozoïde, au cours de l'organogénèse, à l'entrée dans un stade de dormance (dauver) en cas de carence alimentaire, et dans la longévité.

Après éclosion, quatre stades larvaires se succèdent, séparés par des mues, et entre ensuite au stade adulte caractérisé chez l'hermaphrodite par la maturité reproductive. En réponse à un milieu défavorable, les larves précoces peuvent entrer dans un stade développemental alternatif, la larve dauer, ce qui leur permet de survivre plusieurs mois.

Ce modèle présente différents avantages expérimentaux tels qu'un lignage cellulaire stéréotypé, la transparence des vers et des embryons et la disponibilité de nombreux outils et protocoles expérimentaux.

Dans la revue méthodologique suivante, co-écrite avec Yanfang Chen et Renaud Legouis, je présente les particularités de la machinerie autophagique chez *C. elegans*, les différents processus physiologiques impliquant l'autophagie dans ce modèle, et présente les différentes techniques et outils pour étudier l'autophagie chez le nématode (Chen *et al*, 2017).

Revue

Approaches for studying autophagy in *C. elegans*

Review

Approaches for Studying Autophagy in *Caenorhabditis elegans*

Yanfang Chen [†], Vincent Scarcelli [†] and Renaud Legouis ^{*}

Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), CEA, CNRS, Univ. Paris-Sud, Université Paris-Saclay, 91198 Gif-sur-Yvette CEDEX, France; yanfang.chen@i2bc.paris-saclay.fr (Y.C.); vincent.scarcelli@i2bc.paris-saclay.fr (V.S.)

^{*} Correspondence: renaud.legouis@i2bc.paris-saclay.fr; Tel.: +33-169-824-627

[†] These authors contributed equally to this work.

Received: 25 July 2017; Accepted: 26 August 2017; Published: 30 August 2017

Abstract: Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is an intracellular degradative process, well conserved among eukaryotes. By engulfing cytoplasmic constituents into the autophagosome for degradation, this process is involved in the maintenance of cellular homeostasis. Autophagy induction triggers the formation of a cup-shaped double membrane structure, the phagophore, which progressively elongates and encloses materials to be removed. This double membrane vesicle, which is called an autophagosome, fuses with lysosome and forms the autolysosome. The inner membrane of the autophagosome, along with engulfed compounds, are degraded by lysosomal enzymes, which enables the recycling of carbohydrates, amino acids, nucleotides, and lipids. In response to various factors, autophagy can be induced for non-selective degradation of bulk cytoplasm. Autophagy is also able to selectively target cargoes and organelles such as mitochondria or peroxisome, functioning as a quality control system. The modification of autophagy flux is involved in developmental processes such as resistance to stress conditions, aging, cell death, and multiple pathologies. So, the use of animal models is essential for understanding these processes in the context of different cell types throughout the entire lifespan. For almost 15 years, the nematode *Caenorhabditis elegans* has emerged as a powerful model to analyze autophagy in physiological or pathological contexts. This review presents a rapid overview of physiological processes involving autophagy in *Caenorhabditis elegans*, the different assays used to monitor autophagy, their drawbacks, and specific tools for the analyses of selective autophagy.

Keywords: *C. elegans*; genetics; in vivo imaging; electron microscopy; mitophagy; aggrephagy; LGG-1; LGG-2

1. *C. elegans*, an Animal Model to Study Autophagy

1.1. General Experimental Advantages

A *Caenorhabditis elegans* adult is an approximately 1 mm, transparent nematode, predominantly found as a self-fertilizing hermaphrodite. *C. elegans* males emerge spontaneously at low frequency and are able to fertilize hermaphrodites, which allows for all genetic approaches. The life cycle of *C. elegans* includes an embryonic phase, four consecutive larval stages (L1–L4) separated by cuticle sloughing, and the adult stage, during which the worm is reproductively mature. In favorable conditions, the lifespan of wild-type *C. elegans* is approximately two to three weeks. In response to harsh environments, early larvae can enter an alternative larval stage called dauer, which enables them to survive for several months. *C. elegans* has a rapid development, three days, and is highly fertile, with a progeny of a few hundred for a single hermaphrodite. Its cell lineage, 959 somatic nuclei in the adult hermaphrodite, is invariant, and its stereotypical development leads to the differentiation

of various cell types and tissues (epidermis, intestine, muscle, neurons ...). Its small size and transparency are convenient for diverse microscopy approaches, and populations can be synchronized and cultured in liquid medium to obtain a large quantity of biological material. Classical genetic tools are available in *C. elegans*, and transgenesis or RNA interference (RNAi) are commonly performed. Moreover, the genomic engineering by CRISPR-Cas9 has been recently adapted to *C. elegans* to efficiently create new transgenic or mutated strains [1]. All these experimental advantages established *C. elegans* as a good model, which has been key in the understanding of major biological processes such as the apoptotic cell death or the discovery of RNAi.

1.2. Physiological Processes Involving Autophagy in *C. elegans*

The *Atg* (autophagy related) genes, which are involved in various aspects of autophagy, were first identified in yeast, but are mostly conserved in other eukaryotes (Table 1). In mammals, numerous orthologs emerged from genetic amplifications, but in *C. elegans*, most *atg* genes have one single ortholog. However, two homologs exist for *Atg4*, *Atg8*, and *Atg16* (Table 1). Interestingly, each homolog of the ubiquitin-like protein ATG8, named LGG-1 and LGG-2, corresponds to a specific member of the GABARAP and LC3 families, respectively. Both LGG-1 and LGG-2 are conjugated to a phosphatidylethanolamine (PE) lipid present in the membrane of phagophore and autophagosome [2]. Although *lgg-1* is essential for development and fertility, *lgg-2* null mutants do not present a gross developmental or morphological phenotype. In regards to the limited genetic duplications and the simplicity of the animal, *C. elegans* has emerged as a powerful alternative model for exploring autophagy in the context of tissue-specificity and developmental processes [3–5].

Table 1. Autophagy genes in *C. elegans*, and homologs.

<i>C. elegans</i> Genes	Mutant Alleles or RNAi	Mammalian Homologs	Yeast Genes	References
<i>atg-2</i>	<i>bp576</i>	<i>ATG2</i>	<i>ATG2</i>	[6]
<i>atg-3</i>	<i>bp412/RNAi</i>	<i>ATG3</i>	<i>ATG3</i>	[7]
<i>atg-4.1</i>	<i>bp410</i>	<i>ATG4A, ATG4B</i>	<i>ATG4</i>	[2]
<i>atg-4.2</i>	<i>tm3948</i>	<i>ATG4C, ATG4D</i>	<i>ATG4</i>	[2]
<i>atg-5</i>	<i>bp546/RNAi</i>	<i>ATG5</i>	<i>ATG5</i>	[8]
<i>atg-7</i>	<i>bp422/RNAi</i>	<i>ATG7</i>	<i>ATG7</i>	[7]
<i>atg-9</i>	<i>bp564/RNAi</i>	<i>ATG9</i>	<i>ATG9</i>	[6]
<i>atg-10</i>	<i>bp421, bp588/RNAi</i>	<i>ATG10</i>	<i>ATG10</i>	[7]
<i>atg-16.1</i>	<i>gk668615d</i>	<i>ATG16L1</i>	<i>ATG16</i>	[8]
<i>atg-16.2</i>	<i>bp636, ok3224</i>	<i>ATG16L2</i>		[8]
<i>atg-18</i>	<i>gk378/RNAi</i>	<i>WIPI1, WIPI2</i>	<i>ATG18</i>	[9,10]
<i>bec-1</i>	<i>ok691, bp613, ok700/RNAi</i>	<i>BECN1</i>	<i>VPS30/ATG6</i>	[10,11]
<i>epg-1</i>	<i>bp414</i>	<i>KIAA0652</i>	<i>ATG13</i>	[12]
<i>epg-2</i>	<i>bp444/RNAi</i>	?	<i>VPS34</i>	[9]
<i>epg-3</i>	<i>bp405/RNAi</i>	<i>VPM1</i>	<i>VPS34</i>	[9]
<i>epg-4</i>	<i>bp425/RNAi</i>	<i>EI24</i>	<i>VPS34</i>	[9]
<i>epg-5</i>	<i>tm3425/RNAi</i>	<i>EPG5</i>	<i>VPS34</i>	[9]
<i>epg-6</i>	<i>bp242</i>	<i>WIPI3, WIPI4</i>		[6]
<i>epg-7</i>	<i>tm2508</i>	<i>FIP200</i>	<i>VPS34</i>	[13]
<i>epg-8</i>	<i>bp251</i>	<i>ATG14</i>	<i>ATG14</i>	[14]
<i>epg-9</i>	<i>bp320</i>	<i>ATG101</i>	<i>VPS34</i>	[15]
<i>let-363</i>	<i>h98/RNAi</i>	<i>TOR</i>		[16–18]
<i>lgg-1</i>	<i>tm348/RNAi</i>	<i>GABARAP</i>	<i>ATG8</i>	[7,9,18–25]
<i>lgg-2</i>	<i>tm5755/RNAi</i>	<i>LC3</i>	<i>ATG8</i>	[22,24,26]
<i>lgg-3</i>	<i>RNAi</i>	<i>ATG12</i>	<i>ATG12</i>	[7,22]
<i>pgl-3</i>	<i>bp439</i>	?		[12]
<i>rab-7</i>	<i>ok511/RNAi</i>	<i>RAB7</i>		[19,23–25]
<i>sepa-1</i>	<i>bp456</i>	?		[9,12]
<i>sqst-1</i>	<i>ok2892</i>	<i>SQSTM1/p62</i>		[13]
<i>unc-51</i>	<i>e369/RNAi</i>	<i>ULK1</i>	<i>ATG1</i>	[18,27,28]
<i>vps-34</i>	<i>h741</i>	<i>VPS34</i>	<i>VPS34</i>	[29]
<i>vps-39</i>	<i>tm2253</i>	<i>VPS39</i>		[25]
<i>vps-41</i>	<i>ep402</i>	<i>VPS4</i>		[25]

During the last 15 years, numerous studies on *C. elegans* have shown that autophagy is involved in multiple processes through embryonic and larval development. Upon fertilization, the degradation of several paternal organelles is dependent of the formation of autophagosomes. This fast process, called allophagy (allogenic organelles autophagy), leads to the degradation of the sperm components by selective autophagy, and is linked to the polyubiquitination of these organelles [19,24]. In this particular process, it has been shown that LGG-1 acts upstream of LGG-2, with LGG-1 being involved in the early steps of autophagy, and LGG-2 in the maturation of autophagosomes [25]. Later during embryogenesis, a selective autophagy process called aggrephagy is involved in the removal of proteins that are prone to form aggregates (see below Section 3.1.1). During this process, different maternally inherited germline-specific components are selectively eliminated by aggrephagy in somatic cells, allowing their restriction to the germline precursor cells. The depletion of various autophagy proteins results in a late embryonic lethality demonstrating that autophagy also plays a role in differentiation and organogenesis [30]. During larval development, autophagy acts as a response to unfavorable environmental conditions. For instance, autophagy allows newly hatched L1 larvae to survive one to two weeks without nutrients [20]. Autophagy also has a critical role for the epidermal differentiation of the dauer larvae stage, which enables survival in harsh environments for several months [31].

Autophagy is also involved in the response to various kinds of stress such as osmotic stress, oxidative stress, starvation, and resistance to pathogens. The inhibition of autophagy in *C. elegans* leads to a reduced survival under particular stress conditions [20,21,32–34]. For instance, inactivation by RNAi of autophagy genes (*atg-7*, *bec-1*, *lgg-1*) decreases the survival rates in *S. typhimurium*-infected animals and suppresses the resistance conferred by the insulin-like signaling pathway. Hormetic heat stress induces autophagy, and thus improves survival and proteostasis in the nematode [35].

Using genetic contexts where the lifespan of the worm is extended (*eat-2*, *daf-2*, *let-363*, among others), studies have shown that aging and longevity are dependent on autophagy [16]. Indeed, the long-lived phenotype can be suppressed when several autophagic genes are inactivated (*lgg-1*, *atg-18*, *bec-1*, *atg-7*, *atg-9*, *vps-34*) [36]. Several pieces of evidence link autophagy and longevity in *C. elegans* [16,23], notably through the insulin pathway, which is consistent with knowledge on other species.

Cell death is crucial for many aspects of normal development, and can occur by apoptosis, necrosis, or other processes. *C. elegans* is a well-established model to study cell death, and more than 10% of cells undergo programmed cell death during embryonic and larval development [37]. Autophagy genes are involved in apoptotic cell degradation during development, and in germline cells. Dying cells lead to the formation of cell corpses, and autophagy proteins (BEC-1, UNC-51, ATG-18) were shown to be involved in the removal of those corpses in germline cells. In addition, the inactivation of *bec-1*, the ortholog of human Beclin-1 that interacts with the apoptotic factor CED-9/BCL2, causes an augmentation of the number of apoptotic cell corpses in embryo [38]. Moreover, some classical autophagy proteins are implicated in the so-called LC3-associated phagocytosis (LAP), which is involved in apoptotic cell removal. LAP is distinct from autophagy because it does not require the whole autophagy machinery, and LC3 is recruited to a single membrane vesicle. BEC-1 is critical for the removal of cell corpses in germline cells by a LAP process. Recently, a LAP-dependent degradation, requiring BEC-1, LGG-1 and LGG-2, but not UNC-51 and EPG-8, has been demonstrated for mid-bodies in *C. elegans* embryo [39]. Using a model of necrosis for touch neurons, some studies have shown that autophagy is upregulated in early phases of necrotic cell death, and synergizes with the lysosomal pathway [18,40].

Until 2016, the relationship between autophagy and tumor cells has not been addressed using available models of *C. elegans*. However, a first report demonstrated that the upregulation of autophagy has a role in limiting the growth of heterogeneous tumors in the gonad [41].

2. Methods to Monitor Autophagy in *C. elegans*

2.1. Imaging Autophagy

One of the most common ways to monitor and study autophagy consists of imaging autophagic structures, receptors and cargoes. The transparency of *C. elegans* has facilitated the development of light microscopy approaches, either in vivo or on fixed material. Additionally, different protocols have been optimized for analyzing autophagy by electron microscopy in *C. elegans*.

2.1.1. In Vivo Imaging

Similarly to Atg8/LC3, which are widely used to monitor autophagy [42], LGG-1 and LGG-2 are the most frequent markers to localize autophagosomes in *C. elegans*, because they are recruited to autophagosome through the lipidation of their C-terminus. Several strains expressing fluorescent fusion proteins with LGG-1 and LGG-2 are available (Table 2). In 2003, Melendez and colleagues generated the first strain expressing GFP::LGG-1, driven by its own promoter [31], which rapidly became the most common way to localize autophagosomes in *C. elegans* (strain DA2123 [20]). GFP::LGG-1 shows a dynamic pattern of dots during embryogenesis, which appears along with a diffuse signal in some cells that can be reduced by confocal imaging (Figure 1A). In adult and larva, in nutrient-rich conditions, GFP::LGG-1 is diffused in various tissues. Upon starvation, the number of GFP::LGG-1 dots increases mostly in hypodermis, seam cells, and intestinal cells, corresponding to an activation of autophagy [4]. The quantification of autophagy has been performed by counting GFP::LGG-1 dots at most stages of development and in most tissues. However, care should be taken, since some cells present a high cytosolic diffuse signal, and because GFP::LGG-1 is a multiple-copies transgene with an overexpression that might affect the number of autophagosomes, and possibly forms aggregates in particular conditions. Moreover, despite an expression under LGG-1's own promoter, DA2123, GFP::LGG-1 is silenced in the germline and the very early embryo. The use of a stage-specific promoter, *Ppie-1*, has overcome this difficulty (strain RD204 [25]). DsRed::LGG-1 and mCherry::LGG-1 have been generated, although they have been less extensively used and are more prone to aggregation, especially in nutrient deprivation conditions [5,20,43]. Interestingly, a tandem fusion GFP::mCherry::LGG-1 has been created, which allows for the monitoring of the autophagic flux in vivo (Figure 1D) [25]. GFP and mCherry have different sensitivities to the acidic pH of the lysosome, which enables autolysosomes (mCherry-only positive dots) to be distinguished from autophagosomes (GFP and mCherry positive dots). However, due to the *pie-1* promoter-driven expression, this tool can only be used in the early embryo and germline cells [25].

LGG-2 has been less characterized than LGG-1, but GFP::LGG-2 can also be used as an alternative marker to monitor autophagy activity during development, because its localization at phagophores and autophagosomes has been validated by immunoelectron microscopy [25]. Of note, two particular constructs have been generated, GFP::LGG-1(G116A) and GFP::LGG-2(G130A), which inhibit their lipidation and can be used as controls to exclude aggregation artefacts (Figure 1C).

Another caution about the interpretation of LGG-1 and LGG-2 patterns arises from recent studies that show that in starved mammalian cells, the LC3 family is dispensable for autophagosome formation [44]. This finding supports the idea that an autophagosomal-like structure can be formed in the absence of the Atg conjugation system [45]. Thus, it is possible that LGG-1 and LGG-2 may not be involved in all autophagy processes. To overcome these potential limitations, alternative and reliable markers of autophagosomes should be investigated in *C. elegans*. One interesting possibility would be to use the syntaxin 17 (STX17), which labels closed autophagosomes in mammals [46]. Unfortunately, there is no obvious homolog of *stx17* in the *C. elegans* genome. Alternatively, the identification of other *C. elegans* ATG orthologous genes enabled the generation of several tools to visualize autophagy in vivo. Fluorescent reporters such as GFP::BEC-1, GFP::ATG-4.1, GFP::ATG-9, and GFP::ATG-18 have been generated, and their specific expression patterns have been described [2,6,38,47]. Those reporters have not been frequently used, but should emerge as powerful complementary tools to further visualize

and analyze the autophagy process, especially for early steps of phagophore formation. Additionally, the analysis of aggrephagy by Zhang et al. led them to develop several interesting tools [4,7], which are not restricted to this particular autophagy process. For instance, several GFP-tagged proteins can be used to analyze the degradation or visualize specific cargoes, such as the SEPA family and the autophagy receptor SQST-1 (see Section 3.1).

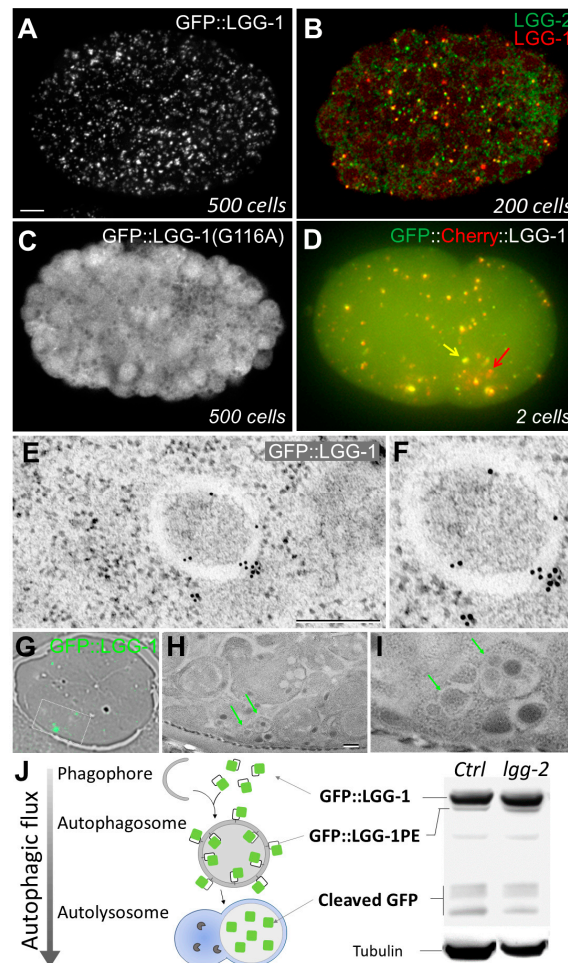


Figure 1. Use of LGG-1 and LGG-2 to monitor autophagy in *C. elegans*. (A) In vivo confocal picture of GFP::LGG-1 in a 500-cell embryo. GFP::LGG-1 puncta correspond to autophagosomes; (B) Merge confocal picture of a co-immunostaining of LGG-1 and LGG-2 in 200-cell embryo. Three types of puncta can be distinguished: LGG-1 positive (red), LGG-2 positive (green), and double positive (yellow); (C) In vivo confocal picture of GFP::LGG-1(G116A) form in a 500-cell embryo. This non-lipidated form presents a diffuse localization pattern with no puncta; (D) Epifluorescence merge picture of the tandem GFP::mCherry::LGG-1 in a two-cell embryo. The yellow arrow indicates an autophagosome (yellow resulting from GFP and mCherry fluorescences), whereas the red arrow shows an autolysosome (only mCherry fluorescence in acidic compartment); (E,F) Electron micrographs of GFP::LGG-1 embryos incubated with antibodies coupled to gold beads, revealing autophagosomal structures; (G–I) Correlative light and electron microscopy (CLEM) analysis of GFP::LGG-1; (G) Merge between bright field and fluorescence images of an ultrathin section of an embryo; (H,I) Electron micrographs of the boxed region in G. Green arrows indicate GFP::LGG-1 positive autophagosomes; (J) Schematic representation of autophagic flux and Western blot analysis of GFP::LGG-1 using GFP antibodies. The cleaved GFP correspond to a product of degradation in autolysosomes. The relative quantity of GFP::LGG-1 and the phosphatidylethanolamine (PE) conjugated form allows the measurement of the autophagic flux. Tubulin is used for normalization. Scale bar: 5 μm (A); 2 μm (E); 1 μm (H).

2.1.2. Immunostaining of Autophagy Proteins

Additionally to fluorescent reporters, antibodies against several autophagy proteins have been produced and used in *C. elegans* (Table 2). Immunostaining of the endogenous LGG-1 and LGG-2 proteins revealed dots that are similar to the GFP::LGG-1 dots in transgenic worms [6,24]. While GFP::LGG-1/LGG-2 reporters are useful for observations of live animals, immunostaining is essential to reflect the endogenous protein localization. Anti-LGG-1 and LGG-2 antibodies confirmed that the basal level of autophagy is not constant during embryonic development, with a maximum puncta between 100-cell and 200-cell stages [4]. In different autophagy mutant contexts, the pattern of LGG-1 is drastically modified. For instance, in *atg-3* and *atg-7* mutants, both required for LGG-1 conjugation to PE, no LGG-1 puncta are detected [9]. In *atg-2*, *atg-18* and *epg* mutants, the progression of the autophagy flux is impaired, resulting in the accumulation of LGG-1 puncta [6,9]. Co-localization approaches using anti-LGG-1 and anti-LGG-2 antibodies allowed researchers to highlight the existence of three distinct populations of autophagosomes: LGG-1 only, LGG-2 only, or double positive (Figure 1B) [25]. The co-localization approaches between LGG-1/LGG-2 and other proteins, for instance the autophagy substrate SEPA-1, are easy to perform by immunostaining in the embryo, but this approach is more complicated in larva or adult, especially for some tissues. Because anti-LGG-1 and anti-LGG-2 antibodies are limited resources and not commercially available, some studies used anti-GFP and anti-mCherry antibodies in reporter-expressing strains to perform co-localization analyses.

Table 2. List of autophagic reporters and targets of antibodies in *C. elegans*.

<i>C. elegans</i> Protein	Tools	Localization Pattern	References
LGG-1	GFP, DsRed, GFP::Cherry, Cherry, mRFP; antibody	Puncta	[9,25,28,31,40,48]
LGG-2	GFP::LGG-1(G116A) GFP; antibody	Diffuse Puncta	[25] [24]
BEC-1	GFP::LGG-2(G130A)	Diffuse	[23]
ATG-4.1	GFP, mRFP	Puncta/Patch	[28,38]
ATG-9	GFP	Diffuse	[2]
ATG-18	GFP	Diffuse	[6]
EPG-1	GFP	Puncta	[47]
EPG-2	GFP	Diffuse	[12]
EPG-3	Antibody	Puncta	[9]
EPG-4	GFP	Diffuse	[9]
EPG-5	GFP	Diffuse	[9]
EPG-6	GFP	Diffuse	[6]
EPG-7	GFP	Puncta	[13]
EPG-8	GFP	Diffuse	[14]
LMP-1	GFP	Puncta	[11]
SEPA-1	GFP, RFP; antibody	Puncta/Patch	[7,12]
SQST-1	GFP	Puncta/Patch	[9]
PGL-1	GFP; antibody	Puncta/Patch	[7]
PGL-3	Antibody	Puncta/Patch	[7]

2.1.3. Electron Microscopy

At the end of 1950s, electron microscopy (EM) allowed researchers to observe double-membrane vesicles, which were first coined as “autophagosomes”, by C. de Duve in 1963 [49,50]. The three main steps of the autophagy flux were described first on a morphologic basis: phagophore, autophagosome, and autolysosome. EM is still considered to be one of the most reliable approaches in the study of autophagy, as it allows the anatomic observation of the different autophagic structures without labelling. It is also a very unique method for analyzing many detailed aspects, from the sub-cellular

compartments to the tissue organization when autophagy is impaired. EM approaches have been applied and optimized for *C. elegans* [51]. When *C. elegans* is grown in starvation conditions, it has been observed through EM that the relative volume of autophagic structures increases 10-fold [34]. Autophagic structures have also been shown by EM analysis to accumulate under oxidative stress, and in mutants such as *glp-1* and *daf-2* [17,31]. In the *epg-3* or *epg-4* mutants, an abnormal accumulation of phagophore is observed, which supports the idea of a role for these proteins in the early steps of autophagosome formation [9]. Therefore, the anatomic analysis of autophagic structures by EM, combined with a quantitative analysis, allows for a good characterization of the autophagy flux. Moreover, combining EM with gold immunostaining can create a more specific analysis of various autophagy proteins or processes. Indeed, the presence of LGG-1 and LGG-2 at the membranes of phagophores and autophagosomes were confirmed with this technique (Figure 1E). As an alternative approach to immunogold labelling, correlative light and electron microscopy (CLEM) allows researchers to study the distribution of an autophagy protein when antibodies are not available. The principle is to combine EM with the observation of the fluorescence of a reporter by using fixation conditions and embedding resin that preserves the fluorescence. Such a technic has been efficiently used for GFP::LGG-1 and GFP::LGG-2, allowing researchers to correlate fluorescent puncta with vesicular structures (Figure 1G) [25].

EM-based approaches present the advantages of being anatomical, very resolutive, and independent of any markers, so they are often essential to further confirm light microscopy observations. Although EM approaches are very informative, they can only be performed on fixed tissue, which can generate artefacts; they are time and resources consuming; and they require a high level of expertise. Moreover, rare events could be very difficult to identify, and 3D reconstitutions are complicated to perform in routine. Therefore, EM and light microscopy analysis are very complementary approaches.

2.2. Molecular Approaches

Autophagy is a very dynamic process whose regulation relies on multiple parameters. Although imaging autophagy reveals insights about important features of the process, it is not sufficient to address all aspects. In order to monitor the level of autophagy and/or the completion of the different steps of the autophagic process, different molecular tools are available that enable the quantitative analysis of protein modifications.

2.2.1. Monitoring Autophagic Flux by Western Blotting

LGG-1 is synthesized as a precursor protein and immediately cleaved at position 116 by the protease ATG-4.1 to generate LGG-1-I, a protein diffuse in the cytosol with a C-terminal exposed glycine residue. By a conjugation mechanism involving several ATG proteins, LGG-1-I is lipidated to PE, thereafter called LGG-1-II, and associated at the membrane of the phagophore and autophagosome [25]. Due to their differences in molecular weight and lipid modification status, LGG-1 forms can be separated on a SDS-page gel, with LGG-1-II migrating slightly faster than LGG-1-I, and revealed by Western blotting (WB). The relative quantity of the LGG-1-II form compared with LGG-1-I can generally be correlated with the number of autophagosomes. Measuring the ratio of LGG-1 conjugated to autophagosomes is a way to quantify autophagy activity in different contexts [4,52]. For example, in embryos, the LGG-1 precursor is not visible, and LGG-1-II is in small minority compared with LGG-1-I. When autophagy flux is blocked, either during autophagosome formation or maturation (*epg-3*, *epg-5*), both LGG-1-I and LGG-1-II levels increase. In contrast, when LGG-1 cleavage is impaired (*atg-4.1* mutant), a significant accumulation of LGG-1 precursor is observed, and LGG-1-I becomes undetectable. When conjugation is blocked (*atg-3*), LGG-1-I is accumulated and the lipidated form is not present. More generally, an increased level of lipidated LGG-1-II reflects an increase in the number of autophagic structures, which can result from both an increase of the autophagic flux or a blockage of autophagosomal maturation. The usage of lysosomal inhibitors can help distinguish between those

cases [52]. An alternative approach consists of using GFP::LGG-1-expressing strains. Within these constructs, WB using an anti-GFP allows the identification of the lipidated and non-lipidated forms, and an additional lower band that corresponds to the cleaved GFP (Figure 1J). GFP::LGG-2 can also be used for monitoring autophagy through WB, although it has been less extensively characterized and used. When autophagy is functional, a major band for GFP::LGG-2 is observed along with two minor bands, one slightly higher and one slightly lower, which could correspond to post-translational modifications. The lipidated form has not been strictly identified yet with the non-lipidated form GFP::LGG-2(G130A); only the major band is observed [23]. Similarly to LGG-1, a cleaved GFP appears upon formation of the autolysosome, and is very convenient for measuring the autophagic flux. For example, in a context where the formation of the autolysosome is impaired, the amount of the cleaved GFP is decreased, while GFP::LGG-1-I and GFP::LGG-1-II forms are increased.

If WB has been predominantly performed on LGG-1 and LGG-2, the quantification of known cargoes and receptors of autophagy also has been punctually used. In particular, the amount of the aggrephagy cargo PGL-3 and the receptor SQST-1 have been used as indicators of autophagy activity by WB [7,53].

Western blotting approaches are useful to evaluate and quantify autophagy in different contexts. They are also relatively easy to perform, but some limitations should be mentioned. Since LGG-1 expression highly depends on the developmental stage, the population of worms or embryos needs to be synchronized, and the material must be in sufficient quantity. Additionally, the sensitivity of this technique is limited, and subtle changes of autophagic flux state might be not observed. In particular, a modification of the autophagic flux limited to a specific tissue could potentially be very difficult to detect with this technique.

2.2.2. Monitoring Autophagy Genes Expression by RT-qPCR

While the post-translational modification of several autophagy proteins is very important for autophagy, analyzing the transcriptional level could be a good indication of an autophagy induction/repression. Measuring the transcription level of autophagy genes by RT-qPCR has been an efficient way to detect the induction of autophagy. In the context of starvation or the inhibition of the LET-363/TOR signaling pathway, this technique revealed an increase of mRNA levels of several autophagy genes (*lgg-1*, *atg-18* . . .). This approach allowed the identification of new actors involved in the regulation of autophagy gene expression in *C. elegans*, and particularly the transcription factor HLH-30, ortholog of mammalian TFEB [54]. In a similar way, in the long-lived insulin receptor *daf-2* mutants, mRNA levels of some autophagy genes are increased, which supports the link between autophagic activity and lifespan expansion [55]. For this technique, the normalization of gene expression to multiple control genes is mandatory (for example *pmp-3*, *cdc-42*) [56,57]. RT-qPCR is very sensitive, and can be performed on many genes in the same experiment even with small samples, so it represents an interesting complementary tool.

2.3. Modifying Autophagy

In order to study the links between autophagy and cellular or developmental processes, it is essential to analyze the effects of a modification in the autophagic flux. Through using either genetic approaches or drug treatments, *C. elegans* allows the study of the consequences of an induction or a blockage of autophagy throughout a whole organism.

2.3.1. Genetic Approaches

Yoshinori Ohsumi identified *Atg* genes by genetic screens in *Saccharomyces cerevisiae*, for which he was awarded the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine. The large majority of those genes have a single ortholog in *C. elegans*, and are involved in autophagy process (Table 1). For example, one of the first autophagy genes characterized in *C. elegans* is *bec-1* [31]. The usage of RNAi to deplete BEC-1 causes defects in dauer formation and extension of the lifespan [31]. Thanks to the international

C. elegans Gene Knockout Consortium and the Japanese National BioResource Project, numerous knocked-out mutants in autophagy genes are available. Noticeably, additional autophagy genes have been discovered by screening in *C. elegans*. Zhang et al. performed a non-lethal genetic screen to identify mutants for deficiency in the degradation of autophagy aggregates during embryonic development [6,9]. The newly identified genes involved in this autophagy process have been named *epg* (ectopic PGL granules). The *epg* genes are either distantly related to yeast *ATG* genes or have no yeast counterparts [12,14,15]. Numerous new tools such as mutants and fluorescent reporters have been generated by these studies. More recent RNAi screenings allowed the identification of signaling pathways involved in the control of autophagy. The results of the different screenings and the numerous genetic tools available have made *C. elegans* a powerful model to study the genetics behind autophagy process and its modulation. Indeed, the mutants of diverse autophagy genes involved in different steps of autophagy process, such as impairing or decreasing autophagy, are widely used. Additionally, mutants in the regulation of autophagy (*hlh-30*, *TOR*) and adaptors (*sepa*, *sqst-1*) also have been described [9,12,56,58]. The depletion of some autophagy proteins, such as BEC-1 and LGG-1, can be linked to sterility or lethality occurring during development, which can complicate their study at later stages. Nevertheless, RNAi in *C. elegans* can be performed by feeding and has been successfully used to provoke depletions in larva and adults. In addition, RNAi depletion can be performed in a tissue-specific manner, thanks to the development of a genetic tool [59]. Since *C. elegans* presents highly specialized tissues, tissue-specific autophagy genetic tools can be interesting for studying the involvement of autophagy in very specific processes. While tissue-specific knockout are not possible in classical mutants, a tissue-specific RNAi approach has been developed in *C. elegans*. It consists of using a strain impaired for RNAi processing machinery, then transfected with construct with a tissue-specific promoter, which restores the RNAi process. Intestinal-specific depletion of BEC-1 revealed that autophagy activity in the intestine is essential against *S. typhimurium* infection [33]. The main limit of the RNAi approach could be its efficiency, with some RNAi failing to reliably deplete the target protein. So, it is essential to check whether a specific RNAi has an effect on the amount of protein or mRNA. Temperature-sensitive mutants are generally a good tool to overcome lethality in *C. elegans*, but have not been yet reported for *atg* genes. Particular genetic tricks can be exploited for resolving lethality issues. For example, the *lgg-1(tm3489 maternal)* strain was obtained by the transgenesis of *Plgg-1::gfp::lgg-1*, which is expressed in somatic cells but not in germline cells. Indeed, the expression of GFP::LGG-1 starts when embryos reach 20-cell stage, rescuing the adult sterility and allowing the characterization of the phenotype of early embryos depleted for LGG-1 [23,25]. Altogether, the numerous autophagy-related genetic tools available in *C. elegans* allow an in-depth genetic analysis of pathways and epistasis.

2.3.2. Pharmacological Treatments

In mammalian cells, drugs are commonly used for modifying and also analyzing the autophagic flux. In regards to the links between pathologies (neurodegenerative diseases, cancer) and autophagy, drugs that modulate autophagy activity have a strong potential. Those molecules have various effects, and can be sorted into two main categories: autophagy activators and autophagy inhibitors. Drugs causing starvation or ER stress also increase the induction steps of autophagy, whereas some activators have an effect on later steps of the autophagic process, during the autophagosome maturation. Several inhibitors are effective for the blockage of the induction steps (class III PI3P inhibitors), while others impair the autophagosome's degradation.

In *C. elegans*, several constraints made the pharmacological approaches less preponderant for modulating autophagy. Indeed, worms present a protective cuticle that reduces the penetration and diffusion of drugs. Additionally, it has been suggested that *C. elegans* metabolism reduces the efficiency of drugs, leading to the usage of higher concentrations of drugs in this model [60]. Lastly, numerous studies on autophagy have been performed on the embryos, whose eggshell is impermeable to most molecules, which complicates pharmacological approaches. Nevertheless, several drug screenings

and pharmacological approaches have been validated in *C. elegans* for both inducing and inhibiting autophagy. A drug screen on *C. elegans* showed that fluphenazine, a potent autophagy enhancer, was efficient at reducing the proteotoxicity of ATZ (alpha-1-antitrypsin Z) in both *C. elegans* and a mouse model. In mammals, the accumulation of ATZ is linked to liver disease, as well as associated with hepatic fibrosis and hepatocellular carcinoma [48]. In regard to longevity, both resveratrol and spermidine increase the lifespan of the nematode in an autophagy-dependent way [61,62]. On the other hand, Bafilomycin A1 can be used to block the late steps of autophagy and avoid autophagosome maturation, thus delaying the degradation of autophagy substrates, and simplifying their study. It can be administered by feeding or injection; both approaches showed an effect on autophagy [63,64]. The inactivation of autophagy using inhibitors of type III PI3K, Wortmannin, and 3-methyladenin, causes an hypoxic lethality in the worms [21].

Alternatively, exposure to stress such as starvation or heat-stress are also an option that can be exploited to induce autophagy. Starvation strongly increases the volume of autophagosomes [34], and thermotolerance affects the transcription of autophagic genes, autophagosome numbers, and mitochondrial degradation [20,35,65,66]. The main limitation of using either pharmacological or physical treatments is the potential secondary effects on various other cellular processes. Additionally, autophagy induction or inhibition caused by treatments could be a secondary effect of the potential disruption of an unrelated process. In summary, this approach is powerful for performing mechanistic analyses, but should be used cautiously for interpreting physiological processes.

3. Tools to Monitor Selective Autophagy

Depending on the cargoes that are sequestered and degraded, autophagy has been qualified as bulk or selective. Selective autophagy specifically recognizes and engulfs proteins or organelles through autophagy receptors that mediate the interaction with ATG8/LC3 proteins. Autophagy adaptors could have a function during selective autophagy, but have no roles on cargo recognition, and are not degraded during the process [67]. It can be sometimes difficult to distinguish between bulk and selective autophagy because they mainly share the same autophagy machinery and can contain similar organelles, such as mitochondria or ER. This part concentrates on two selective processes: the aggrephagy and the mitophagy, for which *C. elegans* has been efficiently used for in vivo analyses.

3.1. Aggrephagy

Autophagy is an efficient mechanism for the degradation of proteins, and in particular of aggregates, through a selective process called aggrephagy. During *C. elegans* embryogenesis, several aggregate-forming proteins are selectively removed by aggrephagy [53].

3.1.1. P Granules Degradation through Aggrephagy

P granules are ribonucleoprotein aggregates synthesised in germline and transferred to offspring through oocyte. P granules were proved to have a function in germ cell determination during embryogenesis, and are restricted to germline precursor cells, while the P granules components in somatic cells are quickly degraded [7,68]. Two types of P granules components, the proteins PGL-1 and PGL-3, are selectively degraded through aggrephagy, and in autophagy mutants, P granules-like (PGL) structures accumulate until the larva stage. By a genetic screening, the SEPA-1 protein was identified as an important factor for P granules degradation. SEPA-1 binds with both PGL-3 and LGG-1 for cargo recognition in this process, and SEPA-1 itself is also degraded by autophagy [7]. Western blot analysis showed that the *sepa-1* mutant caused the accumulation of PGL granules. Immunostaining assay revealed the co-localization of SEPA-1 with both PGL granules and LGG-1 dots, which indicated that the SEPA-1 protein may be a bridge molecule in mediating P granule selective autophagy. Then, the co-immunoprecipitation confirmed the interaction of SEPA-1 with PGL granules and LGG-1. These data demonstrated that SEPA-1 is a receptor for selective autophagy in P granules degradation.

Several tools have been generated to allow the analysis of autophagy in the embryo. P granules can be analyzed by EM, immunofluorescence or Western blot on embryo extract, and transgenic worms expressing GFP::PGL-3 or GFP::PGL-1 in germline allow in vivo observation. In wild-type embryos, GFP::PGL-1 granules are detected only in germ cell precursors, while in autophagy mutant embryos (*lgg-1, atg-3, atg-4.1, atg-7, unc-51*), GFP::PGL-1 granules accumulate in the whole embryo. Using this selective autophagy process, Zhang et al. performed very powerful genetic screens that permitted the identification of the EPG proteins [6,9] (see also Section 2.3.1).

3.1.2. Poly-Q Aggregates

Due to overexpression or misfolding, some proteins form aggregates within the cell that must be then degraded. In mammalian cells, proteins containing polyglutamine (polyQ) are prone to form aggregates when the number of glutamine residues is above the normal length, which leads to a cellular toxicity. It has been reported that the formation of some polyQ aggregates can be responsible for neurodegenerative diseases [69], and that autophagy is a major pathway to degrade polyQ aggregates within the cell [70,71]. Thus, polyQ reporter proteins have been used for the study of autophagy in *C. elegans* as a substrate to reflect the autophagy activity. A series of transgenic strains have been generated that express a reporter GFP protein fused to different length polyQ tracts in various tissues [72–75]. Diffuse GFP fluorescence indicates that the polyQ constructs are not aggregated, while GFP clusters correspond to polyQ aggregates, allowing the tracing of polyQ aggregates in vivo by time-lapse microscopy. Interestingly, it has been shown that huntingtin-like polyQ aggregates can be extruded out of neuron cells, and that the extrusion is increased when autophagy is blocked [76]. Moreover, polyQ aggregates remain insoluble after worm lysis, and can be detected by WB [72]. The capacity of polyQ to form aggregates is correlated with the number of glutamines, although it is also affected by aging or stress. The inactivation of autophagy genes affects the amount of polyQ aggregates and increases their toxicity [77,78]. The polyQ aggregates can also be directly detected and quantified by electron microscopy. In *C. elegans*, it has been shown that polyQ aggregates formed during aging were associated with ubiquitination. In mammalian cells, p62 functions as an autophagy receptor for recognizing ubiquitinated protein aggregates, and SQST-1, the homologue of p62 in *C. elegans*, mediates autophagy during embryogenesis [9]. Similarly to p62 in mammalian cells, SQST-1 aggregates also accumulate in autophagy deficiency contexts in both embryo and larva stages. However, whether SQST-1 is involved in the degradation of polyQ aggregates has not been studied in *C. elegans*.

3.2. Selective Degradation of Mitochondria by Autophagy

Mitophagy is one of the most studied of the selective autophagy processes. Studies in yeast and mammalian cells have revealed that mitophagy is an important mechanism for mitochondrial quality control, and its impairment has been linked with pathologies such as cancers as well as neurodegenerative and mitochondrial diseases. In *C. elegans*, the study of mitophagy was mainly focused on its role in eliminating paternal mitochondria [19,24]. More recently, some studies have started to exploit the advantages of *C. elegans* to explore the roles of mitophagy in the context of aging or other stress conditions [65,66]. Since mitophagy and bulk autophagy share a common machinery, the tools described previously (see Section 2) are useful to study mitophagy in *C. elegans*. However, it is becoming crucial to develop a series of methods that are able to specifically discriminate mitophagy from bulk autophagy. We briefly describe here the recent tools that allow the analysis of the mitophagy flux.

3.2.1. Mitophagy of Paternal Mitochondria

In most metazoans, mitochondrial DNA (mtDNA) is maternally inherited [79], and paternal mitochondria are eliminated by diverse mechanisms that have been studied in several model animals. These degradative mechanisms can occur before or after fertilization, and result in the clearance of the whole paternal mitochondria, including its mtDNA. The presence of autophagy markers around

sperm material in the fertilized oocyte suggested that autophagy may be involved in this process. Indeed, studies in *C. elegans* have shown that upon fertilization, the paternal mitochondria and other sperm specific membranous organelles (MOs) are selectively removed by autophagy during a process called allophagy [19,24]. In vivo imaging and immunofluorescence are the most widely used approaches to analyze allophagy. The main substrates of allophagy are paternal mitochondria and MOs, which can be labelled by the antibodies 1CB and SP56 [80,81]. In the absence of a specific antibody for paternal mitochondria, sperm mitochondria are labelled with a mitochondrial-targeted GFP or through using a dye. For instance, applying mitoTracker or tetramethylrhodamine, ethyl ester (TMRE) to males before mating allows researchers to stain and trace paternal mitochondria in the embryo [19,24]. Tracing mtDNA has been also used for monitoring paternal mitophagy through the labelling of males with the nucleic acid dye SYTO11 [82]. Alternatively, a specific genetic strain can be used to detect paternal mtDNA by PCR. In this particular heteroplasmic strain, a part of mtDNA harbors the uaDf5 deletion that is easily discriminated from wild-type mtDNA [83]. Sperm mitochondria carrying the uaDf5 mtDNA are normally quickly degraded upon fertilization, but persist in the progeny when autophagy is blocked in the oocyte [19,24]. Autophagosomes are analyzed with tools described above (see Section 2.1) using LGG-1 and LGG-2 antibodies or fluorescent reporters as well as EM. In early embryos, the presence of double-membrane vesicles engulfing paternal mitochondria was revealed by EM analysis, further demonstrating mitophagy [24]. Immunostaining analyses demonstrated the co-localization of paternal mitochondria and MOs with LGG-1 and LGG-2 soon after fertilization until 8-cell stage. In *unc-51*, *atg-5*, *atg-7*, and *atg-18* autophagy mutants, the number of LGG-1/2 dots strongly decreased and paternal mitochondria persisted. A recent study has identified the prohibitin PHB-2 as a novel mitophagy receptor involved in the degradation of paternal mitochondria in *C. elegans* [84]. Interestingly, analysis of allophagy revealed that despite the formation of LGG-1 and LGG-2 double-positive autophagosomes, LGG-1 and LGG-2 participate differently in the process. Time-lapse assay with a tandem fusion protein GFP::mCherry::LGG-1, EM, and Western blot experiments were used to characterize the autophagic flux. In the *lgg-1* null mutant, the formation of autophagosomes is blocked, whereas the *lgg-2* null mutant only delays the formation of autolysosomes during allophagy. Further studies using a yeast two-hybrid screen and co-localization in vivo revealed that LGG-2 interacts with the HOPS protein VPS-39 to facilitate the fusion between autophagosomes and lysosomes [25].

Allophagy is essential for the elimination of sperm materials, but it is probable that other degradative mechanisms involving proteasome or other proteins could also be involved in this process [85]. A recent study reported that the mitochondrial endonuclease G, encoded by the gene *cps-6*, is involved in the breakdown and aggregation of sperm mtDNA within the mitochondrial matrix after fertilization, but before autophagosome engulfment. The mutant of paternal *cps-6* slows down the internal breakdown of paternal mitochondria, and in turns leads to a delay of paternal mitochondria degradation [82].

3.2.2. Mitophagy in Stress Conditions

In normal conditions, basal mitophagy in *C. elegans* is kept at a low level. Many stresses can cause mitochondrial damages, and the dysfunction of mitochondria could result in cell toxicity linked to the increase of ROS level or the triggering of the apoptotic cascade. However, if a severe mitochondrial stress leads to mitochondrial dysfunctions and cellular toxicity, a mild mitochondrial stress could activate a beneficial adaptive response and extend lifespan in *C. elegans* [35,86]. The induction of mitophagy is essential to remove dysfunctional mitochondria, maintain cellular homeostasis, and play a protective role in stress conditions. As a model animal, *C. elegans* has been used to analyze the effect of various mitochondrial stresses, paving the way to study the regulation and the roles of mitophagy on stress tolerance. This part briefly presents the tools that are used to monitor and trigger mitophagy.

The original method used to identify mitophagy was EM, which has been widely used in yeast, mammalian cells, and *C. elegans*. The anatomy of mitochondria is very characteristic, and EM analysis

is a powerful approach for the identification of phagophores and autophagosomes that are sequestering fragmented mitochondria [87]. However, EM has not been extensively used in *C. elegans* for characterizing mitophagy in stress conditions, probably because it is time-consuming and costly. As a result, in vivo approaches that are easy to carry out in *C. elegans* and enable the analysis of numerous samples have been preferred, such as monitoring the co-localization of fragmented mitochondria with autophagosomes marked by fluorescence (Figure 2). Thanks to the genetic tools developed in *C. elegans*, researchers have generated transgenic worms expressing fluorescence proteins for observation in living animals. For instance, transgenic worms expressing mitochondria-targeted GFP and DsRed::LGG-1 have been used to detect the co-localization of mitochondria and autophagosomes indicating mitophagy events (Figure 2A) [66]. However, the overexpression of DsRed::LGG-1 may form aggregates, and this transgenic strain should be used carefully and with rigorous controls. Alternatively, the tandem fluorescence protein mitoRosella has been developed to monitor in vivo the mitophagic flux (Figure 2B). During the last step of autophagy, the autophagosomes fuse with lysosomes, which allows for the formation of an acidic compartment, the autolysosome, favorable for the degradation of cargoes. MitoRosella is a biosensor containing a fast maturing pH-insensitive DsRed and a pH-sensitive GFP addressed to the mitochondria. Thus, measuring the ratio between GFP and DsRed fluorescences allows researchers to monitor the fusion of mitochondria-containing autophagosomes with lysosomes [66]. Although mitoRosella has been efficiently developed for monitoring the mitophagic flux in the body wall muscle cells (Figure 2C), its heterogeneous level of expression between individual muscle cells may affect the morphology and the homeostasis of the mitochondrial network.

Upon stress conditions, mitophagy is generally considered to be a degradative process that enables researchers to recognize and selectively remove fragmented and dysfunctional mitochondria. When mitophagy is deficient, damaged mitochondria accumulate in the cells, which results in major consequences on the homeostasis of the cell. So, it can be useful to measure the reactive oxygen species (ROS), ATP, and cytoplasmic Ca^{2+} levels, as well as the oxygen consumption, which are all indicators of the mitochondrial status and could reveal an induction or a defect of mitophagy. Similarly, the analysis of the mitochondrial morphology is informative because mitophagy is often accompanied by mitochondrial fission [88,89]. Transgenic worms expressing mitoGFP or GFP fused with mitochondrial protein such as DCT-1 or a fragment of the yeast TOM70 have been efficiently used to detect mitochondrial morphology in specific tissues [66,90]. During mitophagy in *C. elegans*, the fragmentation of mitochondria can be visualized using $P_{myo-3}::mtGFP$ worms in body wall muscle cells, or MitoTracker in numerous tissues. The quantification of mitochondrial fluorescence is also informative, because a reduced amount of mitochondria is one of the features of active mitophagy [66,91].

Since the basal level of mitophagy is very low in *C. elegans*, the use of mitochondrial stress often has been a necessity to better understand the mechanism and physiological function of mitophagy. Drugs that cause the loss of mitochondrial potential (CCCP) or produce oxidative stress in mitochondria (paraquat) are also powerful mitophagy inducers in *C. elegans* [66]. Recent studies revealed that urolithin A, a natural compound belonging to ellagitannins, could induce mitophagy and autophagy in both mammalian cells and *C. elegans*, and prolong the nematode lifespan [91]. Heat stress has been efficiently used to induce mitophagy in *C. elegans*, but other types of autophagy have not been excluded. Finally, the facility to carry out genetic approaches in *C. elegans* could be a powerful means of inducing mitophagy. For example, in *C. elegans*, a partial depletion of frataxin, a main protein of the Fe-S-cluster-containing complex, causes an iron-depletion stress in mitochondria that induces mitophagy [65]. Alternatively, the blockage of mitophagy can be achieved by knocking down either the autophagy general machinery or mitophagy-specific genes. For instance, the mutated form of BEC-1, which belongs to nucleation PI3K complex, blocked mitophagy in *C. elegans* [66], while other studies in HeLa cells indicated that BECN1 is dispensable for CCCP-induced mitophagy [92]. Recent studies confirmed that the homologs of Parkin and PINK1 (PDR-1/PINK-1), two well-studied proteins critical and specific for mitophagy in mammalian cells, are also involved in mitophagy in *C. elegans* [66,93].

The deficiency of *pdr-1/pink-1* specifically blocked CCCP, paraquat, or heat stress-induced mitophagy in *C. elegans*, and also reduced the lifespan of long-lived animals. Recently, DCT-1 protein, which contains a classic LC3-interacting region (LIR) motif and can interact with LGG-1, has been identified as a receptor for mitophagy in *C. elegans* [66].

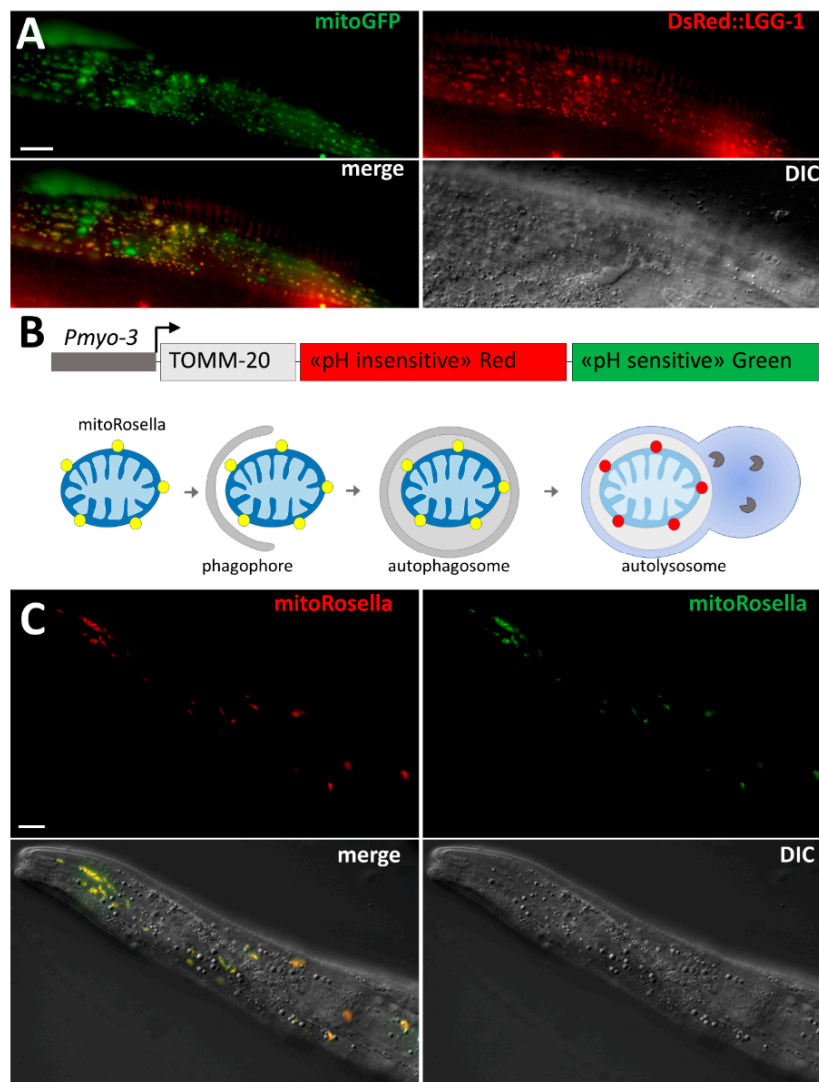


Figure 2. Tools for the study of mitophagy in *C. elegans*. (A) In vivo confocal images of mitophagy in the body wall muscle cells of an adult worm. After heat stress (37 °C for 2 h), mitophagy is visualized by co-localization between fragmented mitochondria (mitoGFP in green) and autophagic structures (DsRed::LGG-1); (B) Schematic diagram of mitoRosella fluorescent protein biosensor under the control of the muscle-specific promoter *myo-3*. MitoRosella is a chimeric protein-containing fragment of TOMM20, which leads to mitochondrial localization, the pH-stable DsRed fluorescent protein, and the pH-sensitive GFP. During mitophagic flux, mitochondria turn from yellow (DsRed and GFP) to red in autolysosome, due to the quenching of the GFP signal; (C) Confocal images of mitoRosella in body wall muscle cells of an adult worm in standard condition (20 °C). All mitochondria are fluorescent for GFP and DsRed, indicating that the basal level of mitophagy in muscle is very low. Scale bar = 10 µm.

4. Conclusions

Although this review mainly focuses on macroautophagy, other autophagy pathways, such as chaperone-mediated autophagy and microautophagy, should not be ignored. However,

their implications in the physiology of *C. elegans*, has not been yet analyzed. Since macroautophagy is a complex and dynamic process, each method for studying autophagy presents some limitations. In fact, the combination of different approaches is essential when analyzing autophagy to minimize the drawbacks. In regards to recent publications, it is clear that new methods for monitoring autophagy will be rapidly developed to improve and optimize the currently available assays.

If autophagy is a key mediator for cell metabolism, it is now clear that it is acting together with the other degradative mechanisms, and particularly the ubiquitin-proteasome system. As mentioned previously, proteasome may contribute to paternal organelles degradation together with autophagy. Moreover, a recent study identified a complementary way to analyze autophagy for the elimination of protein aggregates and organelles [67]. Under stress conditions, adult *C. elegans* neurons could extrude vesicles, called exophers, which contain protein aggregates and mitochondria [76]. Both mitophagy and exopher-genesis are involved in proteostasis and mitochondria quality control, and may contribute to relieve neurodegeneration.

Acknowledgments: The authors would like to thank their colleagues for helpful discussion and particularly Céline Jenzer and Céline Largeau for providing pictures. We are grateful to Nektarios Tavernarakis for sending the mitoRosella and the DsRed::LGG-1; mtGFP strains. We are also grateful to the *C. elegans* autophagy community for sharing informations and reagents and apologize if some data could not be mentioned in this review due to size limitations. The Legouis' group is supported by the Agence National de la Recherche (project EAT, ANR-12-BSV2-018) and the Association pour la Recherche contre le Cancer (SFI20111203826). Y.C. is a recipient of a fellowship from the China Scholarship Council and VS received a fellowship from of the Ligue Nationale contre le Cancer.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Paix, A.; Folkmann, A.; Rasoloson, D.; Seydoux, G. High efficiency, homology-directed genome editing in *Caenorhabditis elegans* using CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Genetics* **2015**, *201*, 47–54. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Wu, F.; Li, Y.; Wang, F.; Noda, N.N.; Zhang, H. Differential function of the two Atg4 homologues in the autophagy pathway in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 29457–29467. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Jenzer, C.; Simionato, E.; Legouis, R. Tools and methods to analyze autophagy in *C. elegans*. *Methods* **2015**, *75*, 162–171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Zhang, H.; Chang, J.T.; Guo, B.; Hansen, M.; Jia, K.; Kovács, A.L.; Kumsta, C.; Lapiere, L.R.; Legouis, R.; Lin, L.; et al. Guidelines for monitoring autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* **2015**, *11*, 9–27. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Papandreou, M.E.; Tavernarakis, N. Monitoring autophagic responses in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Enzymol.* **2017**, *588*, 429–444. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Lu, Q.; Yang, P.; Huang, X.; Hu, W.; Guo, B.; Wu, F.; Lin, L.; Kovács, A.L.; Yu, L.; Zhang, H. The WD40 repeat PtdIns(3)P-binding protein EPG-6 regulates progression of omegasomes to autophagosomes. *Dev. Cell* **2011**, *21*, 343–357. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. Zhang, Y.; Yan, L.; Zhou, Z.; Yang, P.; Tian, E.; Zhang, K.; Zhao, Y.; Li, Z.; Song, B.; Han, J.; et al. SEPA-1 mediates the specific recognition and degradation of P granule components by autophagy in *C. elegans*. *Cell* **2009**, *136*, 308–321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Zhang, H.; Wu, F.; Wang, X.; Du, H.; Wang, X.; Zhang, H. The two *C. elegans* ATG-16 homologs have partially redundant functions in the basal autophagy pathway. *Autophagy* **2013**, *9*, 1965–1974. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Tian, Y.; Li, Z.; Hu, W.; Ren, H.; Tian, E.; Zhao, Y.; Lu, Q.; Huang, X.; Yang, P.; Li, X.; et al. *C. elegans* screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms. *Cell* **2010**, *141*, 1042–1055. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Guo, B.; Huang, X.; Zhang, P.; Qi, L.; Liang, Q.; Zhang, X.; Huang, J.; Fang, B.; Hou, W.; Han, J.; et al. Genome-wide screen identifies signaling pathways that regulate autophagy during *Caenorhabditis elegans* development. *EMBO Rep.* **2014**, *15*, 705–713. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

11. Ruck, A.; Attonito, J.; Garces, K.T.; Nuñez, L.; Palmisano, N.J.; Rubel, Z.; Bai, Z.; Nguyen, K.C.Q.; Sun, L.; Grant, B.D.; et al. The Atg6/Vps30/Beclin 1 ortholog BEC-1 mediates endocytic retrograde transport in addition to autophagy in *C. elegans*. *Autophagy* **2011**, *7*, 386–400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Tian, E.; Wang, F.; Han, J.; Zhang, H. epg-1 functions in autophagy-regulated processes and may encode a highly divergent Atg13 homolog in *C. elegans*. *Autophagy* **2009**, *5*, 608–615. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Lin, L.; Yang, P.; Huang, X.; Zhang, H.; Lu, Q.; Zhang, H. The scaffold protein EPG-7 links cargo–receptor complexes with the autophagic assembly machinery. *J. Cell Biol.* **2013**, *201*, 113–129. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Yang, P.; Zhang, H. The coiled-coil domain protein EPG-8 plays an essential role in the autophagy pathway in *C. elegans*. *Autophagy* **2011**, *7*, 159–165. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Liang, Q.; Yang, P.; Tian, E.; Han, J.; Zhang, H. The *C. elegans* ATG101 homolog EPG-9 directly interacts with EPG-1/Atg13 and is essential for autophagy. *Autophagy* **2012**, *8*, 1426–1433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Hansen, M.; Chandra, A.; Mitic, L.L.; Onken, B.; Driscoll, M.; Kenyon, C. A Role for Autophagy in the Extension of Lifespan by Dietary Restriction in *C. elegans*. *PLoS Genet.* **2008**, *4*, e24. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Lapierre, L.R.; Gelino, S.; Meléndez, A.; Hansen, M. Autophagy and lipid metabolism coordinately modulate life span in germline-less *C. elegans*. *Curr. Biol.* **2011**, *21*, 1507–1514. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Tóth, M.L.; Simon, P.; Kovács, A.L.; Vellai, T. Influence of autophagy genes on ion-channel-dependent neuronal degeneration in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Sci.* **2007**, *120*, 1134–1141. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Sato, M.; Sato, K. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science* **2011**, *334*, 1141–1144. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Kang, C.; You, Y.; Avery, L. Dual roles of autophagy in the survival of *Caenorhabditis elegans* during starvation. *Genes Dev.* **2007**, *21*, 2161–2171. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
21. Samokhvalov, V.; Scott, B.A.; Crowder, C.M. Autophagy protects against hypoxic injury in *C. elegans*. *Autophagy* **2008**, *4*, 1034–1041. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Hashimoto, Y.; Ookuma, S.; Nishida, E. Lifespan extension by suppression of autophagy genes in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Cells* **2009**, *14*, 717–726. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Alberti, A.; Michelet, X.; Djeddi, A.; Legouis, R. The autophagosomal protein LGG-2 acts synergistically with LGG-1 in dauer formation and longevity in *C. elegans*. *Autophagy* **2010**, *6*, 622–633. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Al Rawi, S.; Louvet-Vallée, S.; Djeddi, A.; Sachse, M.; Culetto, E.; Hajjar, C.; Boyd, L.; Legouis, R.; Galy, V. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science* **2011**, *334*, 1144–1147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Manil-Ségalen, M.; Lefebvre, C.; Jenzer, C.; Trichet, M.; Boulogne, C.; Satiat-Jeunemaitre, B.; Legouis, R. The *C. elegans* LC3 acts downstream of GABARAP to degrade autophagosomes by interacting with the HOPS subunit VPS39. *Dev. Cell* **2014**, *28*, 43–55. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Kozłowski, L.; Garvis, S.; Bedet, C.; Palladino, F. The *Caenorhabditis elegans* HP1 family protein HPL-2 maintains ER homeostasis through the UPR and hormesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 5956–5961. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Ogura, K.; Wicky, C.; Magnenat, L.; Tobler, H.; Mori, I.; Müller, F.; Ohshima, Y. *Caenorhabditis elegans* unc-51 gene required for axonal elongation encodes a novel serine/threonine kinase. *Genes Dev.* **1994**, *8*, 2389–2400. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Rowland, A.M.; Richmond, J.E.; Olsen, J.G.; Hall, D.H.; Bamber, B.A. Presynaptic terminals independently regulate synaptic clustering and autophagy of GABA_A receptors in *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **2006**, *26*, 1711–1720. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Roggo, L.; Bernard, V.; Kovacs, A.L.; Rose, A.M.; Savoy, F.; Zetka, M.; Wymann, M.P.; Müller, F. Membrane transport in *Caenorhabditis elegans*: An essential role for VPS34 at the nuclear membrane. *EMBO J.* **2002**, *21*, 1673–1683. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Meléndez, A.; Hall, D.H.; Hansen, M. Monitoring the role of autophagy in *C. elegans* aging. *Methods Enzymol.* **2008**, *451*, 493–520. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Meléndez, A.; Tallóczy, Z.; Seaman, M.; Eskelinen, E.-L.; Hall, D.H.; Levine, B. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* **2003**, *301*, 1387–1391. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Jia, K.; Thomas, C.; Akbar, M.; Sun, Q.; Adams-Huet, B.; Gilpin, C.; Levine, B. Autophagy genes protect against *Salmonella typhimurium* infection and mediate insulin signaling-regulated pathogen resistance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 14564–14569. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

33. Curt, A.; Zhang, J.; Minnerly, J.; Jia, K. Intestinal autophagy activity is essential for host defense against *Salmonella typhimurium* infection in *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Comp. Immunol.* **2014**, *45*, 214–218. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Sigmond, T.; Fehér, J.; Baksa, A.; Pásti, G.; Pálfi, Z.; Takács-Vellai, K.; Kovács, J.; Vellai, T.; Kovács, A.L. Qualitative and quantitative characterization of autophagy in *Caenorhabditis elegans* by electron microscopy. *Methods Enzymol.* **2008**, *451*, 467–491. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Kumsta, C.; Chang, J.T.; Schmalz, J.; Hansen, M. Hormetic heat stress and HSF-1 induce autophagy to improve survival and proteostasis in *C. elegans*. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 14337. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Jia, K.; Levine, B. Autophagy is required for dietary restriction-mediated life span extension in *C. elegans*. *Autophagy* **2007**, *3*, 597–599. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Conradt, B.; Xue, D. Programmed Cell Death. Available online: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK19668/> (accessed on 28 June 2017).
38. Takacs-Vellai, K.; Vellai, T.; Puoti, A.; Passannante, M.; Wicky, C.; Streit, A.; Kovacs, A.L.; Müller, F. Inactivation of the autophagy gene bec-1 triggers apoptotic cell death in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **2005**, *15*, 1513–1517. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
39. Fazeli, G.; Trinkwalder, M.; Irmisch, L.; Wehman, A.M. *C. elegans* midbodies are released, phagocytosed and undergo LC3-dependent degradation independent of macroautophagy. *J. Cell Sci.* **2016**, *129*, 3721–3731. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Samara, C.; Syntichaki, P.; Tavernarakis, N. Autophagy is required for necrotic cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Cell Death Differ.* **2008**, *15*, 105–112. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
41. Gomes, L.C.; Odedra, D.; Dikic, I.; Pohl, C. Autophagy and modular restructuring of metabolism control germline tumor differentiation and proliferation in *C. elegans*. *Autophagy* **2016**, *12*, 529–546. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
42. Klionsky, D.J.; Abeliovich, H.; Agostinis, P.; Agrawal, D.K.; Aliev, G.; Askew, D.S.; Baba, M.; Baehrecke, E.H.; Bahr, B.A.; Ballabio, A.; et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **2008**, *4*, 151–175. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
43. Gosai, S.J.; Kwak, J.H.; Luke, C.J.; Long, O.S.; King, D.E.; Kovatch, K.J.; Johnston, P.A.; Shun, T.Y.; Lazo, J.S.; Perlmutter, D.H.; et al. Automated high-content live animal drug screening using *C. elegans* expressing the aggregation prone serpin α 1-antitrypsin Z. *PLoS ONE* **2010**, *5*, e15460. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Padman, B.S.; Nguyen, T.N.; Lazarou, M. Autophagosome formation and cargo sequestration in the absence of LC3/GABARAPs. *Autophagy* **2017**, *13*, 772–774. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Nishida, Y.; Arakawa, S.; Fujitani, K.; Yamaguchi, H.; Mizuta, T.; Kanaseki, T.; Komatsu, M.; Otsu, K.; Tsujimoto, Y.; Shimizu, S. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* **2009**, *461*, 654–658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Itakura, E.; Kishi-Itakura, C.; Mizushima, N. The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* **2012**, *151*, 1256–1269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Erdélyi, P.; Borsos, É.; Takács-Vellai, K.; Kovács, T.; Kovács, A.L.; Sigmond, T.; Hargitai, B.; Pásztor, L.; SenGupta, T.; Dengg, M.; et al. Shared developmental roles and transcriptional control of autophagy and apoptosis in *Caenorhabditis elegans*. *J. Cell Sci.* **2011**, *124*, 1510–1518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
48. Li, J.; Pak, S.C.; O'Reilly, L.P.; Benson, J.A.; Wang, Y.; Hidvegi, T.; Hale, P.; Dippold, C.; Ewing, M.; Silverman, G.A.; et al. Fluphenazine reduces proteotoxicity in *C. elegans* and mammalian models of alpha-1-antitrypsin deficiency. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e87260. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
49. De Duve, C. Lysosomes revisited. *Eur. J. Biochem.* **1983**, *137*, 391–397. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
50. Klionsky, D.J. Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve. *Autophagy* **2008**, *4*, 740–743. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
51. Hall, D.H.; Hartwig, E.; Nguyen, K.C.Q. Modern electron microscopy methods for *C. elegans*. *Methods Cell Biol.* **2012**, *107*, 93–149. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Palmisano, N.J.; Meléndez, A. Detection of Autophagy in *Caenorhabditis elegans* by western blotting analysis of LGG-1. *Cold Spring Harb. Protoc.* **2016**, *2016*, pdb.prot086512. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Lu, Q.; Wu, F.; Zhang, H. Aggrephagy: Lessons from *C. elegans*. *Biochem. J.* **2013**, *452*, 381–390. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

54. Visvikis, O.; Ihuegbu, N.; Labeled, S.A.; Luhachack, L.G.; Alves, A.-M.F.; Wollenberg, A.C.; Stuart, L.M.; Stormo, G.D.; Irazoqui, J.E. Innate host defense requires TFEB-mediated transcription of cytoprotective and antimicrobial genes. *Immunity* **2014**, *40*, 896–909. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Li, J.; Huang, K.; Le, W. Establishing a novel *C. elegans* model to investigate the role of autophagy in amyotrophic lateral sclerosis. *Acta Pharmacol. Sin.* **2013**, *34*, 644–650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Lapierre, L.R.; De Magalhaes Filho, C.D.; McQuary, P.R.; Chu, C.-C.; Visvikis, O.; Chang, J.T.; Gelino, S.; Ong, B.; Davis, A.E.; Irazoqui, J.E.; et al. The TFEB orthologue HLH-30 regulates autophagy and modulates longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Commun.* **2013**, *4*, 2267. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Settembre, C.; De Cegli, R.; Mansueto, G.; Saha, P.K.; Vetrini, F.; Visvikis, O.; Huynh, T.; Carissimo, A.; Palmer, D.; Klisch, T.J.; et al. TFEB controls cellular lipid metabolism through a starvation-induced autoregulatory loop. *Nat. Cell Biol.* **2013**, *15*, 647–658. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
58. Cheng, S.; Wu, Y.; Lu, Q.; Yan, J.; Zhang, H.; Wang, X. Autophagy genes coordinate with the class II PI/PtdIns 3-kinase PIKI-1 to regulate apoptotic cell clearance in *C. elegans*. *Autophagy* **2013**, *9*, 2022–2032. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
59. Qadota, H.; Inoue, M.; Hikita, T.; Köppen, M.; Hardin, J.D.; Amano, M.; Moerman, D.G.; Kaibuchi, K. Establishment of a tissue-specific RNAi system in *C. elegans*. *Gene* **2007**, *400*, 166–173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
60. Rand, J.B.; Johnson, C.D. Genetic pharmacology: Interactions between drugs and gene products in *Caenorhabditis elegans*. *Methods Cell Biol.* **1995**, *48*, 187–204. [[PubMed](#)]
61. Morselli, E.; Maiuri, M.C.; Markaki, M.; Megalou, E.; Pasparaki, A.; Palikaras, K.; Criollo, A.; Galluzzi, L.; Malik, S.A.; Vitale, I.; et al. Caloric restriction and resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy. *Cell Death Dis.* **2010**, *1*, e10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
62. Morselli, E.; Mariño, G.; Bernetzen, M.V.; Eisenberg, T.; Megalou, E.; Schroeder, S.; Cabrera, S.; Bénit, P.; Rustin, P.; Criollo, A.; et al. Spermidine and resveratrol induce autophagy by distinct pathways converging on the acetylproteome. *J. Cell Biol.* **2011**, *192*, 615–629. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
63. Klionsky, D.J.; Abdelmohsen, K.; Abe, A.; Abedin, M.J.; Abeliovich, H.; Acevedo Arozena, A.; Adachi, H.; Adams, C.M.; Adams, P.D.; Adeli, K.; et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **2016**, *12*, 1–222. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
64. Saha, S.; Ash, P.E.A.; Gowda, V.; Liu, L.; Shirihai, O.; Wolozin, B. Mutations in LRRK2 potentiate age-related impairment of autophagic flux. *Mol. Neurodegener.* **2015**, *10*, 26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
65. Schiavi, A.; Maglioni, S.; Palikaras, K.; Shaik, A.; Strappazon, F.; Brinkmann, V.; Torgovnick, A.; Castelein, N.; De Henau, S.; Braeckman, B.P.; et al. Iron-starvation-induced mitophagy mediates lifespan extension upon mitochondrial stress in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **2015**, *25*, 1810–1822. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Palikaras, K.; Lionaki, E.; Tavernarakis, N. Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature* **2015**, *521*, 525–528. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Galluzzi, L.; Baehrecke, E.H.; Ballabio, A.; Boya, P.; Bravo-San Pedro, J.M.; Cecconi, F.; Choi, A.M.; Chu, C.T.; Codogno, P.; Colombo, M.I.; et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J.* **2017**, *36*, 1811–1836. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
68. Hird, S.N.; Paulsen, J.E.; Strome, S. Segregation of germ granules in living *Caenorhabditis elegans* embryos: Cell-type-specific mechanisms for cytoplasmic localisation. *Development (Camb. Engl.)* **1996**, *122*, 1303–1312.
69. Morfini, G.; Pigino, G.; Brady, S.T. Polyglutamine expansion diseases: Failing to deliver. *Trends Mol. Med.* **2005**, *11*, 64–70. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
70. Goldberg, A.L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. *Nature* **2003**, *426*, 895–899. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
71. Ravikumar, B.; Duden, R.; Rubinsztein, D.C. Aggregate-prone proteins with polyglutamine and polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum. Mol. Genet.* **2002**, *11*, 1107–1117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
72. Satyal, S.H.; Schmidt, E.; Kitagawa, K.; Sondheimer, N.; Lindquist, S.; Kramer, J.M.; Morimoto, R.I. Polyglutamine aggregates alter protein folding homeostasis in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2000**, *97*, 5750–5755. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
73. Morley, J.F.; Brignull, H.R.; Weyers, J.J.; Morimoto, R.I. The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 10417–10422. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
74. Faber, P.W.; Alter, J.R.; MacDonald, M.E.; Hart, A.C. Polyglutamine-mediated dysfunction and apoptotic death of a *Caenorhabditis elegans* sensory neuron. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1999**, *96*, 179–184. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

75. Shin, B.H.; Lim, Y.; Oh, H.J.; Park, S.M.; Lee, S.-K.; Ahnn, J.; Kim, D.H.; Song, W.K.; Kwak, T.H.; Park, W.J. Pharmacological activation of Sirt1 ameliorates polyglutamine-induced toxicity through the regulation of autophagy. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e64953. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
76. Melentijevic, I.; Toth, M.L.; Arnold, M.L.; Guasp, R.J.; Harinath, G.; Nguyen, K.C.; Taub, D.; Parker, J.A.; Neri, C.; Gabel, C.V.; et al. *C. elegans* neurons jettison protein aggregates and mitochondria under neurotoxic stress. *Nature* **2017**, *542*, 367–371. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
77. Jia, K.; Hart, A.C.; Levine, B. Autophagy genes protect against disease caused by polyglutamine expansion proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy* **2007**, *3*, 21–25. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
78. Khan, L.A.; Yamanaka, T.; Nukina, N. Genetic impairment of autophagy intensifies expanded polyglutamine toxicity in *Caenorhabditis elegans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2008**, *368*, 729–735. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
79. Birky, C.W. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: Laws, mechanisms, and models. *Annu. Rev. Genet.* **2001**, *35*, 125–148. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
80. Ward, S.; Roberts, T.M.; Strome, S.; Pavalko, F.M.; Hogan, E. Monoclonal antibodies that recognize a polypeptide antigenic determinant shared by multiple *Caenorhabditis elegans* sperm-specific proteins. *J. Cell Biol.* **1986**, *102*, 1778–1786. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
81. Okamoto, H.; Thomson, J.N. Monoclonal antibodies which distinguish certain classes of neuronal and supporting cells in the nervous tissue of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *J. Neurosci.* **1985**, *5*, 643–653. [[PubMed](#)]
82. Zhou, Q.; Li, H.; Li, H.; Nakagawa, A.; Lin, J.L.J.; Lee, E.-S.; Harry, B.L.; Skeen-Gaar, R.R.; Suehiro, Y.; William, D.; et al. Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. *Science* **2016**, *353*, 394–399. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
83. Tsang, W.Y.; Lemire, B.D. Stable heteroplasmy but differential inheritance of a large mitochondrial DNA deletion in nematodes. *Biochem. Cell Biol.* **2002**, *80*, 645–654. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
84. Wei, Y.; Chiang, W.-C.; Sumpter, R.; Mishra, P.; Levine, B. Prohibitin 2 is an inner mitochondrial membrane mitophagy receptor. *Cell* **2017**, *168*, 224–238. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
85. Al Rawi, S.; Louvet-Vallée, S.; Djeddi, A.; Sachse, M.; Culetto, E.; Hajjar, C.; Boyd, L.; Legouis, R.; Galy, V. Allophagy: A macroautophagic process degrading spermatozoid-inherited organelles. *Autophagy* **2012**, *8*, 421–423. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
86. Fang, E.F.; Waltz, T.B.; Kassahun, H.; Lu, Q.; Kerr, J.S.; Morevati, M.; Fivenson, E.M.; Wollman, B.N.; Marosi, K.; Wilson, M.A.; et al. Tomatidine enhances lifespan and healthspan in *C. elegans* through mitophagy induction via the SKN-1/Nrf2 pathway. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 46208. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
87. De Duve, C.; Wattiaux, R. Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* **1966**, *28*, 435–492. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Twig, G.; Elorza, A.; Molina, A.J.A.; Mohamed, H.; Wikstrom, J.D.; Walzer, G.; Stiles, L.; Haigh, S.E.; Katz, S.; Las, G.; et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* **2008**, *27*, 433–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
89. Yamashita, S.-I.; Kanki, T. How autophagy eats large mitochondria: Autophagosome formation coupled with mitochondrial fragmentation. *Autophagy* **2017**, *13*, 980–981. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Ackema, K.B.; Hench, J.; Böckler, S.; Wang, S.C.; Sauder, U.; Mergentaler, H.; Westermann, B.; Bard, F.; Frank, S.; Spang, A. The small GTPase Arf1 modulates mitochondrial morphology and function. *EMBO J.* **2014**, *33*, 2659–2675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
91. Ryu, D.; Mouchiroud, L.; Andreux, P.A.; Katsyuba, E.; Moullan, N.; Nicolet-Dit-Félix, A.A.; Williams, E.G.; Jha, P.; Lo Sasso, G.; Huzard, D.; et al. Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents. *Nat. Med.* **2016**, *22*, 879–888. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
92. Hollville, E.; Carroll, R.G.; Cullen, S.P.; Martin, S.J. Bcl-2 family proteins participate in mitochondrial quality control by regulating Parkin/PINK1-dependent mitophagy. *Mol. Cell* **2014**, *55*, 451–466. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
93. Narendra, D.; Tanaka, A.; Suen, D.-F.; Youle, R.J. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* **2008**, *183*, 795–803. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



Problématique

Notre équipe s'intéresse depuis de nombreuses années aux rôles physiologiques de l'autophagie au cours du développement d'un organisme pluricellulaire. La complexité des mécanismes autophagique contrôlant la spécificité des cargos à dégrader a suscité dans la communauté scientifique un engouement certain afin d'en améliorer les connaissances.

La sélectivité de l'autophagie met en jeu la protéine Atg8/LC3 via son interaction avec des récepteurs afin de moduler la dégradation de cargos spécifiques comme les mitochondries ou le réticulum endoplasmique par exemple. Les récents travaux de recherche réalisés dans l'équipe nous ont conduit à étudier les rôles de LGG-1 et LGG-2 (homologues respectivement des membres de la famille GABARAP et LC3) dans des processus de sélectivité, nous permettant d'identifier des rôles différentiels pour ces deux protéines notamment lors de la dégradation des mitochondries maternelles (allophagie) ou de la phagocytose. De nombreuses études ont révélé que l'autophagie intervenait dans des fonctions très diverses dans la physiologie et la pathologie. Les recherches actuelles sur l'autophagie montrent que cette voie est cruciale pour plusieurs processus développementaux. Cependant, les connaissances sur les mécanismes cellulaires, les cibles et les récepteurs de l'autophagie dans ces processus restent encore incomplètes.

Cette quête de compréhension de ces mécanismes d'autophagie sélective et la découverte récente de plusieurs récepteurs impliqués dans la RE-phagie nous a conduits à essayer de mettre en évidence pour la première fois chez *C.elegans* de l'ER-phagie. Plusieurs des récepteurs connus étant des réticulons ou des reticulon-like, nous nous sommes intéressé au seul locus réticulon chez *C. elegans* : *ret-1*. Le peu de connaissance sur ce gène, associé au fait qu'une approche visant à identifier des interacteurs de LGG-1 et LGG-2 menée au laboratoire l'a identifié comme un bon candidat, nous a conduits à la caractérisation de ce locus. Mon projet de thèse s'articulait autour de deux questions majeures :

Quels peuvent être les rôles physiologiques de RET-1 et la spécificité associée à ses nombreuses isoformes ?

RET-1 est-il un récepteur de l'autophagie et peut-on mettre en évidence de la RE-phagie chez *C. elegans* ?

Résultats

J'ai décidé de présenter les résultats obtenus au cours de ma thèse en trois parties. Tout d'abord, les résultats que j'ai obtenus s'intégrant dans la problématique de recherche telle que présentée dans l'introduction ont conduit à la rédaction d'un manuscrit inséré ci-après, intitulé « *Short isoforms of reticulon protein ret-1/rtn4 are involved in the shaping of ER-tubules network but not in autophagosome biogenesis in C.elegans.* ». La partie I correspondant à mes résultats principaux, seront introduits par un résumé de mes principales conclusions, suivi par le manuscrit que nous allons soumettre prochainement. Ensuite, dans une seconde partie, je présenterai les approches complémentaires, conduites au cours de cette étude et n'ayant pas été intégrées en l'état dans le manuscrit. Enfin, dans une dernière partie, je vous présenterai ma contribution à un projet de l'équipe concernant le lien entre autophagie et phagocytose des corps apoptotique dans l'embryon de *C. elegans*. Ces travaux ont d'ores et déjà été valorisés par une publication dans la revue « Autophagy », intitulée « *Autophagy mediates phosphatidylserine exposure and phagosome degradation during apoptosis through specific functions of GABARAP/LGG-1 and LC3/LGG-2.* », Je vous en présenterai les principaux résultats ainsi que les questions biologiques auxquelles ils ont permis de répondre.

Partie I : Les isoformes courtes de RET-1, protéine de la famille des réticulons, sont impliquées dans la mise en forme du réseau de tubules de RE, mais pas dans la biogénèse des autophagosomes chez *C. elegans*

Dans cette étude, nous avons choisi d'étudier le locus *ret-1* et les différentes isoformes de RET-1, et de mieux comprendre leurs rôles au sein du réticulum endoplasmique. Les réticulons, par leur rôle d'induire et de stabiliser les tubules de RE, participent à l'organisation tridimensionnelle du RE, et *ret-1* est le seul gène de réticulon présent chez *C. elegans*. En outre, il a récemment été montré que les isoformes longues de RTN3 ont un rôle de récepteur de la RE-phagie des tubules (Grumati *et al*, 2017). Le RE étant par ailleurs le site préférentiel de nucléation du phagophore et donc de l'initiation de l'autophagie, nous avons décidé d'étudier les relations entre RET-1, le réticulum endoplasmique, et l'autophagie.

a. Les isoformes courtes sont les plus exprimées

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à caractériser le locus *ret-1*. Nous avons analysé, sur la base des données présentes sur Wormbase ainsi que celles issues de la méta-analyse du transcriptome réalisée par l'équipe de Denis Dupuy, les différents transcrits et isoformes exprimées. Nous avons utilisé un anticorps polyclonal reconnaissant l'isoforme B

(majoritairement composée du RHD) afin de détecter les différentes isoformes par Western blot. Combinées, ces données nous ont permis d'estimer la proportion des isoformes exprimées sur des populations de vers tous stades. Ainsi, les isoformes les plus exprimées sont les isoformes courtes A et B, ainsi que l'isoforme G, traduite à partir de plusieurs transcrits. Les isoformes les plus longues, les isoformes C, sont prédites très minoritaires et n'ont pas pu être détectées par WB, et les isoformes intermédiaires d sont exprimées modérément. Ces résultats ont permis de mettre en évidence l'expression de différentes classes d'isoformes de RET-1, détectées à des tailles similaires aux tailles prédites, excepté les isoformes les plus longues C, ceci étant probablement dû à la corrélation entre la grande taille de 363 kDa et la faible expression de cette isoforme.

- b. Les isoformes longues C sont exprimées dans les muscles du corps alors que les isoformes intermédiaires D sont majoritairement exprimées dans les neurones.

Par insertion de la GFP par la technologie CRISPR-Cas9 dans des exons spécifiques des isoformes c et d, ou dans un exon commun à toutes les isoformes de RET-1, nous avons pu en établir pour la première fois les profils d'expression des différentes isoformes. Chez l'adulte, RET-1 (toutes isoformes) est présent dans tous les tissus, et au cours du développement à tous les stades embryonnaires et larvaires. L'expression de l'isoforme C est restreinte aux cellules musculaires, chez la larve et l'adulte. L'isoforme D est exprimée fortement dans les neurones, ainsi que dans l'intestin, l'épiderme et les cellules musculaires chez les larves et adultes, et au cours du développement embryonnaire, dans les précurseurs des neurones.

- c. RET-1 est enrichi dans les tubules de RE

En complément des patrons d'expression des isoformes de RET-1, nous avons déterminé la localisation subcellulaire de RET-1, notamment la répartition du signal RET-1 au cours de la division cellulaire. RET-1 colocalise avec un marqueur de la membrane du RE, GFP::SP12, confirmant sa localisation au RE. Il est cependant absent de l'enveloppe nucléaire. Le RE, et donc le signal correspondant à RET-1, change de morphologie au cours du cycle cellulaire. En interphase, il est majoritairement constitué de fins tubules formant un réseau relativement dense. Au cours de la mitose, les tubules deviennent moins nombreux et plus épais, le réseau moins dense, et le RE au contact du noyau et de la membrane plasmique s'étend sous forme de patches. Ceci peut correspondre à des feuillettes de RE ou bien à une matrice très dense de tubules, notre

approche par imagerie confocale ne nous permettant pas de trancher. On observe également un enrichissement du signal RET-1 autour des centrosomes et du fuseau mitotique en mitose.

Si les signaux correspondant à RET-1 et à GFP::SP12 collocalisent globalement, on peut observer des différences. Le signal RET-1 apparaît plus homogène dans le réseau de tubules : les tubules et les jonctions entre ceux-ci sont bien définis. Le signal GFP::SP12 semble plus hétérogène et moins visible dans les tubules, et plus fort au niveau des jonctions. Nous avons quantifié les intensités aux tubules et aux jonctions des deux signaux pour établir que RET-1 est enrichi aux tubules de RE, de façon cohérente avec les données sur de nombreux réticulons chez d'autres espèces.

d. Les isoformes courtes de RET-1 sont nécessaires au maintien du réseau de tubule de RE

Dans le mutant *ret-1* on observe une augmentation drastique de structures en forme d'anneau dans le réseau de RE. L'analyse tridimensionnelle à partir de plans successifs révèle une organisation sphérique du réseau. L'analyse tridimensionnelle à partir de plans successifs révèle une organisation sphérique du réseau. L'utilisation d'un marqueur luménal du RE (anticorps anti-HDEL) montre qu'il ne s'agit pas de citernes. Comme seules les isoformes courtes de RET-1 ont pu être détectées dans les embryons précoces, cela suggère fortement que ces isoformes sont impliquées dans l'organisation tubulaire du RE.

e. Les isoformes courtes de RET-1 ne sont pas impliquées dans la biogénèse des autophagosomes

Par des approches d'immunolocalisation ou d'observation *in vivo* de protéines de fusion, nous avons observé les localisations du RE et des autophagosomes afin d'en étudier les liens. Nous avons distingué deux types de répartition des signaux lorsque ceux-ci se recouvrent : la colocalisation, lorsque les localisations du centre des deux objets correspondent, et la codistribution, correspondant à des signaux partiellement recouvrant, les centres des objets étant alors proches mais distincts. Des événements de colocalisation et de codistribution ont pu être régulièrement observés, toujours de manière minoritaire. Ces observations nous ont conduits à envisager un lien entre RE, RET-1 et biogénèse des autophagosomes.

Afin de déterminer si RET-1 a une fonction dans la biogénèse des autophagosomes, nous avons quantifié le nombre d'autophagosomes dans les embryons précoces en condition mutante pour *ret-1* et en condition contrôle, et aucune différence significative n'a été observée. Le nombre d'évènements de colocalisation entre LGG-1 et le RE (marqué par GFP::SP12) n'est pas affecté

par la déplétion en RET-1. Afin d'induire l'autophagie, nous avons fait subir aux embryons un choc thermique avant de conduire une approche d'immunomarquage. Dans cette condition, le nombre d'autophagosomes et d'événements de colocalisation entre RE et LGG-1 augmente de manière similaire en condition contrôle ou mutante pour *ret-1*.

Enfin, afin d'apprécier plus précisément la répartition des autophagosomes vis-à-vis du RE dans les embryons dans ces différentes conditions, nous avons mesuré la distance entre le centre des autophagosomes et le RE. Cette distance est similaire dans les embryons *wild type* et mutants *ret-1*, après *heatshock* ou non. De plus, la comparaison avec la distance entre RE et des points aléatoirement répartis dans le cytoplasme, plus grande dans toutes ces conditions, montre que la répartition des autophagosomes par rapport au RE n'est pas aléatoire. Cette répartition des autophagosomes par rapport au RE n'est pas affectée par la déplétion en RET-1. Par déduction de l'expression des isoformes intermédiaires et longues, absentes de l'embryon précoce, nous avons conclu que les isoformes courtes de RET-1 ne sont pas impliquées dans la biogénèse des autophagosomes, en condition basale comme en condition d'induction.

Manuscript

Short isoforms of reticulon protein *ret-1/rtn4* are involved in the shaping of ER-tubules network but not in autophagosome biogenesis in *C. elegans*.

Short isoforms of reticulon protein *ret-1/rtn4* are involved in the shaping of ER-tubules network but not in autophagosome biogenesis in *C. elegans*.

Vincent Scarcelli¹, Denis Dupuy², Renaud Legouis^{1*} and Christophe Lefebvre^{1*}

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

² Université de Bordeaux, Inserm U1212, CNRS UMR5320, Institut Européen de Chimie et Biologie (IECB), 33607 Pessac, France

* Equal participation

Correspondence: Christophe Lefebvre christophe.lefebvre@i2bc.paris-saclay.fr

short title: RET-1 is involved in ER-tubule shaping *in C. elegans*

Keywords: reticulum endoplasmic, reticulon, RET-1, LGG-1, autophagosomes, ER-phagy

Abstract

The endoplasmic reticulum (ER) is a contiguous network of interconnected sheets and tubules forming distinct domains that spread from nuclear envelope to the cell cortex including perinuclear and peripheral ER. Several proteins play an important role in shaping and organizing the endoplasmic reticulum network, including a reticulon family proteins as RTN4/Nogo-A that generate and maintain tubule structure. In mammalian cell, in stress conditions, the different domains of ER are degraded by a selective autophagy (ER-phagy), mediated by specific reticulon receptor as FAM134B or RTN3L. The presence of multiple isoforms of reticulon may suggest a specific spatio-temporal expression pattern depending on the needs of different cell types. Here, we characterize the locus of the only reticulon gene in *C. elegans*, *ret-1* and show the specificity of expression of the three categories of isoforms. The long and intermediate isoforms are expressed in muscle cells and neurons respectively, while the short RET-1 isoforms are ubiquitous and the only isoforms expressed in early embryos. Because the RET-1 depletion leads to the increase of abnormal ring ER structure, we show that short isoforms are necessary for the establishment of the tubular ER network but are not involved in the biogenesis of autophagosomes in embryos. Our results highlight that the distribution of autophagosomes in the cell embryos is not random and closely associated with the ER network.

Introduction

The endoplasmic reticulum (ER) is the largest membranous structure in eukaryotic cells. ER endorse several functions in the cell, main ones being the synthesis of secretory and membrane proteins, biosynthesis of lipids, and the regulation of calcium homeostasis. The ER forms a continuous membrane compartment from the nuclear envelope to the outer periphery of the cell, throughout the cytosol commonly called perinuclear ER and peripheral ER respectively. The peripheral ER corresponds to a complex network of interconnected tubules and sheets, localized throughout the cytoplasm and closed to the plasma membrane called usually cortical ER. (Shemesh et al., 2014; Shibata et al., 2010). During long time, the structure of the peripheral ER was qualified as tubules and sheets but, recently, combination of super-resolution technologies revealed that some previously thought flat sheets correspond to dense tubular matrices (Nixon-Abell et al., 2016). The ER is an organelle extremely dynamic whose shape is remodeled according to the needs of the cell. For example, in most cell types the ER network undergoes drastic changes of organization during cell cycle progression, shifting from an interphasic mainly ER network of thin tubules to a majority of sheets or dense tubule matrices during mitosis (Bobinnec et al., 2003; Poteryaev et al., 2005). ER is able to form transient contact sites with other organelles (for review: Wu et al., 2018). The contact sites formed with different organelles, as ER-Mitochondria (Friedman et al., 2011; Hamasaki et al., 2013; Zhao et al., 2017), ER-Lipid Droplet (Grippa et al., 2015; Salo et al., 2016; Wang et al., 2014, 2016) or ER-Plasma Membrane (Chung et al., 2015; Giordano et al., 2013; Wu et al., 2017) for example, are different and contain specific sets of proteins. The particular structures are involved in the regulation of organelle distribution and division, lipid and ion transfer. Dynamic reorganization of the ER structure thus emerges as a mechanism for modulating peripheral ER function. The contact sites between ER and PM, as well as ER-mitochondria,

has been shown to be a very important process for the biogenesis of autophagosomes (Hamasaki et al., 2013; Molino et al., 2017; Nascimbeni et al., 2017) constituting a strong link between ER and autophagy.

The macro-autophagy pathway (hereafter referred to as autophagy) is a degradative system of cellular components (Mizushima et al., 2008; Reggiori and Klionsky, 2002; Yoshimori, 2004). ER being the largest membrane reservoir, it participates to the formation of phagophores, becoming autophagosomes after enclosure (Kotani et al., 2018; Suzuki and Ohsumi, 2010). While direct involvement of the ER in this process usually takes place in specific compartments of the ER called omegasomes, the systematic involvement of these omegasomes in phagophore formation is not proven. The ER is thus involved in the initiation of the formation of autophagosome, and it can itself be the target of selective autophagy, ER-phagy.

Several proteins play an important role in the shaping and the organization of the ER network, among them the GTPase atlastin and Sey1 involved in the fusion of ER membranes (Hu et al., 2015), or CLIMP-63 that stabilizes ER sheets (Shibata et al., 2010). The reticulon family and reticulon-related proteins are particularly important for generating and maintaining the structure of ER-tubules (Shibata et al., 2010; Voeltz et al., 2006). Reticulon proteins localize mainly at ER membrane and are characterized by a C-terminal reticulon homology domain (RHD) of 150-200 amino acids, consisting of two hydrophobic regions separated by a 66 amino acid hydrophobic loop. The RHD adopts a hairpin-like W-topology within the membrane (Breeze et al., 2016), establishing a positive membrane curvature (Zurek et al., 2011). Additionally, recently highlighted amphipathic helix (APH) at the C-terminus is thought to provide additional stabilization (Breeze et al., 2016). Although the C-terminal RHD is well conserved in all species, the N-terminal domains are highly variable in sizes and sequences from a few to over a thousand amino acids. While in urochordates, only a single bona fide *rtn* gene is described, in mammals, four independent reticulon genes, *rtn1*, *rtn2*, *rtn3*, *rtn4/nogo*,

each encoding for several isoforms through alternative splicing sites and various promoters (Oertle et al., 2003). Alternative splicing and use of different promoters correlate with different expression patterns. For example, the human RTN2-B is localized in the nervous system, RTN2-C is expressed strongly in skeletal muscles (Geisler et al., 1998; Roebroek et al., 1998). In rat, RTN4/NOGO-A is mainly expressed in neurons, and has an effect on neuronal outgrowth (Huber et al., 2002). RTN4A and B expression are detected in cultured epithelial cells, fibroblasts, and neurons (Rämö et al., 2016). In mouse, a short isoform of RTN3 is expressed very strongly in the cortex, and is found in the lungs, liver, eye, ovary and testis, but is absent from the heart and the skeletal muscles (Shi et al., 2014).

Interestingly, isoforms of reticulon have been recently involved in ER-phagy. Critical compounds of selective autophagy are receptors, able to interact with the ubiquitin like protein Atg8/LC3 in yeast or mammalian and linked to the cargo to be degraded. The literature on the topic of receptors shows that their location is correlated with what they are able to degrade. Upon stress fragments of ER are addressed into nascent autophagosomes by reticulon via autophagic proteins. In yeast, ER-phagy is induced by starvation or treatment with rapamycin. This process requires Atg40, reticulon-like protein, localized to the peripheral ER. Recent work on resident ER proteins that bind to mammalian Atg8 proteins has revealed that ER-phagy involves different specific receptors for different ER subdomains or stresses. FAM134B and RTN3 participate in remodeling the ER network by selective elimination of specific domains of ER (Chen et al., 2019; Grumati et al., 2017; Khaminets et al., 2015). Interestingly, three of identified ER-phagy receptors are reticulons or RHD containing proteins. Atg40, localized at the cortical and cytoplasmic ER, is essential for ER subdomains elimination via autophagosomes (Mochida et al., 2015). In mammals, FAM134B, member of the RHD containing family FAM134, is localized at the edge of the ER sheets. It binds to MAPLC3 via its LIR (LC3 Interacting Region) and leads fragmented ER sheets into nascent autophagosomes.

Depletion of FAM134B causes the ER sheets to expand abnormally (Khaminets et al., 2015). More recently, it has been shown that RTN3 long isoform (RTN3L) binds, independently of FAM134B, to LC3 and GABARAP for mediating the ER-phagy of tubules (Grumati et al., 2017). Clustering of homodimers of RTN3L leads to the fragmentation of ER tubules and subsequently to their degradation by ER-phagy. RTN3 study suggests important differences in the functions of reticulon isoforms. Notably, most of the studies highlighting ER-phagy have been performed in stresses or starvation conditions. It appears essential to better understand and characterize ER-phagy and the involvement of reticulons in physiological conditions and in a whole animal. Given the variety of reticulon isoforms, the specificity of ER-phagy involving reticulons is yet largely unknown.

With only one reticulon locus, *ret-1*, *Caenorhabditis elegans* is a promising model to analyze the specific functions of its various isoforms. However, the locus is poorly documented and RET-1 expression has not been fully characterized yet. One study suggests the existence of one RET-1 isoform expressed specifically in neurons (Torpe et al., 2017). Here we first deepen the analysis of the *ret-1* locus and show the specificity of expression of three categories of isoforms. Long and intermediate isoforms are expressed in muscle cells and neurons respectively. Short isoforms, ubiquitous and expressed at all stages, are required for the correct shaping of ER tubule network. We also explored the link between RET-1 and autophagy in embryos. Our data highlight that the distribution of autophagosomes in the cell is not random but closely associated with ER network. We show here that the short isoforms are necessary to maintain the integrity of tubule organization and the depletion does not block the autophagosome biogenesis in embryos.

Results

1. The short isoforms of *ret-1* locus are major forms.

According to Wormbase (WS269; <https://wormbase.org/>), the *ret-1* locus, extended over 18 kpb, is composed of 13 exons, which from alternative splicing and differential promoters encode at least 8 predicted isoforms that range from 204 to 3303 amino acids.

To explore the relative quantification of *ret-1* isoforms, we first performed a bioinformatics analysis (FIG 1A and S1A-B). We used the wealth of accumulated RNA-seq data to generate a compendium of qualitative measurements of alternative splicing of all *C. elegans* genes (Tourasse et al., 2017). We performed the quantitative visualization of splice-sites usage of *ret-1* locus. This analysis indicates that there would be 6 transcription initiation sites and an alternative splicing event for exon 5. This approach led us to determine 3 categories of transcript corresponding to short, intermediated and long isoforms: the short one corresponding to the isoforms A, B and E, the intermediated to isoforms G1, G2, D1 and D2, and long isoforms C and F (FIG S1A and B). (FIG S1), The short isoforms are essentially composed by RHD, based on the number of reads, A and B are largely majority (21% and 33% respectively) while E are minority (3%). We identified by this approach the possibility of another isoform D called D2 containing the exon 5 in addition to the D predicted form. These isoforms are weakly expressed (6% of total reads). The long isoform C seems to be very minority (0,5%), raising the possibility that such an isoform could be mainly background signal resulting from a transcriptional leak. Based on this analysis, *ret-1* locus would encode a series of putative proteins with apparent molecular weights ranging from 22 kDa to 360 kDa.

To check if those predicted proteins are really expressed, we performed western blot analysis using an antibody directed against the RHD domain present in C-terminus of all forms (Audhya et al., 2007; Gerstein et al., 2010; Torpe et al., 2017) (FIG 1B). The specificity of results was

validated using the deletion mutant *ret-1(tm390)* which removes part of the RHD and results in a premature stop codon and affecting all isoforms (FIG 1B). We compared total protein extracts from a mixed stage populations of wild-type or *ret-1* mutant animals. Three main molecular weights were detected. The first band corresponds to 20kDa representing about 65% of total signal. A second band was detected around 60kDa corresponding to 24% of total among of specific signal. The last band around 70kDa represents 12% of total signal. The apparent molecular weight and the amount of each bands correlate very well with the isoforms predicted by our quantitative bioinformatics approach (FIG Sup1). The lower band corresponds to A, B and E short isoforms, the second one to G isoforms and the higher corresponds to D isoforms. However, no higher isoforms could be detected.

To further confirm the specificity of RET-1 isoforms, we performed a CRISPR-Cas9 approach to generate various GFP tagged proteins and deletion mutants (FIG 1A and 1C). We generated 3 different GFP-fusions on the *ret-1* locus. The insertion of the GFP at the C-terminus of *ret-1* was designed to tag all RET-1 isoforms is hereafter referred as panRET-1::GFP. The insertion of GFP at the beginning of exon 4 is specific of isoforms C and D and named GFP::RET-1CD. The last insertion, in exon 2, was designed to specifically tag the long RET-1C isoform (GFP::RET1C). By these CRISPR approaches we also generated the specific mutants in RET-1C *ret-1(pp103)* and RET-1CD *ret-1(pp130)* corresponding of a 50 bp deletion in exon 2 and insertion of 125 bp in exon 4 respectively, leading to a frame shift and a premature stop codon (See Material and Methods).

The western blot analysis of the expression of tagged proteins is presented in figure 1D. The expression of GFP specific isoforms in each strain was analyzed using the anti GFP or anti RET-1 antibodies. panRET-1::GFP extract (figure 1D, line 1) revealed 3 shifted bands to 50 kDa, 80kDa at 90Kda. This data demonstrate the existence of A, B, E, G and D isoforms. We were not able to detect the GFP::RET-1C. The GFP::RET-1CD extract revealed a shift of the

RET-1D isoforms and the maintenance of A, B, E, and G isoforms (figure 1D, line 2). This result is confirmed by the disappearance of this band in the mutant *ret-1(pp130)*. Isoform C is still not detected. We also characterized the two new mutants from CRIPSR-cas9 strategy. Protein extracts from *ret-1c(pp103) ret-1cd(pp130)* also confirm the identity of the RET-1D isoforms. All together, these results show that the *ret-1* locus encodes at least 6 isoforms. The short and abundant A, B, E, the intermediate G and D1/D2. No RET-1C specific isoform could be detected possibly due to a low expression and the high molecular weight. Moreover, the description on RNA sequences suggest an alternative 12 nucleotides insertion in exon 12 raises the possibility of supplementary isoforms (asterisk in FIG1A).

2. RET-1 short isoforms are ubiquitous while RET-1D is enriched in neurons and RET-1C restricted to the muscle.

To investigate whether the various RET-1 isoforms could display a tissue or stage specificity, we perform *in vivo* analysis of GFP constructs and immunofluorescence analysis. Because all GFP have been inserted in the endogenous *ret-1* locus, they should reflect the level of expression of the different promoters.

The analysis was first performed on adult worms to visualize all somatic differentiated tissues and the germ cells (FIG 2A-F" and S2A-D). panRET-1::GFP is strongly detected in all cells indicating that RET-1 is ubiquitously expressed. The signal describes a meshwork that varies according to the cell types, consistent with global ER network and probably SR muscle localization. In GFP::RET-1C animals, the GFP signal is very weak and could be detected and restricted to the body wall muscle cells (BWM) (Figure 2C, F-F "). C isoform pattern in BWM shows that this isoform is localized in cytoplasm and sarcoplasm close to the basal membrane of muscle cell and along the dense body (anchorage structure of actin filaments) (FIG S2 A and D). In worms expressing both the isoforms C and D (GFP::RET-1CD), the signal of the isoform

D is highly detected in neurons and more weakly in the hypoderm, the intestine and probably the muscle cells (FIG 2B, E-E " and S2B). The RET-1C is weakly expressed and restricted to the muscle while RET-1D is mainly expressed in neurons and short isoforms of RET-1 are ubiquitous.

In larvae, no obvious differences with expression in adults were observed (data not shown). PanRET-1::GFP is ubiquitous and the signal of GFP::RET-1C and CD confirm the results obtained in adults. However, analysis of embryos revealed differences. PanRET-1::GFP is detected as soon as 1 cell stage (FIG 1G-J) while GFP::RET-1C does not appear to be expressed in the embryo (FIG. 1K and S2E-E') and RET-1D is expressed only at the onset of neuron differentiation (FIG. 1L-M and S2F-G'). Similarly to the signal in adult tissues, in the embryo the signal of RET-1 describes a meshwork consistent with ER network. Our present data on C and D and those Torpe and colleagues on G strongly support that early embryos only express the short RET-1 isoforms.

Our data are the first evidence that RET-1 isoforms are differently expressed according to tissue type and developmental stage.

3. RET-1 is enriched in ER-tubules.

We then ask whether RET-1 is homogeneously distributed in the ER. To characterize the subcellular localization of RET-1, we focused on the early embryos which presents large cells and checked first that RET-1 antibody and GFP fusion localize similarly (FIG 2, 3 and S3). We checked whether RET-1, localized to ER-network, by colocalization analysis with GFP::SP12 or SCA-1::GFP, a SERCA calcium channel, both markers of the ER membrane (Audhya et al., 2007; Zwaal et al., 2001). Both staining of RET-1 and GFP::SP12 or SCA-1 appeared strongly colocalized, confirming the ER localization of RET-1 (FIG 3A-D). First, RET-1 is localized in the peripheral-ER and excluded from the perinuclear-ER as previously

described in one cell stage by Audhya and colleagues. RET-1 is present in a network of fine tubules and patch structures dispersed throughout the cytoplasm. To analyze if RET-1 localization evolves during cell cycle, we focused on the 4 cells stage where cell divisions are very stereotyped, with 2 posterior cells in interphase and 2 anterior in mitosis (FIG 3B). We observed in interphase cells, RET-1 labeling seems homogeneous. RET-1 localization describes a network of thin tubules with some patches in the peripheral ER (FIG 3B, G, H). In mitotic cells, the ER-network forms a less dense reticular network of thicker tubules and clusters corresponding to enlarged patches. Moreover, RET-1 is enriched around the mitotic furrow and presents a dense tubule network close to the centrosome (FIG S3) and an enrichment of RET-1 is observed at the cortical ER closed to the plasma membrane (FIG 3B, E, F and S3A). The reorganization of ER pattern during cell division was further confirmed during later stages and using GFP::SP12 (FIG 3C, I, I' and S3). These results show that RET-1 is localized at the peripheral ER in *C. elegans* embryos. Interestingly, we observe an enrichment of RET-1 in hypodermis in stage of epithelialization also observed in panRET-1::GFP (FIG 3J and K and FIG 2I).

Albeit strong colocalization, we observed variations in intensity between SP12 and RET-1 within the ER. Indeed, the GFP::SP12 pattern seems to be heterogeneous at the ER network with a stronger staining at the tubule junctions (hereafter referred to as "intersection") than at the tubules themselves. RET-1 pattern seems more homogeneous. We performed a quantitative analysis on tubules and intersections. We based our analysis on the ratio of the maximum intensities observed at the tubule and its intersection (junction) (FIG 3L, M and N), allowing us to appreciate the relative distribution of both RET-1 and SP12. In the early embryos, the ratio of the RET-1 intensities in tubule versus intersection is 0.7 whereas that of SP12 is 0.5. Our data show that RET-1 is a marker of peripheral ER, excluding the nuclear envelope, and enriched in tubules compared to ER marker SP12. The RET-1 localization suggests that it could

play a particular role in the tubule, consistently with data on reticulons from other species (Shibata et al., 2008). To explore this idea, we have characterized RET-1 depletion mutants.

4. RET-1 short isoforms are required for ER-tubules morphology.

To decipher the requirement and function of RET-1 in *C. elegans* development, we next analyze the null mutant *ret-1(tm390)* as well as the *ret-1cd(pp130)* mutant in which the isoforms C and D are absent. In all mutants, no developmental defects were observed (data not shown). The embryonic development occurred normally and the worm hatch correctly. No lethality was observed and the adult animals lay eggs normally. To correlate the cellular localization of RET-1 with its cellular function, we analyze the ER shape in *ret-1(tm390)* mutant using GFP::SP12. We have constructed a strain expressing the transgene GFP::SP12 in *ret-1(tm390)* mutant context. Compared to control, the *ret-1(tm390)* presents a significant change in the ER-network morphology. Instead of patches and tubules in the control animals, numerous ring-like structures were present in *ret-1* mutant. (FIG 4A-B' and quantification in FIG 4C). We never observe this particular organization of ER-tubules in *ret-1(pp130)* (FIG S4C-C'). This is consistent with the fact that we have shown that the C and D isoforms are absent from the early embryo, suggesting that the defect is mainly due to the loss of short isoform. 3D reconstitution analysis suggests that abnormal structures adopt an empty sphere shape (FIG D-E). This was further confirm by the analysis of luminal ER marker protein HDEL, which show that these structures are not due to ER inflation but to modification of the shape of the network (FIG 4G). These data are the first evidence that RET-1 is involved in ER structuration in *C. elegans*.

Previous results at the one cell stage suggest a redundant function between RET-1 and YOP-1, the only reticulon-like protein in *C. elegans* (Audhya et al., 2007). We then ask if YOP-1 is redundant with RET-1 in the organization of the ER tubules network. In the embryos depleted for YOP-1, the ER network appears correctly organized (FIG S4D-D'). Interestingly, in *ret-*

l(tm390)/yop-1(RNAi) animals, we confirmed the embryonic lethality (as described by Audhya) and observed numerous ER rings. No aggravation of the phenotype corresponding to the increase of rings is observed in the double depleted embryos despite a network with fewer tubules compared to each single mutant. This data indicates that the ring phenotype is specifically due to depletion of *ret-1*. Otherwise, in *ret-1(tm390)/yop-1(RNAi)* animals, we observe an ER defects associated with cell morphological suggesting that RET-1 and YOP-1 are important to maintain the ER network morphology. In the absence of *ret-1*, we strongly reduce the specificity of ER network shaping during cell cycle, suggesting that the function of *ret-1* is to maintain the repartition of the tubules in the cell. Our expression data suggest that the function of RET-1 in shaping the ER are due to short isoforms.

5. The depletion of RET-1 isoforms in embryos does not affect the autophagosome biogenesis.

We then investigate how the phenotype of *ret-1* could affect autophagy. The relationship between ER and autophagosomes is dual. On one hand, it is autophagosome site for biogenesis and on the other hand, a cargo of ER-phagy. We first analyzed the colocalization events between RET-1 and LGG-1. LGG-1, homologous of Atg8 protein family, was used as a marker of autophagosomes (anti LGG-1 antibody or GFP::LGG-1). Using antibodies anti-RET-1 or anti-LGG-1 we very rarely observed yellow dots suggesting a very rare colocalization but very frequent proximity is detected between RET-1 and LGG-1 in physiological condition (FIG 5A and B). The colocalization is shown by graph of fluorescence intensity (FIG 1A' and B'). Although clear colocalization events between the two proteins are rare, there is often a very close proximity between the LGG-1 and RET-1 signals, called co-distribution, and corresponding to distances until 200 nm between both staining. The origins of autophagosomes are multiple, ER, PM, mitochondria, but no study have addressed that question in *C. elegans*.

Our results illustrate that in physiological conditions, autophagosomes are in close proximity to ER suggesting that it is a main site of biogenesis.

To know if RET-1 is important function in biogenesis of autophagosomes, we next decided to monitor the behavior of ER and autophagosomes in *ret-1(tm390)*. Analysis of LGG-1 and SP12 reveals a similar pattern than the one observed with RET-1. Moreover, in *ret-1* depletion, despite the formation of ER-ring, the autophagosomes are formed normally (FIG 5G). We first quantify the number of autophagosomes in the mutant compared to the control. We observed no significant difference in the number of autophagosomes between control and *ret-1(tm390)* (FIG. 5D and E, quantification in F). Autophagosomes were observed inside of ER-ring suggesting that defect in shaping does not prevent autophagosomes formation. During early embryogenesis in physiological condition, the depletion of RET-1 has no effect on the number of autophagosomes and their localization relative to ER, suggesting that RET-1 would not be involved in the autophagosomes biogenesis.

We next performed a stress approach leading to an increase of autophagic flux. We applied a one hour 37°C stress (HS) and monitored colocalization and co-distribution (measurement of distance) events between LGG-1 and GFP::SP12. We observed an increase of LGG-1 dots in control and in *ret-1(tm390)* embryos after HS (FIG 5E and H, quantification in F). No significant difference was observed between control and mutant. The quantification of colocalization events between GFP::SP12 and LGG-1 is summarized in figure 5 panel I. Those data show that in HS condition, there is significant increase of GFP::SP12/LGG-1 colocalization control (3 at 20°C to 7 at 37°C per embryo) and *ret-1(tm390)* (2 at 20°C to 7 at 37°C per embryo). Moreover, we do not observe a significant difference between the control and the mutant at 37°C (FIG 5I). Finally, to evaluate the co-distribution between the autophagosomes and the ER, we measure the distances between the LGG-1 puncta and the nearest GFP::SP12 staining (FIG 5G and K) and compared with a random distribution of points

in the embryo. The mean distance from LGG-1 to GFP::SP12 confirms a non-random distribution of autophagosomes which are close to the ER marker (FIG 5J and K) even in HS condition. Together, these indicate first that autophagosomes are preferentially located close to the ER network. Secondly, during a heat stress, the absence of RET-1 does not seem to have any consequences on the formation of autophagosomes or autophagy process. Together these data suggest that the short isoforms of RET-1 are not involved in the biogenesis of autophagosomes.

Discussion

In this study, we report that *ret-1*, the only reticulon gene in *C. elegans*, leads to the expression of at least 8 isoforms having size and tissue specificities. This diversity of reticulon ask the question about the specificity of functions. For the first time, the *ret-1* locus was dissected to prove the existence of the three categories of predicted isoforms, identified a new D2 isoform and better understand their respective role. Until now, the *ret-1* locus was poorly documented and is represented in most reviews only by its longest isoform corresponding to 3303 aa. Here, we have shown that the short isoforms of RET-1 are majority and ubiquitously expressed and responsible for maintaining a thin tubular structure constituting the peripheral-ER network. In addition, the long isoforms, the very minor forms, are restricted to the body wall muscle cells and the intermediate isoforms are expressed weakly in epidermis, intestine and probably in muscle in the larvae and the adult but are mainly expressed in the neurons. *ret-1* is not the only reticulon gene to have an expression specificity of different isoforms. Expression of RTN4A and B are detected in cultured epithelial cells, fibroblasts and neurons (Rämö et al., 2016). In zebrafish, RTN4/NOGO is mainly expressed in neurons and has an effect on neuronal growth (Pinzón-Olejua et al., 2014). In mammals, the presence of multiple promoter regions in gene loci of the reticulon family may suggest a specific spatio-temporal expression pattern depending on the needs of different cell types. The study of the expression of the different isoforms of RTN3 in the different tissues of the mouse has notably shown that the *rtn3* gene produces different transcripts following different alternative splicing or transcription initiation sites. For example, the level of expression of RTN3 is much higher in neurons than in peripheral tissues and short isoforms are much more represented than other isoforms (Shi et al., 2014). The latest data on RTN3 highlight important differences in functions between the isoforms. These new data suggest that different functions can be associate to these

proteins but no function has been yet assigned to these tissue-specific isoforms. *C.elegans* seems to be a good model to decipher the specific function of different isoforms.

Because it has already been established in mammals and yeast that some reticulons/reticulon-like as RTN3, FAM134B or Atg40 are involved in ER-phagy (Grumati et al., 2017; Khaminets et al., 2015; Mochida et al., 2015), it was interesting to explore the link between *ret-1* and autophagy process. Moreover, in mammals, the only long isoform of RTN3, RTN3L, has a role in ER-phagy leading to the specifically ER tubules degradation and seems to be the only described case of ER-phagy involving a particular isoform. In our study we only interested in the short RET-1 isoforms and we show that its do not appear to be involved in the biogenesis of autophagosomes. In regard of our results, the conditions are probably not the best to observe ER-phagy events. Otherwise, in HS conditions where the induction of autophagic flux occurred and probably also an ER stress, we do not see an increase of colocalizations between ER and autophagosome in the *ret-1* mutant suggesting that *ret-1* would not be necessary for ER-phagy. All these data suggest that the long or intermediate isoforms appear to be good candidates for mediating a link between ER and autophagosomes in muscle or neurons in *C. elegans*. Indeed, a close link seems to be established between autophagy and the development of the central nervous system, in mouse (Fimia et al., 2007), in drosophila (Kadir et al., 2016). Moreover, it is established that some reticulons are also involved in CNS homeostasis as for example in zebrafish (Pinzón-Olejua et al., 2014). Finally, the only defect assigned to *ret-1* null mutation until now has been a defect in axonal guidance. In this case, is the ER network is affected in neurons and is this phenotype due to a defect of ER organization in ER? In addition, analysis of the expression pattern of a transcriptional fusion between GFP and the promoter of the G2 isoform, shows that this isoform is specifically localized in neurons (Torpe et al., 2017). Here we have demonstrated that the other intermediate isoform D are also mainly expressed in neurons in *C. elegans*. We hypothesize that the RET-1 intermediate isoforms could have a

specific role in ER-phagy in neuron. These numerous isoforms all share in common their C-terminal part containing RHD but diverge from a N terminal part presenting a very variable sizes, suggesting that their function could be mediated by the N-terminal. In addition, no known domain is present in the N-terminal parts of the different isoforms of RET-1.

In mammals, it is now six receptors that are known, so one can also imagine that in *C. elegans* there may exist other RE-phagy receptors than RET-1.

Another part of our results also report that the short RET-1 isoforms are essential for maintaining the shaping of the ER tubules in embryos. Our approach was to study the *ret-1* mutant during embryonic development bringing new data compared with to Audhya's results that were only interested in the first cell stage using *ret-1* RNAi. Our data led us to show that in absence of RET-1 proteins, the ER network presents an increase in abnormal ring structures. Audhya and colleague also observed an ER aberrant morphology in triple depletion of RET-1/YOP-1/RAB-5 what they called numerous loop-shaped structures that look similar to what we observed in *ret-1* mutant. These loops, present in interphase, are accumulated around the spindle poles in mitosis do not exactly the same structure what we have. Moreover, our ring structures looks like that it described by Golden and colleagues associated with the depletion of lipin. They postulate that when lipin is downregulated, either an excess of ER membrane in the form of sheets counteracts the activity of reticulon, or ER membrane composition is altered such that the reticulons cannot induce the formation of ER tubules (Golden et al., 2009). But in our observation, the increase in these ring-like structures seems to be associated with a decrease in patches. It is clear that in RET-1 depletion, some ER structures disappear and the ER network is organized differently. One possibility is that these patches are in fact matrices of tubules as it has been described recently in living cells (Nixon-Abell et al., 2016), to explain the reorganization of the network in the mutant. Otherwise, ring structure of tubular ER have been observed in living cell and are very dynamic and microtubules-dependent (Friedman et al.,

2010; Lee and Chen, 1988). The ring structures consist of two three-way junctions and are localized where ER circumscribes endosomes and mitochondria (Friedman et al., 2010, 2013; Zajac et al., 2013). These organelles are constricted where they are wrapped by ER, corresponding to contact sites where mitochondrial and endosome fissions occur (Friedman et al., 2011; Rowland et al., 2014). Indeed, ER has been shown to establish transient membrane contacts with other endomembrane systems to exchange material (eg calcium and lipids) and to modulate the dynamic processes of organelles, such as fission, sorting and displacement of vesicles (Rowland et al., 2014). We hypothesize that these ring like structures, observed in *ret-1* mutant, may contain cell organelles as mitochondria, endosomes or lipid droplets, for example. The question being whether they correspond to contact sites between RE and organelles. Indeed, a typical animal cell have more than 100 endosomes and mitochondria and most are attached to the tubular ER network (Friedman et al., 2011; Rowland et al., 2014). Also, many ER sliding events may occur at positions where an ER tubule is pulled behind a trafficking organelle. Therefore, it is possible that most ER dynamics in the cell are indirectly caused by tethered organelles dragging the ER around with them. On the other hand, a hypothesis will be that in the absence of RET-1, particular associations are formed leading to a stabilization of contact areas. In order to decipher this hypothesis, it would be necessary to identify what is inside in these spheres. Because the ER is a central position in relations with most organelles of the cell, many contact areas exist between RE-endosomes, RE-mitochondria, RE-LP, etc. (Westrate et al., 2015; Wu et al., 2018). In this case, we would thus be able to show that RET-1 could not only favor the setting up of thin tubules but also that it could limit the contact zones with certain cellular organelles because in its absence, the tubule network seems destabilized and forms many new structures more spherical and fairly regular. The modification of the ER structure could lead to the modification of contact zones. The effect of ER membrane protein depletion associated with an increase in contact sites has already been described for the EPG-

3/VMP1 protein (Zhao et al., 2017). On the other hand, RET-1 could participate to form and maintain rigid tubules, which could explain that in its absence, the tubules, less constrained and less rigid, would cover the organelles, following the steric hindrance of the organelles and sometimes cover them. To better characterized these ring-like structures, it will be interesting to see if these structures are stable or not.

Finally, we also focus on the ER reorganization during cell cycle. The peripheral-ER undergoes major structural modifications ranging from majority of thin tubules in interphase to an increase in patches to the detriment of tubules in mitosis. In *ret-1* mutant, we observe a stabilization of the peripheral-ER network which appear more similar in both phases associated with increased of ring-like structure, suggesting that *ret-1* is necessary to allow the correct dynamics of ER reorganization.

In summary, our results suggest that *ret-1* is involved in ER shaping maintaining tubular integrity of peripheral ER and could play a role in regulating contact sites between ER and organelles. We propose that the tissues specificity of extended isoforms of RET-1 and their interaction with autophagosomes could be an ER-phagy receptors or modulators of phagophore formation in *C. elegans*.

Experimental procedures:

***C. elegans* strains**

Nematode strains were grown on nematode growth media (NGM) plates and fed with *Escherichia coli* strain OP50 (Brenner, 1974). The *C. elegans* Bristol N2 strain was used as a wild-type strain. Genotypes of all the strains used in this study are listed in Table 1 in supplemental material.

Immunofluorescence

Embryos were prepared for antibody staining on poly-L-lysinated (Sigma P8920) slides. Early embryos were extracted from mothers cutted directly on the slides. The samples were freeze–fractured and fixed in desiccated methanol at -20°C (30 minutes). After two quick washes with PBS 1X (~5min each), and a saturation step with 1X PBS containing 4% BSA (Sigma A7030) and 0.1% Triton (X-100 Sigma T9284) (Abdil buffer) for 1h, samples were incubated in 1X PBS, 4% BSA and 0.1% Triton buffer overnight at 4°C with primary antibodies, in humid chamber. After four 15 min washing steps in 1X PBS 0.1% Triton, samples were incubated in the same Abdil buffer for 2h at room temperature (20°) with secondary antibodies and a DNA labeling agent. Final mounting was carried out in DABCO (Sigma). Primary antibodies used in this study: mouse monoclonal anti-GFP at 1:250 (Roche, 1814460), chicken polyclonal anti-GFP 1:40 (Abcam Ab13970), rabbit anti-GABARAP at 1:200 (Merck Millipore AB15278), rabbit anti-RET-1 at 1:1000, anti-HDEL at 1:100. As secondary conjugated antibodies, Alexa Fluor® 488, Alexa Fluor® 568 (Molecular Probes) were used at a dilution of 1:500, and Alexa Fluor® 647(anti Rabbit, Invitrogen A21244) at 1:200. DNA was labeled using Hoechst at 1/500 (Molecular Probes).

Heat stress

For heat stress condition on embryos, gravid hermaphrodites were grown at 20°C and then incubated at 37°C for 1h followed by a recovery at 20°C for 45 min, and then an immunostaining has been performed.

Protein extraction and Western-blot

Unsynchronized population of worms were harvested in M9 from OP50 plates and the pelleted worms were lysed in equal volume of PBS Triton 2% + 10% PIC (Protease inhibitor cocktail, Roche 1183617), and glass beads (425-600µm, Sigma IG8772), with Precellys (1min 6000rpm, 5 min on ice, 1min 6000rpm, and on ice). 65 µg of proteins from total extracts have been loaded in each well of 4-12% tris-glycine gel (NuPage NP0321), and have been migrated with MOPS 1X buffer (NuPage, NP0001). Transfer has been performed in liquid buffer (14,4g Glycine, 5,05g Tris, 0,5g SDS and 200mL EthOh in 1L) overnight in cold room (4°C) at 30V. Membrane has been blocked with TBST 1X (1,2g Tris, 9g NaCL, 1mL Tween20 in 1L, pH7,5) + 3% milk for one hour, then primary antibodies were incubated in TBST milk 3% overnight at 4°C or 1h at RT, with agitation. Anti-RET-1 was used at 1:5000 dilution, anti-GFP at 1:2000 and anti-Tubulin at 1:2000. 4 washes in TBST 1X with stronger agitation were performed between primary and HRP coupled secondary antibodies incubations, which have been performed 1h at RT and were used at 1:10000 dilution (both anti-Rabbit and anti-Mouse). After 4 washes, HRP signal has been revealed by incubating the membrane for 5 minutes with Supersignal West Femto (Thermoscientific 34094) and detected with Chemidoc® Touch (Biorad).

Light microscopy imaging

Routinely, embryos and animals were imaged on a confocal Leica TCS SP8 microscope. Embryos and details of adult worms were imaged with 100x objective, while live whole worm

images are assemblages of projected stacks captured with 40x objective. All embryos images are from immunostaining experiments, for signal amplification.

Spinning disc approaches were performed using a Nikon Eclipse Ti E inverted microscope, Yokogawa CSU-X1-A1 spinning disc module and Prime 95B camera.

Deconvolution treatment was performed using Huygens software. Intensity quantification, counting and image processing was performed with imageJ (Fiji) (Schindelin et al., 2012). 3D rendering was performed with Chimera software (Pettersen et al., 2004).

Plasmid constructions and transgenic strains

RD344, RD346, RD380, RD412 and RD413 strains were obtained by a CRISPR-CAS9 approach optimized for *C. elegans*, using a *dpy-10* co-CRISPR protocol (Paix et al., 2015). In RD344, GFP was inserted in-frame in exon 2 of isoform C, in order to avoid secondary structures. RD346 is the result of a NEHJ event at the same cutting site, and resulted of a deletion of XX bp causing a frame shift leading to appearance of premature stop codon. In RD380, GFP was inserted in c-terminal, just before the stop codon, in the last exon, common to all isoforms of *ret-1*. RD412 correspond to an insertion of GFP in beginning of exon 1 of d isoform. RD413 is the result of an NEHJ event at the same Cas9 cutting site, inserting random material, causing a frame shift and introducing a stop codon, leading to a KO of c and d isoforms. All the insertions and deletions were verified by sequencing.

RD404 has been constructed by crosses.

RNA mediated interference

RNAi by feeding was performed as described (Kamath and Ahringer, 2003; Timmons and Fire, 1998). Fourth-larval stage (L4) animals or embryos were raised onto 1mM isopropyl-D-b-thiogalactopyranoside (IPTG)-containing NGM plates seeded with bacteria (*E. coli*

HT115[DE3]) carrying the empty vector L4440 (pPD129.36) as a control or the bacterial clones from the J. Ahringer library, Open Biosystem (*yop-I*). RNAi embryonic lethality phenotypes of F1 generation embryos were scored one day after the removal of egg laying F0 adults.

Statistics

All statistical analyses were performed by using the R-software (www.r-project.org). The error bars represent the standard deviation (SD). The Shapiro-Wilk's test was used to evaluate the normal distribution of the values. Data derived from different genetic backgrounds or conditions were compared by the Wilcoxon-Mann-Whitney test.

Acknowledgments

The authors would like to thank K. Oegema and J. Audhya, for giving us antibody against RET-1, G. Seydoux and A. Paix for technical support concerning CRISPR-CAS9 technology and the Caenorhabditis Genetic Center (CGC) which is funded by National Institutes of Health (NIH) Office of Research Infrastructure Programs (P40 OD010440) for providing several strains used in this study. The present work has benefited from LIGHT MICROSCOPY facility of Imagerie-Gif, (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr>), member of IBiSA (<http://www.ibisa.net>), supported by “France-BioImaging” (ANR-10-INBS-04-01), and the Labex “Saclay Plant Sciences” (ANR-10-LABX-0040-SPS). This work was supported by the Agence National de la Recherche (project EAT) (grant number ANR-12-BSV2-018) and the Association pour la Recherche contre le Cancer (grant number SFI20111203826). V.S. is recipient of fellowship from the Ligue Nationale contre le Cancer.

Bibliography

- Audhya, A., Desai, A., and Oegema, K. (2007). A role for Rab5 in structuring the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* *178*, 43–56.
- Bobinnec, Y., Marcaillou, C., Morin, X., and Debec, A. (2003). Dynamics of the endoplasmic reticulum during early development of *Drosophila melanogaster*. *Cell Motil. Cytoskeleton* *54*, 217–225.
- Breeze, E., Dzimitrowicz, N., Kriechbaumer, V., Brooks, R., Botchway, S.W., Brady, J.P., Hawes, C., Dixon, A.M., Schnell, J.R., Fricker, M.D., et al. (2016). A C-terminal amphipathic helix is necessary for the in vivo tubule-shaping function of a plant reticulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *113*, 10902–10907.
- Brenner, S. (1974). The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *77*, 71–94.
- Chen, Q., Xiao, Y., Chai, P., Zheng, P., Teng, J., and Chen, J. (2019). ATL3 Is a Tubular ER-Phagy Receptor for GABARAP-Mediated Selective Autophagy. *Current Biology* *29*, 846–855.e6.
- Chung, J., Torta, F., Masai, K., Lucast, L., Czaplá, H., Tanner, L.B., Narayanaswamy, P., Wenk, M.R., Nakatsu, F., and Camilli, P.D. (2015). PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER–plasma membrane contacts. *Science* *349*, 428–432.
- 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.
- Friedman, J.R., Webster, B.M., Mastronarde, D.N., Verhey, K.J., and Voeltz, G.K. (2010). ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J. Cell Biol.* *190*, 363–375.
- Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* *334*, 358–362.
- Friedman, J.R., DiBenedetto, J.R., West, M., Rowland, A.A., and Voeltz, G.K. (2013). Endoplasmic reticulum-endosome contact increases as endosomes traffic and mature. *Mol. Biol. Cell* *24*, 1030–1040.
- Geisler, J.G., Stubbs, L.J., Wasserman, W.W., and Mucenski, M.L. (1998). Molecular cloning of a novel mouse gene with predominant muscle and neural expression. *Mamm. Genome* *9*, 274–282.
- Gerstein, M.B., Lu, Z.J., Nostrand, E.L.V., Cheng, C., Arshinoff, B.I., Liu, T., Yip, K.Y., Robilotto, R., Rechtsteiner, A., Ikegami, K., et al. (2010). Integrative Analysis of the *Caenorhabditis elegans* Genome by the modENCODE Project. *Science* *330*, 1775–1787.
- Giordano, F., Saheki, Y., Idevall-Hagren, O., Colombo, S.F., Pirruccello, M., Milosevic, I., Gracheva, E.O., Bagriantsev, S.N., Borgese, N., and De Camilli, P. (2013). PI(4,5)P(2)-dependent and Ca²⁺-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins. *Cell* *153*, 1494–1509.

- Grippa, A., Buxó, L., Mora, G., Funaya, C., Idrissi, F.-Z., Mancuso, F., Gomez, R., Muntanyà, J., Sabidó, E., and Carvalho, P. (2015). The seipin complex Fld1/Ldb16 stabilizes ER-lipid droplet contact sites. *J. Cell Biol.* *211*, 829–844.
- Grumati, P., Morozzi, G., Hölper, S., Mari, M., Harwardt, M.-L.I., Yan, R., Müller, S., Reggiori, F., Heilemann, M., and Dikic, I. (2017). Full length RTN3 regulates turnover of tubular endoplasmic reticulum via selective autophagy. *ELife Sciences* *6*, e25555.
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., et al. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* *495*, 389–393.
- Hu, G., McQuiston, T., Bernard, A., Park, Y.-D., Qiu, J., Vural, A., Zhang, N., Waterman, S.R., Blewett, N.H., Myers, T.G., et al. (2015). TOR-dependent post-transcriptional regulation of autophagy. *Autophagy* *11*, 2390–2392.
- Huber, A.B., Weinmann, O., Brösamle, C., Oertle, T., and Schwab, M.E. (2002). Patterns of Nogo mRNA and protein expression in the developing and adult rat and after CNS lesions. *J. Neurosci.* *22*, 3553–3567.
- Kadir, R., Harel, T., Markus, B., Perez, Y., Bakhrat, A., Cohen, I., Volodarsky, M., Feintsein-Linial, M., Chervinski, E., Zlotogora, J., et al. (2016). ALFY-Controlled DVL3 Autophagy Regulates Wnt Signaling, Determining Human Brain Size. *PLoS Genet.* *12*, e1005919.
- Kamath, R.S., and Ahringer, J. (2003). Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods* *30*, 313–321.
- 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.
- Kotani, T., Kirisako, H., Koizumi, M., Ohsumi, Y., and Nakatogawa, H. (2018). The Atg2-Atg18 complex tethers pre-autophagosomal membranes to the endoplasmic reticulum for autophagosome formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *115*, 10363–10368.
- Lee, C., and Chen, L.B. (1988). Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells. *Cell* *54*, 37–46.
- Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* *451*, 1069–1075.
- 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.
- Molino, D., Zemirli, N., Codogno, P., and Morel, E. (2017). The Journey of the Autophagosome through Mammalian Cell Organelles and Membranes. *J. Mol. Biol.* *429*, 497–514.
- Nascimbeni, A.C., Giordano, F., Dupont, N., Grasso, D., Vaccaro, M.I., Codogno, P., and Morel, E. (2017). ER-plasma membrane contact sites contribute to autophagosome biogenesis by regulation of local PI3P synthesis. *EMBO J.* *36*, 2018–2033.

- Nixon-Abell, J., Obara, C.J., Weigel, A.V., Li, D., Legant, W.R., Xu, C.S., Pasolli, H.A., Harvey, K., Hess, H.F., Betzig, E., et al. (2016). Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER. *Science* *354*, aaf3928.
- Oertle, T., Klinger, M., Stuermer, C.A.O., and Schwab, M.E. (2003). A reticular rhapsody: phylogenetic evolution and nomenclature of the *RTN/Nogo* gene family. *The FASEB Journal* *17*, 1238–1247.
- Paix, A., Folkmann, A., Rasoloson, D., and Seydoux, G. (2015). High Efficiency, Homology-Directed Genome Editing in *Caenorhabditis elegans* Using CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Complexes. *Genetics* *201*, 47–54.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem* *25*, 1605–1612.
- Pinzón-Olejua, A., Welte, C., Abdesslem, H., Málaga-Trillo, E., and Stuermer, C.A. (2014). Essential roles of zebrafish *rtn4/Nogo* paralogues in embryonic development. *Neural Development* *9*, 8.
- Poteryaev, D., Squirrell, J.M., Campbell, J.M., White, J.G., and Spang, A. (2005). Involvement of the actin cytoskeleton and homotypic membrane fusion in ER dynamics in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* *16*, 2139–2153.
- Rämö, O., Kumar, D., Gucciardo, E., Joensuu, M., Saarekas, M., Vihinen, H., Belevich, I., Smolander, O.-P., Qian, K., Auvinen, P., et al. (2016). NOGO-A/RTN4A and NOGO-B/RTN4B are simultaneously expressed in epithelial, fibroblast and neuronal cells and maintain ER morphology. *Scientific Reports* *6*.
- Reggiori, F., and Klionsky, D.J. (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryotic Cell* *1*, 11–21.
- Roebroek, A.J., Contreras, B., Pauli, I.G., and Van de Ven, W.J. (1998). cDNA cloning, genomic organization, and expression of the human RTN2 gene, a member of a gene family encoding reticulons. *Genomics* *51*, 98–106.
- Rowland, A.A., Chitwood, P.J., Phillips, M.J., and Voeltz, G.K. (2014). ER Contact Sites Define the Position and Timing of Endosome Fission. *Cell* *159*, 1027–1041.
- Salo, V.T., Belevich, I., Li, S., Karhinen, L., Vihinen, H., Vigouroux, C., Magré, J., Thiele, C., Hölttä-Vuori, M., Jokitalo, E., et al. (2016). Seipin regulates ER–lipid droplet contacts and cargo delivery. *The EMBO Journal* *35*, 2699–2716.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., et al. (2012). Fiji - an Open Source platform for biological image analysis. *Nat Methods* *9*.
- Shemesh, T., Klemm, R.W., Romano, F.B., Wang, S., Vaughan, J., Zhuang, X., Tukachinsky, H., Kozlov, M.M., and Rapoport, T.A. (2014). A model for the generation and interconversion of ER morphologies. *PNAS* *111*, E5243–E5251.

- Shi, Q., Ge, Y., Sharoar, Md.G., He, W., Xiang, R., Zhang, Z., Hu, X., and Yan, R. (2014). Impact of RTN3 Deficiency on Expression of BACE1 and Amyloid Deposition. *J Neurosci* *34*, 13954–13962.
- Shibata, Y., Voss, C., Rist, J.M., Hu, J., Rapoport, T.A., Prinz, W.A., and Voeltz, G.K. (2008). The Reticulon and Dp1/Yop1p Proteins Form Immobile Oligomers in the Tubular Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry* *283*, 18892–18904.
- Shibata, Y., Shemesh, T., Prinz, W.A., Palazzo, A.F., Kozlov, M.M., and Rapoport, T.A. (2010). Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell* *143*, 774–788.
- Suzuki, K., and Ohsumi, Y. (2010). Current knowledge of the pre-autophagosomal structure (PAS). *FEBS Lett.* *584*, 1280–1286.
- Timmons, L., and Fire, A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* *395*, 854.
- Torpe, N., Nørgaard, S., Høye, A.M., and Pocock, R. (2017). Developmental Wiring of Specific Neurons Is Regulated by RET-1/Nogo-A in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* *205*, 295–302.
- Tourasse, N.J., Millet, J.R.M., and Dupuy, D. (2017). Quantitative RNA-seq meta-analysis of alternative exon usage in *C. elegans*. *Genome Res.*
- Voeltz, G.K., Prinz, W.A., Shibata, Y., Rist, J.M., and Rapoport, T.A. (2006). A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* *124*, 573–586.
- Wang, C.-W., Miao, Y.-H., and Chang, Y.-S. (2014). Control of lipid droplet size in budding yeast requires the collaboration between Fld1 and Ldb16. *J. Cell. Sci.* *127*, 1214–1228.
- Wang, H., Becuwe, M., Housden, B.E., Chitraju, C., Porras, A.J., Graham, M.M., Liu, X.N., Thiam, A.R., Savage, D.B., Agarwal, A.K., et al. (2016). Seipin is required for converting nascent to mature lipid droplets. *Elife* *5*.
- Westrate, L.M., Lee, J.E., Prinz, W.A., and Voeltz, G.K. (2015). Form follows function: the importance of endoplasmic reticulum shape. *Annu. Rev. Biochem.* *84*, 791–811.
- Wu, H., Carvalho, P., and Voeltz, G.K. (2018). Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites. *Science* *361*.
- Wu, Y., Whiteus, C., Xu, C.S., Hayworth, K.J., Weinberg, R.J., Hess, H.F., and Camilli, P.D. (2017). Contacts between the endoplasmic reticulum and other membranes in neurons. *PNAS* *114*, E4859–E4867.
- Yoshimori, T. (2004). Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *313*, 453–458.
- Zajac, A.L., Goldman, Y.E., Holzbaur, E.L.F., and Ostap, E.M. (2013). Local cytoskeletal and organelle interactions impact molecular-motor-driven early endosomal trafficking. *Curr. Biol.* *23*, 1173–1180.
- Zhao, Y.G., Chen, Y., Miao, G., Zhao, H., Qu, W., Li, D., Wang, Z., Liu, N., Li, L., Chen, S., et al. (2017). The ER-Localized Transmembrane Protein EPG-3/VMP1 Regulates SERCA

Activity to Control ER-Isolation Membrane Contacts for Autophagosome Formation. *Molecular Cell* 67, 974-989.e6.

Zurek, N., Sparks, L., and Voeltz, G. (2011). Reticulon short hairpin transmembrane domains are used to shape ER tubules. *Traffic* 12, 28–41.

Zwaal, R.R., Van Baelen, K., Groenen, J.T., van Geel, A., Rottiers, V., Kaletta, T., Dode, L., Raeymaekers, L., Wuytack, F., and Bogaert, T. (2001). The sarco-endoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase is required for development and muscle function in *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 276, 43557–43563.

Figure legends

Figure 1. *ret-1* locus codes for 3 categories of isoforms of various sizes.

(A) Schematic representation of the genomic locus of *ret-1*, and all the proteins it codes. Alternative spliced exons are colored. The different GFP insertion sites are indicated in green, while mutated sites leading to K.Os are indicated in black. Sizes in amino acids of the different isoforms are indicated at their C terminal end. α RET-1 represents the fragment of RET-1 used to generate the antibody. RHD in red represents the Reticulon homology domain. The three categories of isoforms are indicated at left. Interpretation of splicing analysis allowed us to estimate the relative quantity of each isoform as shown at right. (B) Western blot analysis of the RET-1 isoforms expression in wild type or null mutant *ret-1(tm390)*. Asterisks indicates aspecific bands. Signal quantification of each category of isoforms from the wild type extract is indicated by the histogram. (C) Schematic representation of the different generated GFP fusions expressed in the three transgenic strains generated by a CRISPR-Cas9 technology. (D) Western blot analysis of the RET-1 isoforms expression in GFP fusion expressing strains, K.Os mutant of cd isoforms, and K.Os mutant of c isoform. The same membrane was hybridized with anti-GFP antibody (left) and antiRET-1 antibody (right). Asterisk indicates aspecific bands. Anti-tubulin was used for normalization.

Figure 2. RET-1C is restricted to muscle cells and RET-1D is mainly expressed in neurons.

(A-C) Assemblage of confocal images projections of live adult hermaphrodites. Scale bar: 100 μ m. (A) Expression of panRET-1::GFP. The expression can be detected in all tissues; arrows indicate some of them (NR: Nerve ring). (B) Expression of GFP::RET-1CD can be detected in neurons, intestine, epidermis and body wall muscle cells (BWM). (C) Expression of GFP::RET-1D is restricted to BWM. (D-F'') Confocal images of magnification of live adult

hermaphrodite tissues showing the expression pattern of the different RET-1 GFP fusions in epidermis (D, E, F), intestine (D', E', F'; corner window shows autofluorescence of the intestine), and muscle cell (D'', E'', F''). Scale bar: 10µm. D panels correspond to panRET-1::GFP ubiquitous expression. E panels correspond to GFP::RET-1CD expression in those 3 tissues. F panels correspond to GFP::RET-1C expression restricted to BWM. (G-N) Confocal images of GFP tagged proteins in embryo after immunostaining with anti-GFP antibody. In panGFP::RET-1 expressing embryos, signal is ubiquitous in all stages (G-J). GFP::RET-1 C expression is absent of embryos (K), and GFP::RET-1CD are expressed in neuronal precursors and neurons from morphogenesis (M,N). Scale bar: 10 µm.

Figure 3. RET-1 is enriched in ER-tubules and accumulated in epithelial cells during morphogenesis.

(A-L) Confocal planes of embryos from immunofluorescence experiment. Scale bar: 5 µm. (A-D) Staining with antibodies against RET-1, against GFP and DNA marker (Hoechst) of a 1 cell (A), 4 cells (B), 50 cells (C), revealing GFP::SP12 localization, and 150 cells embryos (D), revealing GFP::SCA-1 localization. (E-I) Confocal magnifications of previously shown 4 cells embryo and 50 cells embryo (NE: nuclear envelope). (E, F) Two different confocal planes of ABa cell in mitotic state (white arrows indicate patches and yellow one cortical-ER). (G-H) Two different confocal planes of P2 cell in interphase. (I) cells in interphase, (I') cell in mitosis. (J-K) Confocal images of immunofluorescence against RET-1 and AJM-1 of a 550 cells embryo, with external and internal planes. Arrow indicates the enrichment of RET-1 in epithelial cells. (L) Confocal magnification of a 2 cell immunostained embryo, illustrating measurement of relative quantification of RET-1 and GFP::SP12 in ER tubules versus ER junctions. Arrow shows ER junction, arrowhead indicates ER tubule. Dotted line is passing through a junction and a single tubule for plotting in M. (M) Histogram showing GFP::SP12

and RET-1 fluorescence intensity along the dotted line in L. (N) Boxplot representation of measured ratios corresponding to maximum intensity at tubule/ maximum intensity at junction for RET-1 and GFP::SP12 in 2 cell embryos or in 4-10 cells embryos. Intensities values have been each measured at single tubule and at the closest junction. N=60 ratios measurement for each condition.

Figure 4. Depletion of RET-1 results in an abnormal ER shape.

(A-B') Single planes from deconvoluted confocal images of 4 cells embryos immunostained with anti-GFP antibody, revealing GFP::SP12. Arrows show spherical ER structure. (A,A') Upper plane and central plane of a control embryo. Dotted square indicates structure used for z multiplane montage in E. (B, B') Upper slice and central slice of a *ret-1(tm390)* embryo. Dotted square indicates structure used for 3D rendering in D and z multiplane montage in F. (C) Quantification of spherical ER structures in control and *ret-1(tm390)* by confocal plane. Quantification has been performed on 3 nonconsecutive confocal slices for each embryo. (N=42 slices analyzed for control, N= 51 for *ret-1(tm390)*). (D) 3D rendering of a spherical structure from successive z slices corresponding to B' dotted square. (E) Montage of successive z planes of spherical structures from deconvoluted confocal images of 4 cells *ret-1(tm390)* embryos, indicated by dotted squares in B'. 0 represent the central plane of the structures; other values indicate the z distance of each plane from the central plane, in μm . (F, F', F'') Single confocal magnification images of 4 cells embryo. Immunostained with anti-GFP (F) and anti-HDEL (F') antibodies. Merged signals are displayed in (F''). Right panel shows higher magnification of the structure indicated by arrow.

Figure 5. RET-1 is not involved in autophagosome biogenesis.

(A-C'). Colocalization and codistribution analysis of RET-1 and LGG-1 proteins. (A) Confocal images of 25 cells stage embryo using anti-GFP and anti-GABARAPL1 antibodies. (B) STED image of 16 cells stage embryo using anti-GFP and anti-RET-1 antibodies. (C) Deconvoluted confocal image of 50 cells stage embryo using anti-GFP and anti-RET-1 antibodies. (A'-C') graphs corresponding to a visualization of pic of fluorescence intensity of each staining along the dotted line in magnification panels. Arrows indicate the colocalization events in A' and B' or codistribution in C'. (D, E, G, H) Deconvoluted confocal image of early embryos expressing GFP::SP12 fusion protein. Immunofluorescence of GFP, LGG-1 and DNA staining using hoescht in control and *ret-1(tm390)* at 20°C (D and E respectively) or 37°C (G-H respectively) corresponding to heat shock (HS). (F) Quantification of number of autophagosomes per embryo in control at 20°C and 37°C and *ret-1(tm390)* at 20°C and 37°C (n = 20, 9, 16, 8 respectively). Dots counting have been performed on total z-projection from 2-10 cell stages embryos. I) Quantification of colocalisation events per embryo in same conditions (n= 10, 8, 9, 8 respectively). J) Confocal image used for measurement of distance between LGG-1 (autophagosomal marker) signal and GFP-SP12 (ER marker) signal or random dot and GFP-SP12 signal. Measurements performed on confocal images of 2-10 cell stages embryos. Yellow line represents the measured distance. (K) Boxplot of the distance between autophagosomes/ER or random dots/ER in control or *ret-1(tm390)* at 20°C or 37°C (random dots within the nucleus have been excluded). 20 to 23 measurements have been performed for each embryo, (3 embryos for each condition were used). Scale bar: 5 µm. * : p<0,05; ** : p<0,01; *** : p<0,001

Supplementary Figure Legends

Figure S1. Quantitative visualization of relative splice-sites usage in *ret-1* locus. (A) Schematic representation of *ret-1* exons associated with the absolute read count for each *cis*- and *trans*-splicing event in the gene on a logarithmic scale. This graphical representation shows the high-confidence events and include junction usage frequencies for alternative events (Tourasse et al., 2017). (B) Schematic representation of all transcripts from *ret-1* locus using splicing data. Percentage of each isoform transcripts based on number of splicing reads are indicated on the right. Data set indicates that a, b and g as major forms, e and d as minor and c as rare forms of *ret-1* gene.

Figure S2. (A) Live spinning disk images of body wall muscle cells of strains expressing panRET-1::GFP or GFP::RET-1C. We focus on three different areas of muscle cell. Basal zone correspond to a confocal plane under the plasma membrane. Arrowheads indicate one muscle cell, arrow indicate a neuron. panRET-1::GFP and GFP::RET-1C pattern are associated to sarcoplasm and cytoplasm network structures in BWM cells. (B) Live confocal image of the head of an adult expressing GFP::RET-1 CD. Fluorescence signal is localized in axons and cellular bodies of neurons and in nerve ring (NR). (C) Confocal single plane image of immunostained gonad from a cutted worm expressing panRET-1::GFP with anti GFP antibody. (D) Confocal images after immunostaining with anti RET-1 antibody (in green) and anti calcequestrin-1 (CSQ-1 in red) or actin staining with phalloïdin (in red) in adult BWM cell expressing panRET-1::GFP or GFP::RET-1C. CSQ-1 is localized at the sarcoplasmic reticulum, and phalloïdin stains actin filaments that are attached to dense bodies (arrow indicates the localization of dense body). RET-1 fusion proteins are partially colocalized with CSQ-1 and along the dense bodies. (E-I') Confocal single plane images of immunostained embryos. (E-E') Immunofluorescence of GFP (green) and ERM-1 (red and used as control of

immunostaining) in 16 cells stage embryos expressing GFP::RET-1C. No GFP signal was detected in early embryo. (F-G') Immunofluorescence of embryos expressing GFP::RET-1 CD with anti-GFP (green) and anti-RET-1 (red). In early embryo, no GFP signal was detected while in late embryo, GFP signal is localized in neurons. (H-I') Immunostaining of GFP (green) and RET-1 (red) in embryos mutants for *ret-1(pp130)*. Depletion of RET-1 C and D isoforms specifically does not affect RET-1 general pattern of localization of other isoforms.

Figure S3. RET-1 localization during cell cycle. A) Confocal image of immunostained 16 cell stage embryo expressing panRET-1::GFP, with antibody against GFP (green) and DNA marker Hoechst (blue) Dotted squares indicate cells magnified in (B-C'). (B-B') Confocal magnification of a cell in mitotic state, upper single slice (B) and central single slice (B'). (C-C') Confocal magnification of a cell in interphase, upper single slice (C) and central single slice (C'). Cells in interphase display a dense network of thin tubules with a relative low number of sheets/cisternae. Cells in mitosis present thicker tubules forming a wider network, and more patches, especially close to the PM and the nucleus, and around centrosomes.

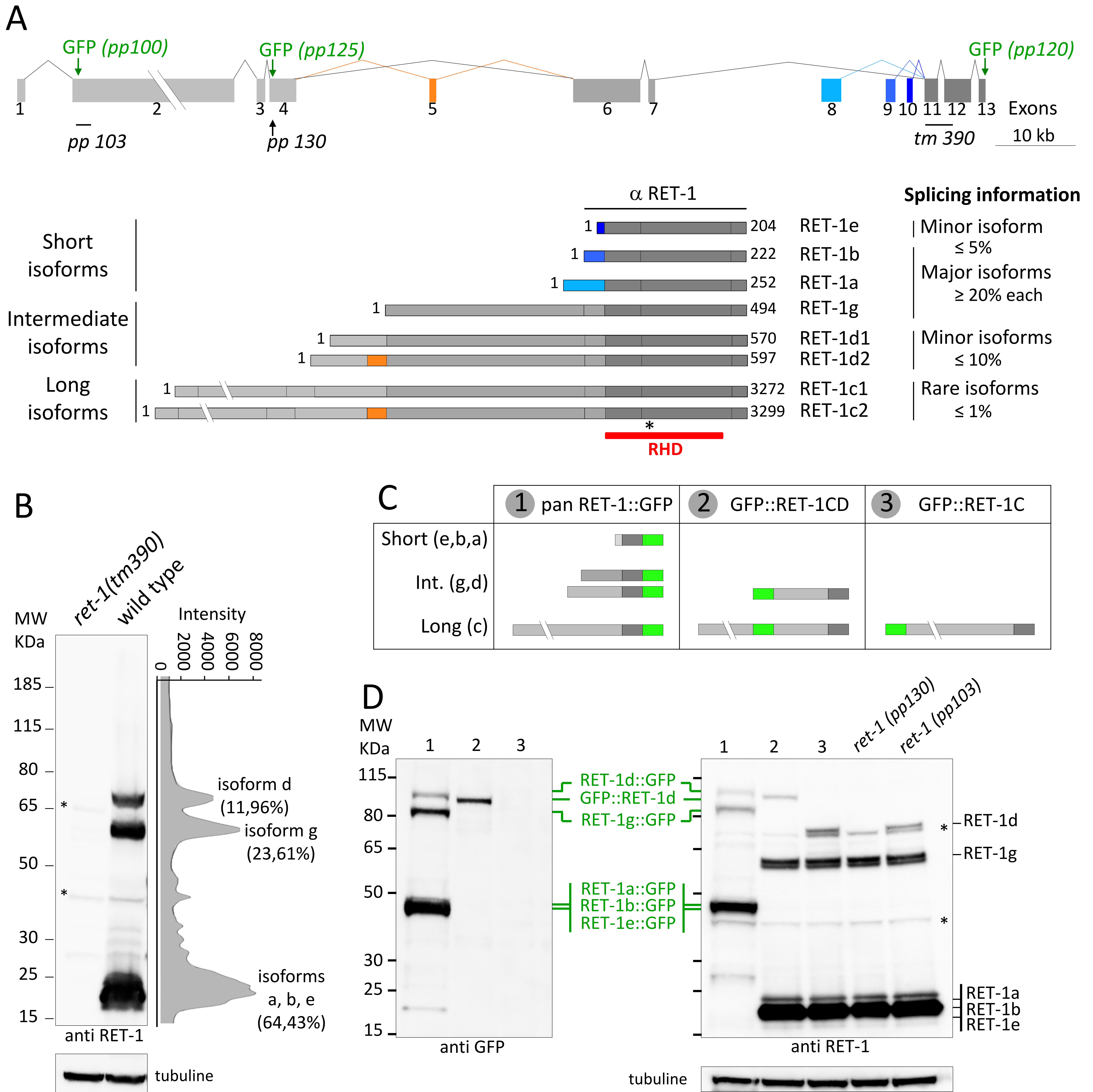
Figure S4. (A-D') Confocal single slice images of immunostained 4 cell stage embryos. (A-A') Upper and central views of an embryo depleted in RET-1 C and D, stained with antibody against RET-1 (green), and DNA marker Hoechst (blue). ER shape and ER dynamics are not affected. (B-D') Upper and central views of embryos depleted for YOP-1 by RNAi treatment, and immunostained with antibody against GFP (revealing GFP::SP12) and DNA marker (blue). (B-B') Control background. The increase of the number of ring structures in case of depletion of RET-1 is not observed when YOP-1 is depleted. (C-C') In case of codepletion of RET-1 and YOP-1, ring structures number strong increase is observed, with drastic effects on the ER shape, resulting in a strong decrease of ER tubules.

Table S1

All the strains used in this study are listed below

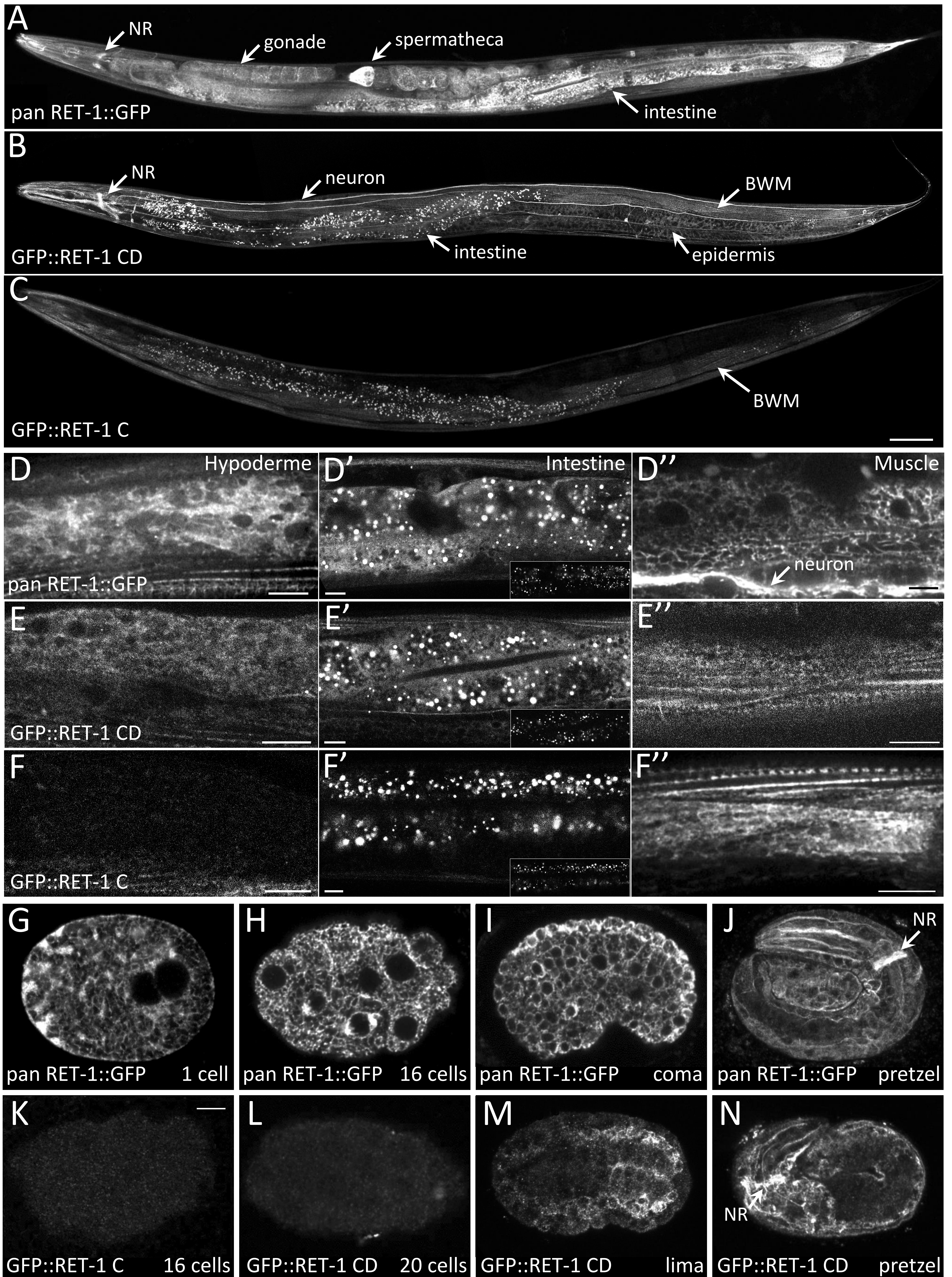
WH327	<i>ojis23 [pie-1p::GFP::C34B.10]</i>
RD380	<i>ret-1(pp120)[panRET-1::GFP]</i>
RD344	<i>ret-1(pp100)[GFP::RET-1C]</i>
RD346	<i>ret-1(pp103)[KO ret-1 c]</i>
<i>ret-1(tm390)</i>	<i>ret-1(tm390) V.</i>
RD404	<i>ret-1(tm390) V.ojis23 [pie-1p::GFP::C34B.10]</i>
SCA-1::GFP	gift from K.R. Norman
RD412	<i>ret-1(pp125)[GFP::RET-1D]</i>
RD413	<i>ret-1(pp103)[KO ret-1c/d]</i>
N2	wild type
DA2123	<i>adIs2122 [lgg-1p::GFP::lgg-1 + rol-6(su1006)]</i>

Figure 1 Scarcelli et al.



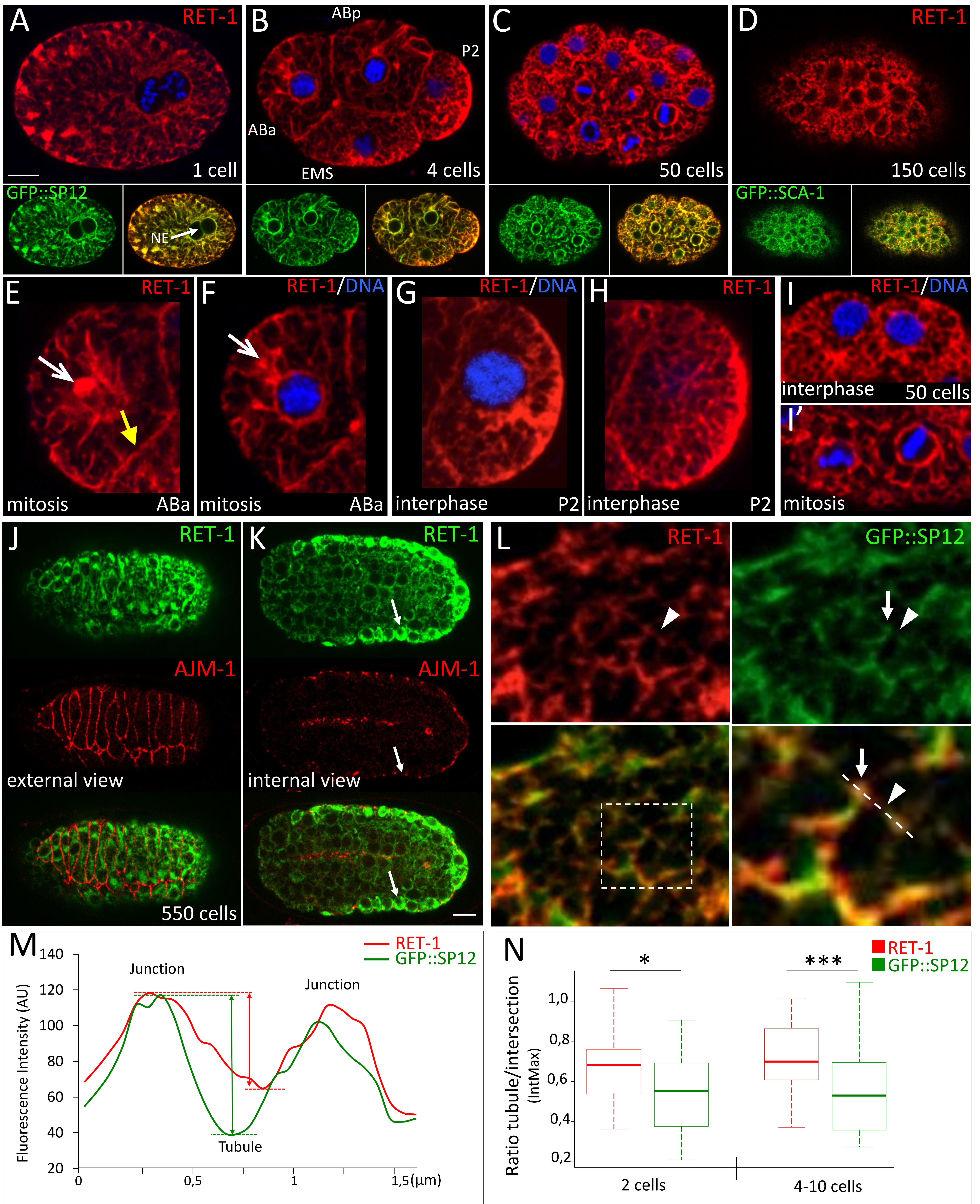
ret-1 locus codes for 3 categories of isoforms of various sizes.

Figure 2 Scarcelli et al.



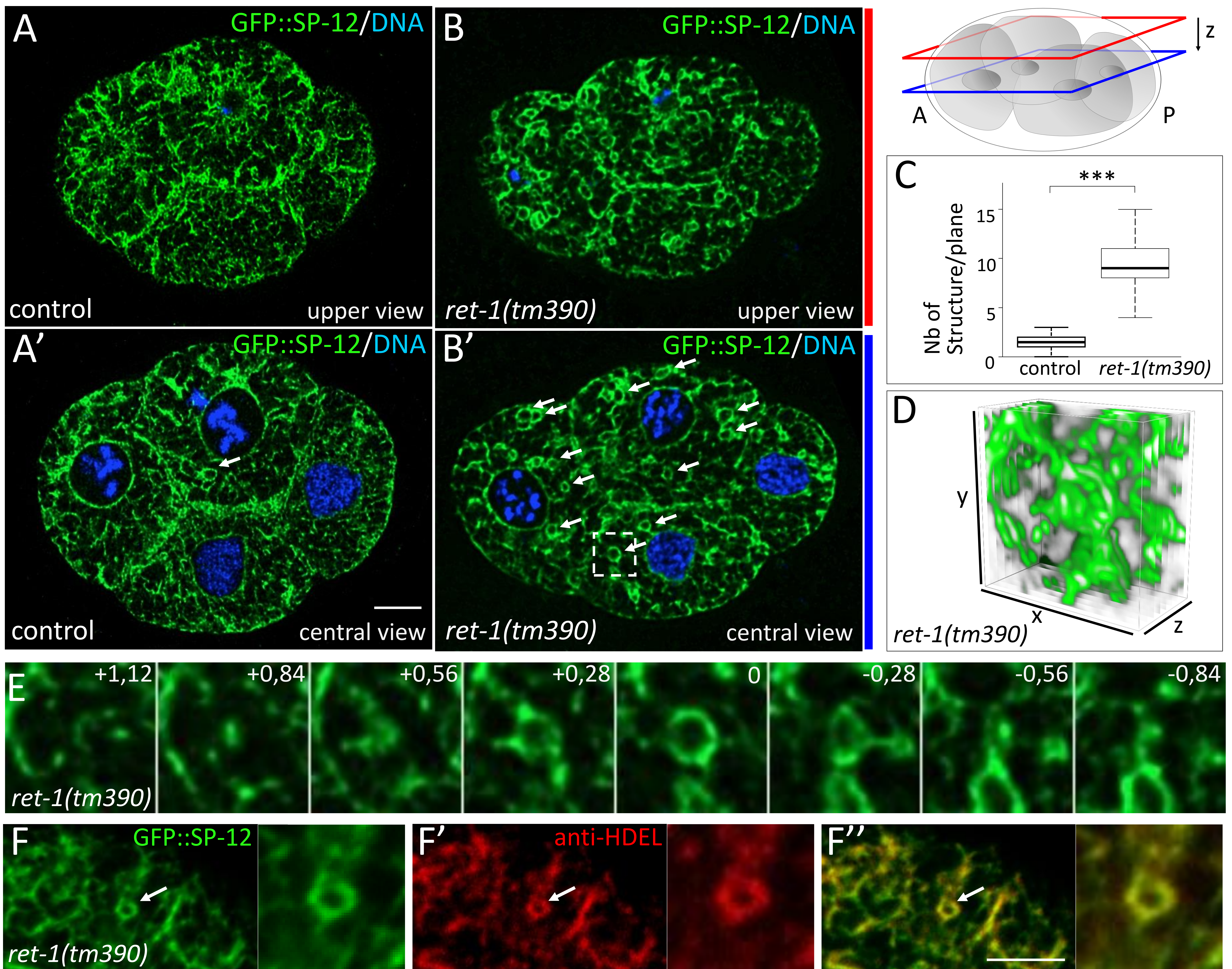
RET-1C is restricted to muscle cells and RET-1D is mainly expressed in neurons

Figure 3 Scarcelli et al.



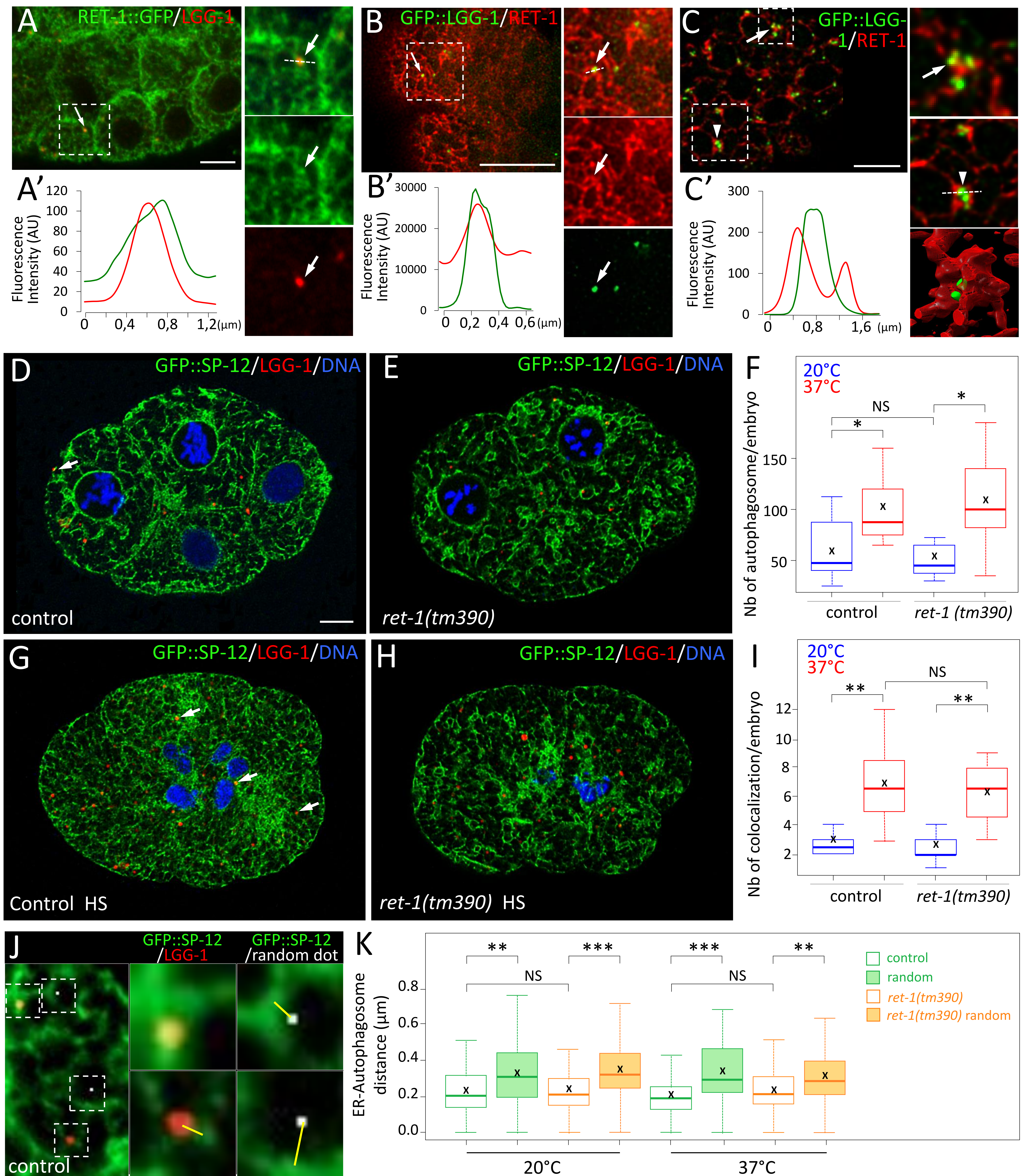
RET-1C is enriched in ER-tubules and accumulated in epithelial cells during morphogenesis

Figure 4 Scarcelli et al.



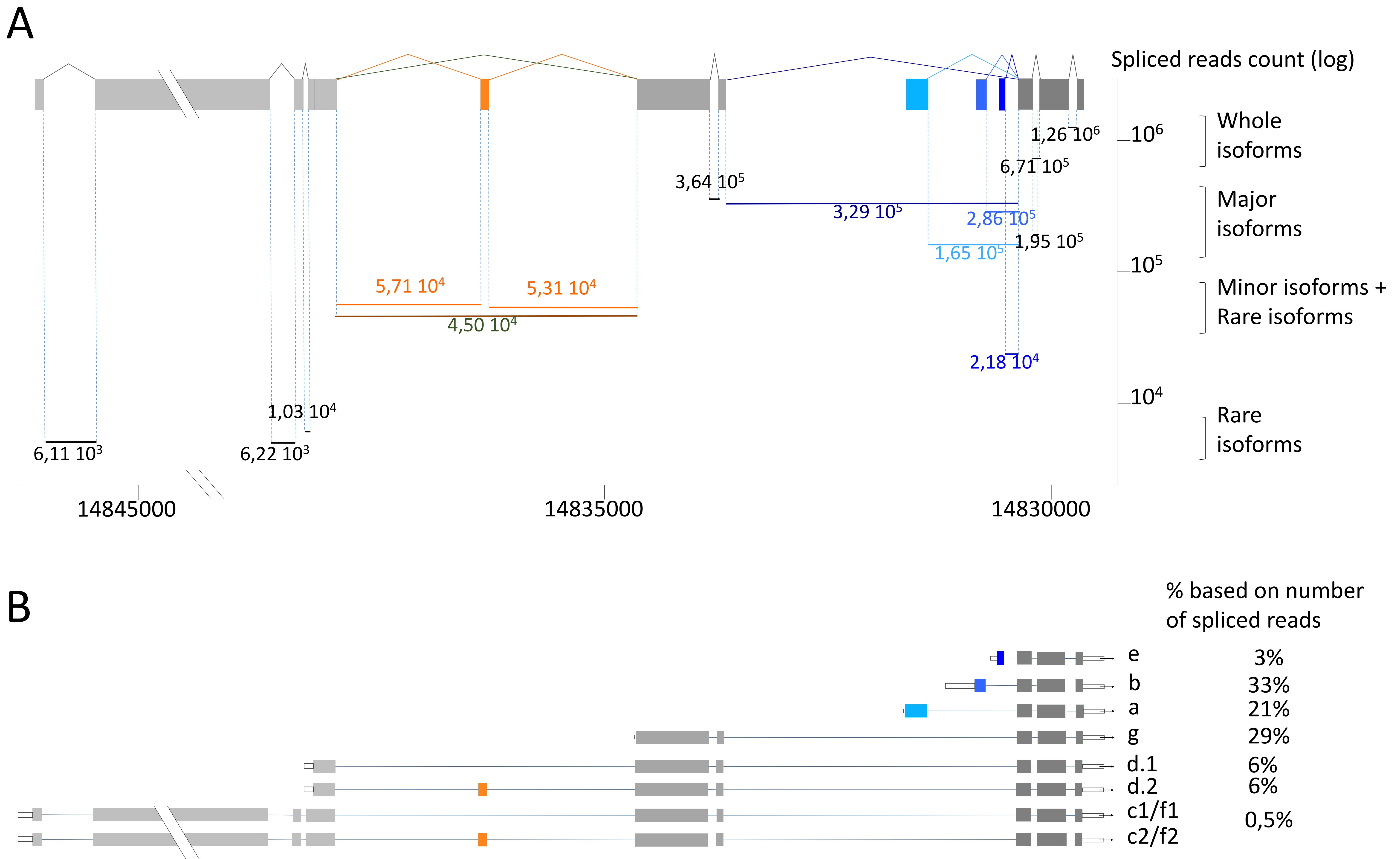
Depletion of RET-1 results in abnormal ER shape

Figure 5 Scarcelli et al.



RET-1 is not involved in autophagosome biogenesis

Figure S1 Scarcelli et al.



Quantitative visualization of relative splice-sites usage in *ret-1* locus

Figure S2 Scarcelli et al.

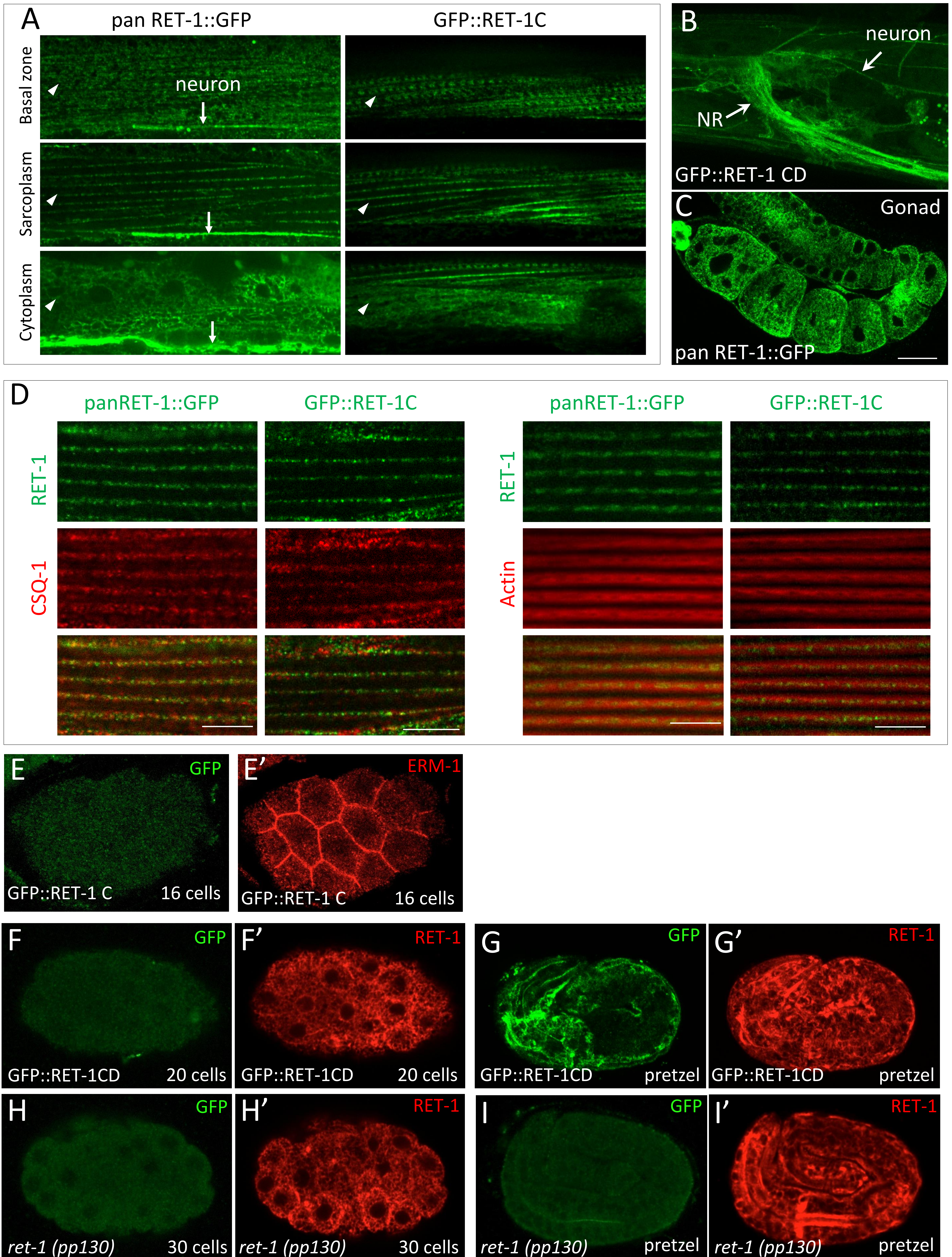


Figure S3 Scarcelli et al.

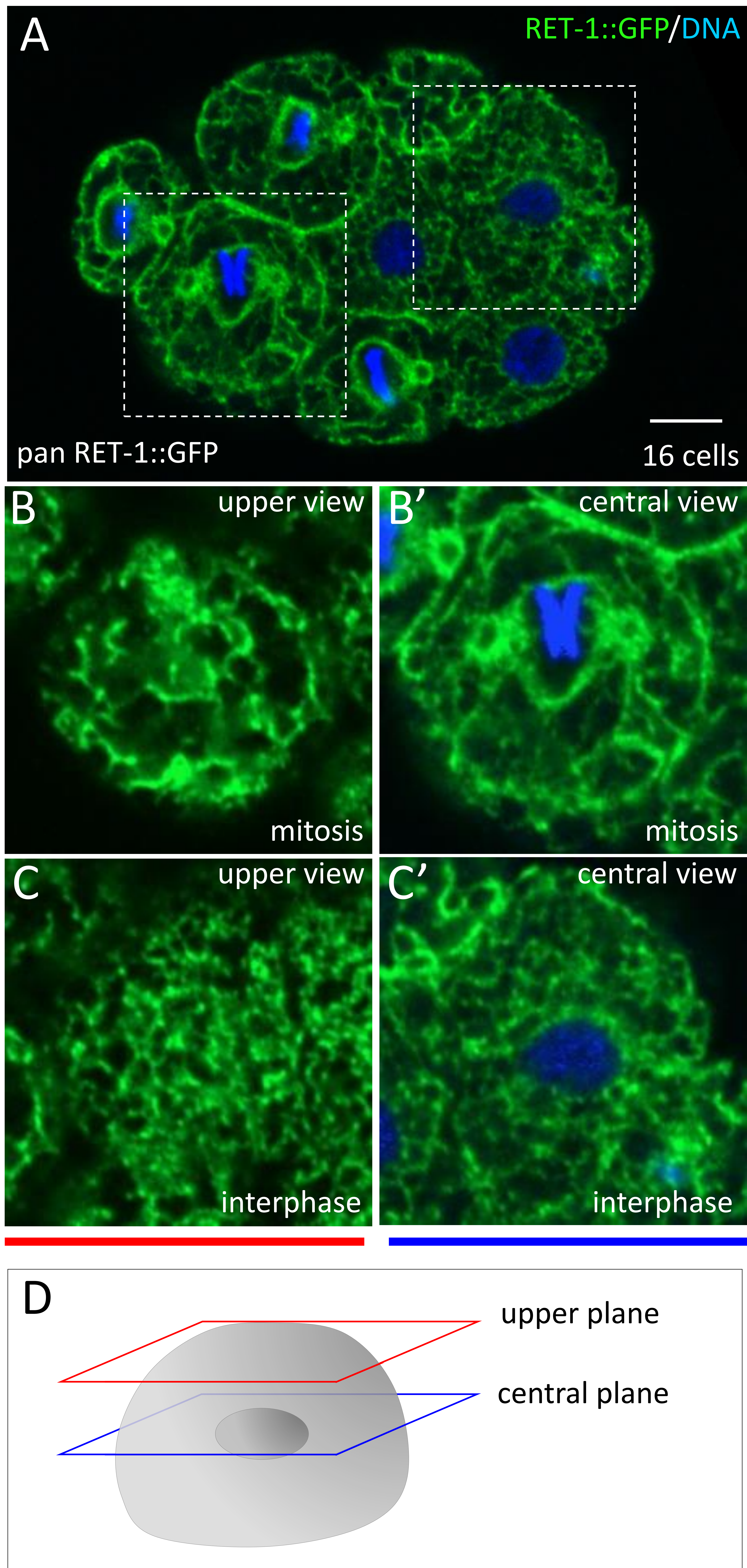
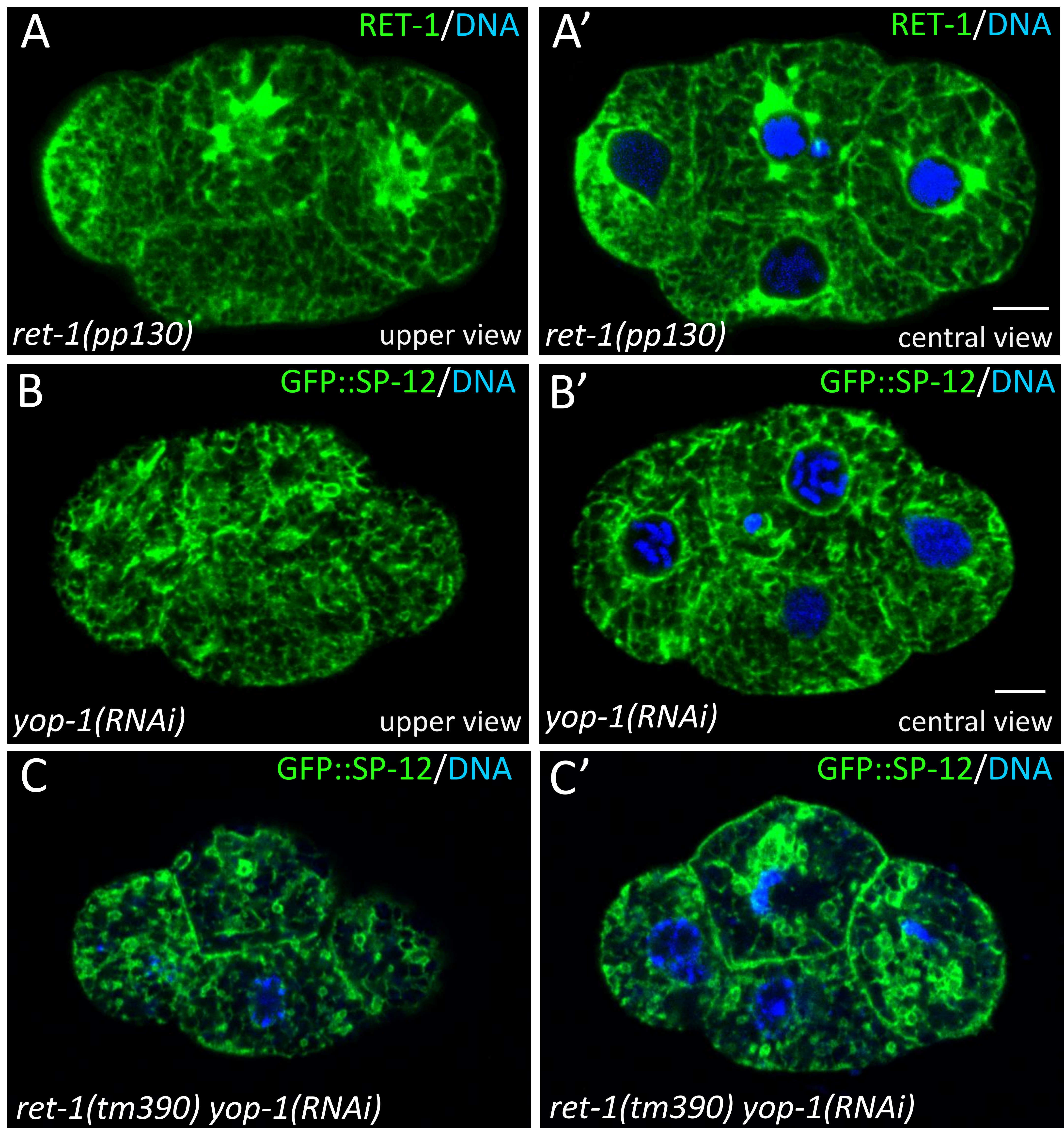


Figure S4 Scarcelli et al.



Partie II : Résultats complémentaires

a- RET-1 isoformes C et D sont des interacteurs potentiels de LGG-1.

N'ayant pas pu mettre en évidence *in vivo* une interaction entre LGG-1 et une ou plusieurs isoformes de RET-1, nous n'avons pas inclus ces résultats dans le manuscrit. Par une double approche suite à un crible double hybride réalisé chez la levure en utilisant LGG-1 et LGG-2 comme appâts (réalisé par Hybrigenics) et une immunoprécipitation de GFP::LGG-1 et GFP::LGG-2 suivie d'une analyse en spectrométrie de masse (réalisé au laboratoire par Marion Manil-Segalen en collaboration avec la plateforme de spectrométrie de masse), nous avons identifié environ 200 d'interacteurs potentiels de LGG-1 et/ou LGG-2. L'un de ces interacteurs, RET-1, s'est avéré positif pour LGG-1, et non pour LGG-2. Nous avons entrepris l'analyse des séquences d'ADNc correspondant aux fragments positifs de RET-1 issus du crible double hybride. Nous avons alors observé que l'ensemble de ces fragments correspondaient à des exons uniquement présents dans les isoformes C et D, en amont du début de traduction des autres isoformes. De plus, tous les fragments sauf un comprenaient un exon pouvant être éliminé par épissage alternatif (Figure 28, A).

Par une approche bio-informatique en utilisant l'outil iLIR, nous avons identifié 6 LIR situés spécifiquement sur les isoformes longues et intermédiaires, dont deux sur la partie commune aux fragments de RET-1 issus du crible double hybride. Nous avons fait tester l'interaction de ce fragment avec LGG-1, et également avec des versions mutées de l'un ou l'autre de ces deux LIR, ou bien les deux. La mutation de l'un ou l'autre des LIR entraîne un affaiblissement de l'interaction, et la mutation conjointe des deux entraîne une perte de l'interaction de ce fragment de RET-1 avec LGG-1 (Figure 28, B).

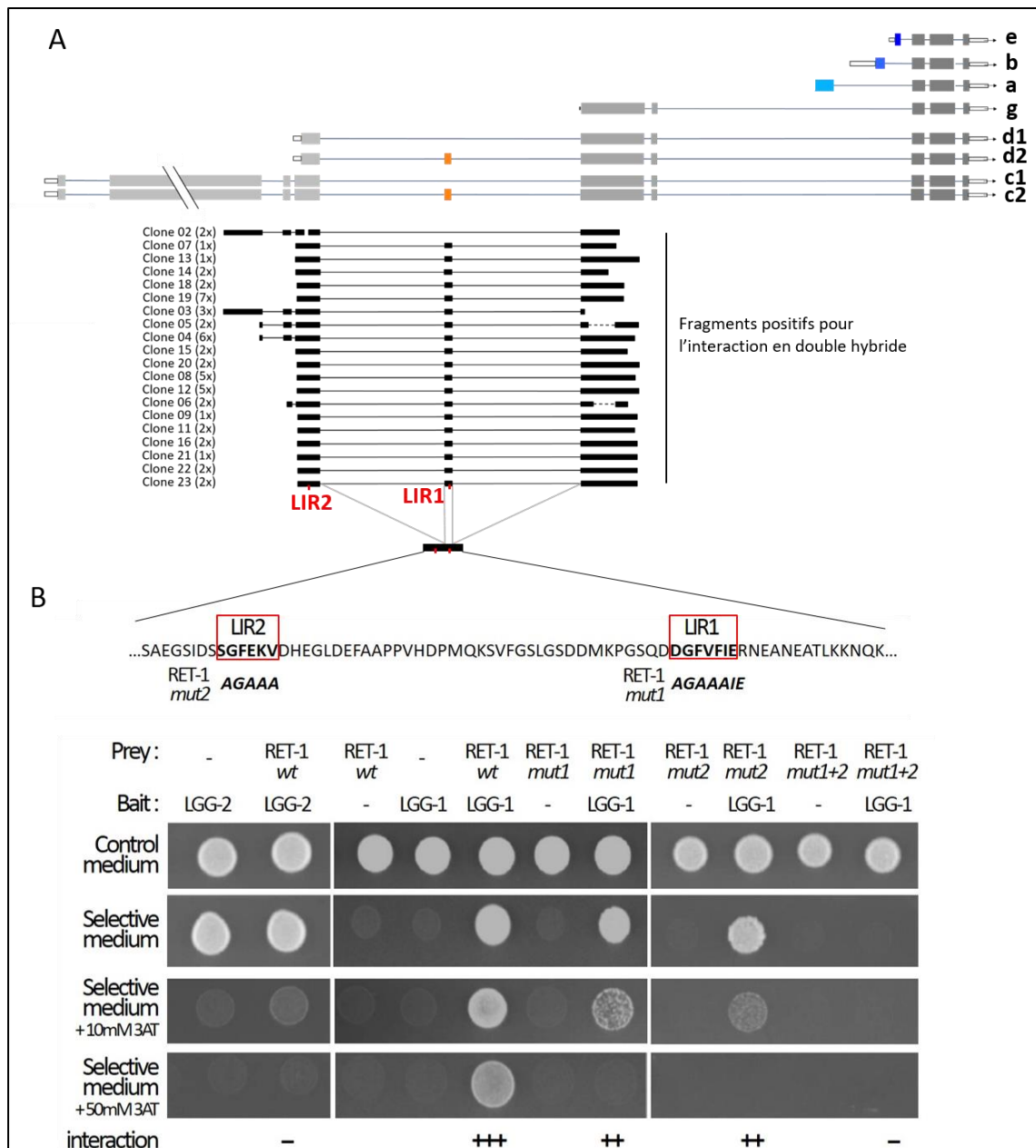


Figure 30 : Les isoformes C et D de RET-1 sont des interacteurs potentiels de LGG-1. (A) Représentation des différents transcrits avant épissage issus du locus *ret-1*. En noir, les différentes séquences exprimées chez la levure pour le crible double hybride, qui, exprimées, ont entraîné une interaction avec LGG-1. Deux LIR sont présents sur le fragment commun à tous les clones sauf deux. (B) Approche double hybride chez la levure avec le fragment sauvage, muté pour le premier LIR ou le second, ou bien les deux. L'interaction forte du fragment de RET-1 avec LGG-1 entraîne la croissance des levures même en forte concentration de 3AT (3-amino-1,2,4-triazole), inhibiteur compétitif du gène rapporteur de l'interaction. Avec l'un ou l'autre des LIRS mutés, l'interaction est toujours détectable mais la croissance des levures est affectée par la concentration croissante en 3AT. Les mutations conjointes des deux LIRs entraînent une perte d'interaction avec LGG-1 : les levures ne poussent pas. L'interaction testée avec LGG-2 conduit à une croissance même en absence du fragment de RET-1, suggérant une auto-activation de LGG-2.

Avant d'avoir analysé les données relatives à l'épissage alternatif de *ret-1*, nous avons utilisé pour notre interprétation des résultats, les prédictions indiquées par le site Wormbase. Celles-ci

indiquaient que seules les isoformes les plus longues, C, comportaient l'exon 5, et que dans les isoformes D, il était systématiquement épissé. Nous nous sommes donc intéressés en premier lieu aux isoformes C, et donc à leur rôle dans les cellules musculaires. L'identification récente, suite aux données de Denis Dupuy, d'une nouvelle isoforme intermédiaire D2, contenant également les deux LIR, nous permettant ainsi d'élargir à d'autres tissus notre analyse *in vivo* de l'interaction avec LGG-1.

- b- Obtention par CRISPR-Cas9 de souches de vers exprimant différentes isoformes de RET-1 fusionnées à des protéines fluorescentes, sous le contrôle des promoteurs endogènes.

Afin de générer de nouveaux outils indispensables à notre étude, nous avons utilisé la technologie CRISPR-Cas9 optimisée pour *C. elegans* (Paix *et al*, 2015). Par des stratégies différentes, nous avons obtenue trois souches exprimant : 1) GFP ::RET-1C où seule la forme longue C est fusionnée à la GFP, toutes les autres formes étant présentes mais non marquées, 2) panGFP ::RET-1 où toutes les isoformes sont fusionnées à la GFP en C-terminal, 3) GFP ::RET-1CD et mCherry ::RET-1CD, où seules les isoformes C et D sont marquées.

L'approche CRISPR-Cas9 consiste à utiliser un ARN guide qui par complémentarité va reconnaître une séquence spécifique en amont d'une séquence PAM (Protospacer adjacent motif), classiquement NGG. Le recrutement de la Cas9 dans ce complexe conduit à la coupure double brin trois paires de bases en amont du PAM.

Nous avons dans chaque cas utilisé le protocole de co-CRISPR pour *C. elegans*. Celui-ci consiste à injecter simultanément, dans la gonade d'animaux sauvages, la machinerie pour couper et réparer le locus d'intérêt avec la séquence désirée, ainsi que celle pour couper et réparer un locus rapporteur, *dpy-10*. La coupure double brin générée par l'action de la Cas9 peut conduire à une réparation aléatoire d'insertion délétion, via le mécanisme NHEJ (Non Homologous End Joining), ou utiliser l'ADN double brin servant comme modèle de réparation, par homologie des séquences flanquantes, pour conduire à une réparation homologue. Sur le locus *dpy-10*, la réparation aléatoire entraîne une mutation récessive conférant le phénotype « dumpy » (les animaux sont plus courts et plus épais), et la recombinaison homologue une mutation dominante conférant le phénotype « roller » (les vers ont un corps organisé en légère spirale, les faisant se déplacer en cercle). Ce marqueur phénotypique permet de repérer et de sélectionner, en première instance, les animaux pour lesquels la probabilité de coupure et de recombinaison au locus *dpy10* est la plus grande attestant ainsi de la bonne efficacité du système de réparation (Figure 29).

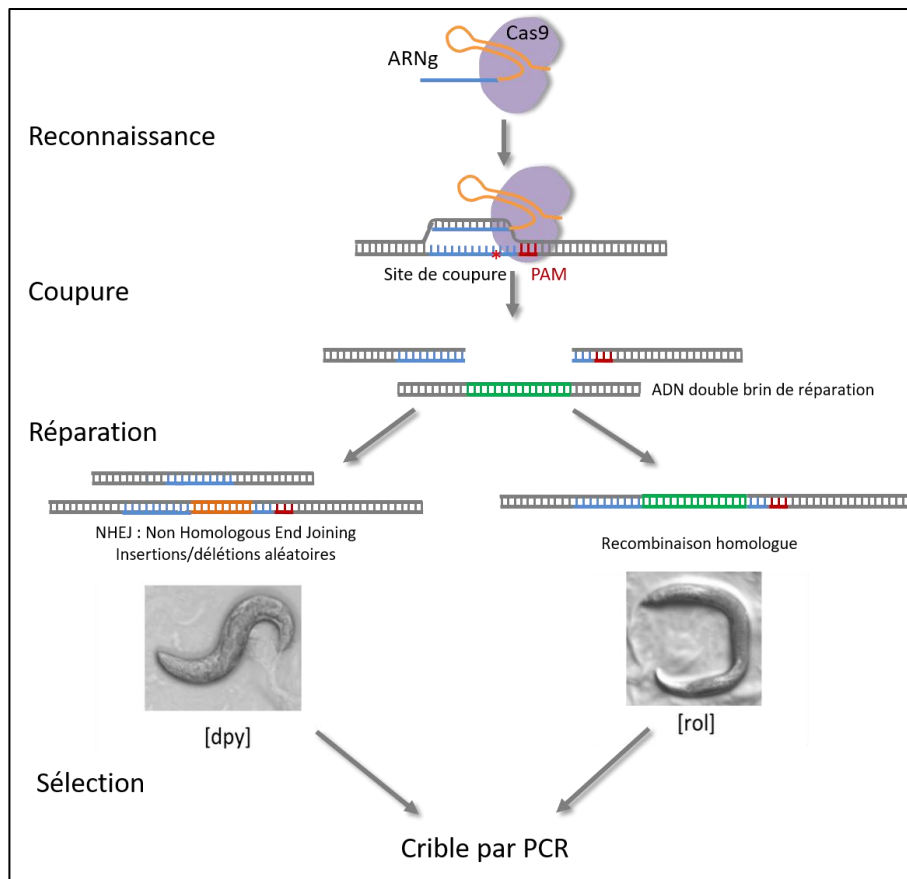


Figure 31 Approche de co-CRISPR chez *C. elegans*. La Cas9 est recrutée à la fois au locus *dpy-10* et au locus d'intérêt par les ARNguides présents dans le mixte d'injection. Elle reconnaît le motif PAM et clive l'ADN en coupure double brin. L'ADN double brin de réparation, par homologie, peut être utilisé pour réparer cette coupure, ou la machinerie de réparation va résoudre cette cassure par un mécanisme de NHEJ conduisant à des délétions et/ou des insertions aléatoires, entraînant souvent l'apparition de codon stop par insertion ou décalage de la phase de lecture. Au locus *dpy-10*, cela peut entraîner une mutation nulle, qui confère à l'état homozygote un phénotype dumpy [dpy]. La recombinaison homologue conduit à un phénotype [rol]. Parmi la génération issue de la ponte des animaux injectés dans les gonades, les animaux présentant des phénotypes sont sélectionnés. La probabilité chez ceux-ci d'avoir eu des événements de coupure au locus d'intérêt est plus grande. Ces événements sont repérés par PCR.

La première souche que nous avons générée est une souche exprimant GFP::RET-1C. Pour cela, j'ai utilisé différents outils de prédiction dans les exons spécifiques à cette isoforme. Même si aucun peptide signal n'est prédit dans la séquence de *ret-1*, j'ai choisi d'éviter l'extrémité N-terminale. J'ai recherché d'éventuels domaines transmembranaires, au nombre prédit d'un ou deux, en plus du RHD, et ai évité d'insérer la GFP à proximité (http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html). J'ai également évité les structures secondaires prédites (<http://bioserv.rpbs.univ-paris-diderot.fr/services/COUDES/>). Ces raisons m'ont conduit à insérer la GFP dans l'exon 2 de l'isoforme C (Figure 30).

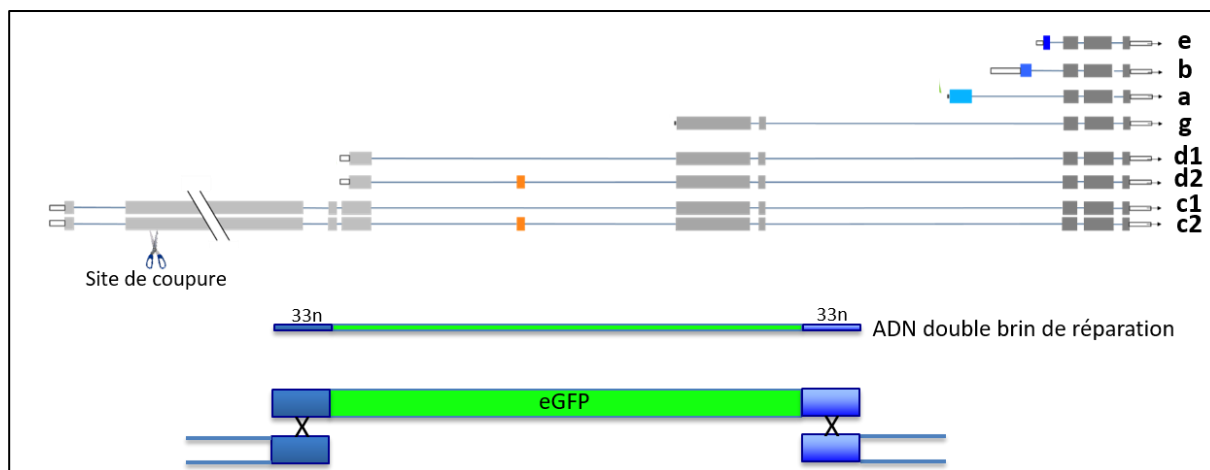


Figure 32 : Stratégie d'insertion de la GFP au locus RET-1 par CRISPR-Cas9, dans l'exon 2 spécifique des isoformes longues C, pour marquer spécifiquement celles-ci.

Cette souche nous a permis de décrire le patron d'expression de RET-1C, dans les cellules musculaires. Lors de cette approche, nous avons également observé des événements de NHEJ au locus conduisant à des erreurs de réparation et donc des mutations nous permettant d'isoler une souche correspondant à une délétion de 50 nucléotides, entraînant un décalage de la phase de lecture et l'apparition d'un codon stop. Nous avons donc obtenu un mutant spécifique de l'isoforme longue C de RET-1 n'affectant pas les autres isoformes.

Par la suite, nous avons inséré une GFP à l'extrémité C-terminale, commune à toutes les isoformes, pour les marquer toutes. Cette souche nous était indispensable car l'anticorps qui nous a été donné par Oegema et Audhya s'épuisait. Il nous fallait donc générer un outil afin de continuer à étudier ces protéines. Cette stratégie fut très délicate car nous souhaitions insérer la GFP au niveau du stop afin de ne pas perturber le domaine RHD situé en position C-terminale. L'absence d'un PAM proche du codon stop nous a fait adopter une stratégie particulière. Le seul PAM possible entraînant une coupure à 37 nucléotides du codon stop, nous avons utilisé un ADN double brin de réparation comprenant l'homologie nécessaire à la réparation, puis les 37 nucléotides dégénérés (afin d'éviter l'homologie), suivis de la GFP avec son codon stop et enfin la queue homologue correspondant à la séquence en aval du codon stop de *ret-1* (Figure 31). Ce construit conduit à l'expression de toutes les isoformes de RET-1 fusionnées à la GFP.

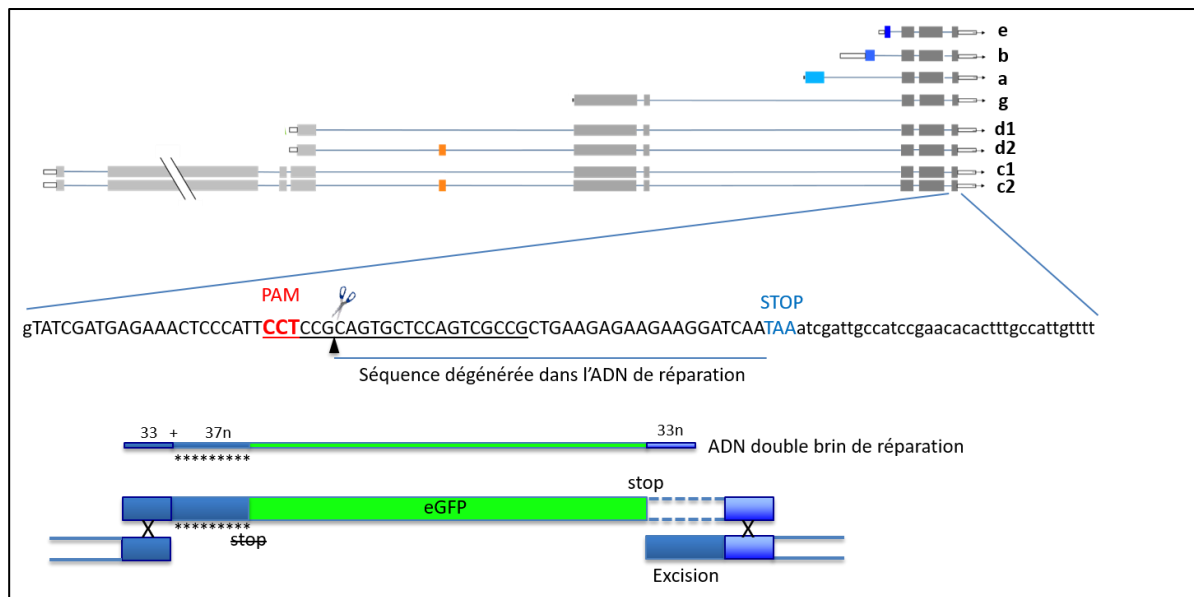


Figure 33 : Stratégie d'insertion de la GFP au locus RET-1 par CRISPR-Cas9, en C-terminal, pour marquer toutes les isoformes de RET-1.

La dernière souche exprimant RET-1 fusionnée à une protéine fluorescente que nous avons généré correspond à la construction de GFP::RET-1D. Pour ce faire, nous avons inséré la séquence correspondant à la GFP directement au site de coupure le plus proche de l'extrémité N-terminale de l'isoforme D (Figure 32).

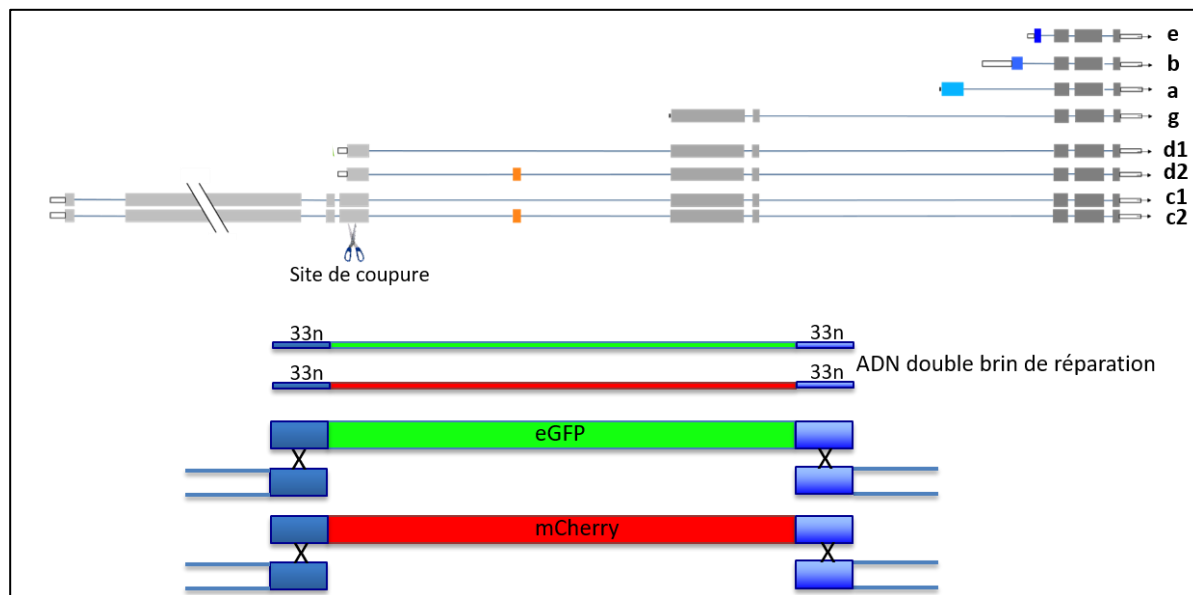


Figure 34 : Stratégie d'insertion de la GFP ou de la mCherry au locus RET-1 par CRISPR-Cas9, en N-ter des isoformes D, pour marquer spécifiquement les isoformes intermédiaires D et les longues C.

Nous avons co-injecté un ADN double brin de réparation contenant la séquence de la mCherry. Par cette approche, nous avons obtenu directement et en une injection, des souches exprimant

soit GFP::RET-1D soit mCherry::RET-1D. Cette approche fut également utilisée pour nos deux autres CRISPR mais sans pouvoir obtenir de vers marqué avec la mCherry.

Néanmoins, chez le nématode adulte, l'expression de la mCherry entraîne parfois la formation d'agrégats et/ou de fibrilles, ce que nous avons observé dans cette souche, la rendant inexploitable pour l'analyse de la localisation subcellulaire de RET-1 chez l'adulte. De plus, nous avons obtenu par cette approche une insertion de 125 nucléotides, entraînant l'apparition d'un codon stop et d'un décalage de phase de lecture. Dans cette souche, seules les isoformes C et D de RET-1 sont absentes.

En fonction de la complexité de l'approche, l'efficacité et ainsi la probabilité d'obtention de la souche désirée peut grandement varier. Les approches CRISPR pour obtenir des protéines de fusion avec les isoformes C ou D sont simples, l'insertion se faisant exactement au site de coupure, en utilisant une homologie de 33 nucléotides de part et d'autre de celui-ci afin de générer l'ADN double brin de réparation.

Le premier CRISPR (pour GFP::RET-1C) effectué nous a conduit à cloner 139 animaux avec des phénotypes dumpy ou roll, et par PCR nous avons observé 3 événements d'insertion correspondant à la GFP (717 nucléotides), deux délétions aléatoires de 50 et 174 nucléotides, et trois événements d'insertions de matériel aléatoire, combiné à la délétion de quelques nucléotides.

La génération de GFP::RET-1D a posé davantage de difficultés : nous avons dû répéter plusieurs fois les injections, les premières fois ayant entraîné l'apparition d'un faible nombre dans la descendance d'animaux avec un phénotype dumpy/roller, et n'ayant pas permis d'observer des événements d'insertion. Lors de l'expérience fructueuse, nous avons cloné 195 animaux avec un phénotype, parmi lesquels nous avons observé par PCR 8 insertions à la taille de la GFP/mCherry, et 6 insertions plus courtes. Les 8 insertions se révéleront, par séquençage, correspondre à 4 GFP et 4 mCherry.

La construction de panRET-1::GFP a impliqué l'insertion d'une partie C-terminale dont la séquence a été dégénérée, augmentant la taille de l'insert, et nous avons utilisé une homologie correspondant non directement à la séquence en bordure de coupure double brin, mais à une distance de 37 nucléotides. De cette façon, la réparation homologue pour obtenir la séquence d'intérêt nécessite également l'excision des 37 nucléotides flanquant la coupure double brin, réduisant la probabilité la réparation. L'approche opérée pour générer la souche exprimant

panRET-1::GFP, bien que plus complexe, nous a permis d'obtenir la souche désirée en une seule tentative. A partir de 167 animaux avec phénotype dumpy/roll clonés, nous avons observé par PCR 36 évènements d'insertion/délétion de tailles variables, suffisamment grands pour être repérés sur gel. Parmi ces évènements, un seul correspond à la taille de la GFP, qui sera confirmée par séquençage. Comparé à nos autres approches CRISPR-Cas9, sur les locus *ret-1* et *lgg-1* et *lgg-2*, ce nombre d'insertions/délétions suggère que la coupure double brin induite par la Cas9 a été particulièrement efficace à ce PAM. En revanche, la présence d'un unique insert d'intérêt parmi ceux-ci suggère une probabilité de réparation homologue réduite, probablement due à la stratégie que nous avons décidé d'adopter.

Les approches CRISPR-Cas9 nous auront ainsi permis de générer des outils clés dans notre étude du locus de *ret-1*. Cette technologie permet l'édition du génome de manière ciblée, et les limites inhérentes à celle-ci (comme la nécessité de la présence de PAM au niveau du site de coupure) peuvent être en partie contournées par des stratégies, qui peuvent cependant en réduire l'efficacité.

c- L'interaction entre LGG-1 et RET-1 conduit-elle à de la RE-phagie chez *C. elegans* ?

Nous avons cherché à mettre en évidence des évènements de RE-phagie chez le nématode. Les études chez la levure et les cellules de mammifère en culture mettent souvent en jeu des conditions particulières entraînant la fragmentation du RE, en particulier lors de condition de starvation induite combinée ou non à la surexpression des récepteurs de la RE-phagie. Je mentionnerai dans cette partie les différents moyens que nous avons mis en œuvre pour observer la fragmentation du RE et sa colocalisation avec les autophagosomes.

Nous nous sommes d'abord intéressés à l'isoforme c, car au départ notre étude, seul interacteur potentiel de LGG-1. Son patron d'expression, exclusivement dans les muscles le long du corps des nématodes (body wall muscles, BWM) dans les derniers stades larvaires et chez l'adulte, nous a conduit à nous intéresser particulièrement aux cellules musculaires. Dans un premier temps, j'ai cherché à observer, en conditions physiologiques contrôle, une colocalisation entre RET-1C et LGG-1. J'ai ainsi combiné par croisement les expressions de GFP::RET-1C et mCherry::LGG-1, provenant d'une souche également construite par une approche CRISPR-Cas9 au laboratoire. L'observation d'évènements de colocalisation entre le signal vert de GFP::RET-1C et des signaux correspondant à des structures ponctiformes positives pour mCherry::LGG-1,

est rendu difficile de par la présence d'un signal mCherry souvent agrégé ou sous formes de fibrilles dans les différents tissus du nématode adulte. Ces structures, rares dans la partie sarcoplasmique de la cellule, sont plus nombreuses dans le cytoplasme. De plus, le nombre de ces structures augmente lors du vieillissement de l'animal (observés jusqu'à 12 jours après atteinte de l'âge adulte), et en conditions de stress thermique (animaux placés 1h à 37°C puis observés après 1h de récupération).

J'ai plus particulièrement porté mon attention sur des colocalisations entre GFP::RET-1C et LGG-1 par immunohistochimie. L'immunolocalisation dans le nématode adulte est plus complexe que dans les embryons, et fait appel à des protocoles adaptés, notamment pour les cellules musculaires. Cependant, celui-ci ne permet pas la bonne préservation de toutes les structures cellulaires et présente certaines limites selon les anticorps utilisés. Les difficultés techniques ont rendu cette analyse difficilement exploitable malgré quelques événements de colocalisation très rares.

Pour essayer de visualiser ces colocalisations entre RE et autophagosomes, j'ai souhaité placer mes vers en conditions de stress afin d'induire soit un stress du RE conduisant à une fragmentation ou une modification de la structure du réseau ou soit une augmentation de l'autophagie.

Pour cela, j'ai utilisé une approche d'ARN interférent par feeding, classiquement utilisée chez *C. elegans*, permettant la déplétion des produits des gènes *unc-52* et *unc-112*, entraînant des défauts importants dans la structure et la fonction musculaire, perturbant notamment le réticulum sarcoplasmique. J'ai utilisé d'autres ARNi pour perturber le système endomembranaire (*rab-5*) ou la dégradation des protéines du RE (*cdc-48*). Dans ces conditions, la fragmentation du RE n'a pas été observée ni dans les muscle ni même dans les embryons. J'ai également utilisé des conditions de starvation, classiquement utilisée pour induire l'autophagie et la fragmentation du RE, par exemple dans des cellules humaines en culture. L'approche classique d'induction de la starvation chez *C. elegans* correspond à faire éclore des embryons dans un milieu sans nourriture et observer les effets de la starvation sur les larves L1. Dans celles-ci, le réseau de RE est très dense dans les cellules, empêchant l'appréciation des effets sur sa structure.

S'il existe une approche de transgénèse chez *C. elegans* permettant la surexpression, nous n'avons pas envisagé cette approche à cause de la très grande taille de l'ADNc correspondant à l'isoforme C (près de 10 000 paires de bases).

Enfin, par une approche généraliste, j'ai cherché à provoquer un stress UPR dans le RE par un moyen pharmacologique, la tunicamycine. Cet antibiotique bloque les N-glycosylations et entraîne un stress protéique dans le RE. Afin de détecter ce stress, j'ai utilisé une souche reportrice exprimant la GFP sous le contrôle du promoteur de *hsp-4* (Heat Shock Protein-4), dont l'expression est induite en cas de stress. Dans la littérature, cette souche a été utilisée avec succès pour détecter un stress du RE provoqué par la tunicamycine. J'ai testé différents moyens d'administration de cette drogue, d'abord tels que décrit dans la littérature, dans le milieu gélosé sur lequel les nématodes sont cultivés, dans une solution physiologique M9, mais aussi dans le tapis bactérien dont ils se nourrissent, avec des concentrations de 10 ou 50 µg/mL. Je n'ai pas réussi à reproduire les résultats obtenus avec cette souche reportrice. Il est possible que mon échec soit dû à différents paramètres comme par exemple un souci de stock de tunicamycine ou de souches reportrices. N'ayant pas poursuivi cette approche, il conviendrait sûrement de reprendre les investigations.

Ainsi, par ces différentes approches, nous n'avons pas pu clairement mettre en évidence des événements de colocalisation indiquant de la RE-phagie dans le muscle, ce qui souligne entre autres la difficulté d'étudier ce type d'évènements dans un organisme pluricellulaire complexe. De plus, la mise en évidence de l'isoforme D2, également interacteur potentiel de LGG-1, et exprimée de façon plus forte dans les neurones, et aussi dans l'épiderme, les cellules musculaires, et l'intestin, relativise l'intérêt de mettre au point des approches spécifiques pour les cellules musculaires.

Partie III : L'autophagie module l'exposition de la phosphatidylsérine et la dégradation du phagosome pendant l'apoptose via des fonctions spécifiques de GABARAP/LGG-1 et LC3/LGG-2

Cette étude a pour but d'étudier la contribution de l'autophagie, plus particulièrement des protéines LGG-1 et LGG-2, au cours d'un processus développemental consistant à dégrader les corps apoptotiques qui se forment lors de l'apoptose de certaines cellules. Ces corps apoptotiques sont dégradés par phagocytose, chez *C. elegans* par les cellules adjacentes, non spécialisées. Chez les mammifères, LC3 a été montrée comme impliquée dans la dégradation des corps apoptotiques, par un processus désigné comme le LAP (LC3-associated phagocytosis). Celui-ci correspond à une localisation rapide de LC3 au phagosome après internalisation de la cellule apoptotique, et en facilite la dégradation. Ce rôle est dépendant de certains acteurs de l'autophagie comme la machinerie de conjugaison mais indépendant d'autres, impliqués dans l'initiation. Ce processus n'entraîne par ailleurs pas la formation de vésicules à double membrane, LC3 étant lipidé directement au phagosome à simple membrane. Des vésicules à double membrane décorées par LC3 ont pourtant parfois été observées à proximité du phagosome, suggérant un rôle additionnel de l'autophagie au cours de ce processus.

L'utilisation de *C. elegans* comme modèle a permis d'étudier les rôles de LGG-1 et LGG-2, respectivement homologues des protéines de la famille GABARAP et de la famille LC3, au cours de ce processus.

a- LGG-1 est enrichi dans les corps apoptotiques et LGG-2 dans les cellules phagocytaires

Par des approches de microscopie sur des embryons vivants ou fixés, et en utilisant des marqueurs des membranes de la cellule apoptotique (CED-1) et du phagosome (CED-8), il a été montré que LGG-1 était présent à l'intérieur du corps apoptotique alors que LGG-2 était dans la cellule phagocytaire.

b- Les localisations de LGG-1 et LGG-2 dépendent de la voie autophagique canonique

Ces localisations observées dépendent de plusieurs acteurs de la machinerie autophagique : en cas de déplétion d'ATG-7, impliquée dans la conjugaison (lipidation aux membranes) de LGG-1 et LGG-2, de UNC-51 ou de BEC-1, impliquées dans l'initiation de l'autophagie, les localisations spécifiques de LGG-1 et LGG-2 sont perdues. De plus, des observations en microscopie électronique, ainsi qu'une approche de microscopie corrélative

(faisant correspondre le signal fluorescent obtenu au microscope à épifluorescence avec des structures observées en Microscopie électronique à Transmission - MET), ont permis d'associer LGG-1 à des vésicules d'environ 200nm dans les corps apoptotiques, et LGG-2 à des vésicules dans la cellule phagocytaire. Ces résultats suggèrent une implication de LGG-1 et LGG-2 au sein de processus autophagiques, et non dans le LAP.

c- LGG-1 et LGG-2 sont nécessaires pour la dégradation des corps apoptotiques

Le nombre de corps apoptotiques a été observé par microscopie à contraste interférentiel (DIC) dans des embryons contrôles ou dans des mutants nuls pour *lgg-1* ou *lgg-2* (ou les deux). Dans les contextes mutants, une augmentation significative de ce nombre a été observée, particulièrement en cas de déplétion en LGG-1. En outre, le double mutant ne présente pas davantage de corps que le simple mutant *lgg-1*. De plus, dans ces contextes, l'analyse dynamique de l'apparition et de la disparition des corps apoptotiques indique qu'il n'y a pas davantage de formation de corps, mais qu'ils sont observables plus longtemps. Ces résultats suggèrent que LGG-1 et LGG-2 ne sont pas directement impliqués dans les événements de mort cellulaire, mais dans la dégradation des corps apoptotiques.

d- LGG-1 est impliqué dans l'exposition de la phosphatidylsérine.

L'observation en DIC permet de déterminer si un corps apoptotique est phagocyté, et/ou dégradé. Il a donc été possible d'observer une augmentation du nombre de corps non phagocytés dans le mutant *lgg-1*, et une augmentation du nombre de corps phagocytés mais non dégradés dans le mutant *lgg-2*, suggérant un rôle de LGG-1 dans la phagocytose et de LGG-2 dans la maturation du phagosome.

Un signal important pour induire l'internalisation du corps apoptotique est l'exposition de la phosphatidylsérine (PS) à sa surface. Plusieurs rapporteurs de la PS ont été utilisés et ont permis de montrer que dans un contexte mutant *lgg-1*, la présence d'anneaux de PS autour des corps est réduite, mais pas dans le contexte mutant *lgg-2*, mettant en évidence un rôle de LGG-1 dans l'exposition de la PS.

e- LGG-2 est impliqué dans la fusion des lysosomes et du phagosome.

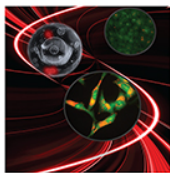
Ma contribution à ce projet à consister à déterminer l'implication de LGG-2 dans ce processus. J'ai donc mis au point et réalisé différentes approches de vidéo-microscopie. Tout

d'abord, j'ai observé, à l'aide de souches exprimant GFP::LGG-2 et mCherry::LGG-2, la corrélation entre apparition des signaux autour du corps apoptotique et l'apparition et la disparition du corps visible en DIC. A partir du moment où le corps apoptotique est bien visible, des points correspondant à LGG-2 sont observés à son pourtour. Dans le cas de la GFP, elle ne fluoresce plus dans un environnement acide, ainsi le signal disparaît au cours de la dégradation du corps apoptotique. Grâce à la mCherry, on observe l'internalisation du signal correspondant à LGG-2 : au cours de la dégradation du corps, le signal devient diffus. Ceci suggère que les vésicules positives pour LGG-2 fusionnent avec la membrane du phagosome au cours de sa maturation et que la mCherry est libérée dans la lumière du phagosome. Comme LGG-2 est impliquée dans la fusion entre autophagosomes et lysosomes via son interaction avec VPS-39, sous unité du complexe HOPS (Homeotypic fusion and protein sorting complex)(Manil-Segalen et al. Dev Cell 2014), la localisation de VPS-39, sa colocalisation avec LGG-2 et l'effet de sa déplétion sur la dégradation des corps apoptotiques ont été observés. VPS-39 est présent sous la forme d'anneau discontinu et de points aux corps apoptotiques, colocalise fréquemment avec LGG-2, mais peu avec LGG-1, et sa déplétion entraîne une augmentation du nombre de corps. De plus, des marqueurs lysosomaux ont été utilisés : NUC-1, ADNase luménale, et LAAT-1, protéine transmembranaire. NUC-1 colocalise partiellement avec LGG-2 aux corps apoptotiques, davantage qu'avec LGG-1. De plus, par vidéomicroscopie, j'ai observé la dynamique de LGG-2 et LAAT-1 au cours de la dégradation des corps apoptotiques. On observe le recrutement de LGG-2 en points au phagosome, puis de LAAT-1, d'abord en points, avec des régions de colocalisation avec LGG-2, puis en anneau uniforme, correspondant à la présence de LAAT-1 à la membrane du phagosome et donc à la fusion des lysosomes avec celui-ci. Ce processus est corrélé avec la dégradation du corps : j'ai observé la dynamique du signal LAAT-1 en corrélation avec l'état du corps apoptotique, et l'anneau de LAAT-1 se forme progressivement autour du corps visible, puis celui-ci disparaît en DIC, ce qui correspond à sa dégradation. L'analyse de la répartition des corps apoptotiques selon leur état de dégradation indique que dans le mutant *lgg-2*, LAAT-1 est moins présent aux corps apoptotiques et la dégradation en est retardée.

En conclusion, cette étude montre que LGG-1 et LGG-2 sont respectivement enrichis dans la cellule apoptotique et dans la cellule phagocytaire, de façon dépendante à la machinerie autophagique. De plus, LGG-1 a un rôle dans l'exposition de la phosphatidylsérine dans la cellule apoptotique, signal essentiel pour la phagocytose. Dans la cellule phagocytaire, les autophagosomes positifs pour LGG-2 sont impliqués dans l'interaction entre les lysosomes et le phagosome, et ainsi participent à la dégradation de ce dernier.

Publication

Autophagy mediates phosphatidylserine exposure and phagosome degradation during apoptosis through specific functions of GABARAP/LGG-1 and LC3/LGG-2.





Autophagy mediates phosphatidylserine exposure and phagosome degradation during apoptosis through specific functions of GABARAP/LGG-1 and LC3/LGG-2

Céline Jenzer, Elena Simionato, Céline Largeau, Vincent Scarcelli, Christophe Lefebvre & Renaud Legouis


To cite this article: Céline Jenzer, Elena Simionato, Céline Largeau, Vincent Scarcelli, Christophe Lefebvre & Renaud Legouis (2019) Autophagy mediates phosphatidylserine exposure and phagosome degradation during apoptosis through specific functions of GABARAP/LGG-1 and LC3/LGG-2, *Autophagy*, 15:2, 228-241, DOI: [10.1080/15548627.2018.1512452](https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1512452)

To link to this article: <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1512452>

 View supplementary material [↗](#)

 Accepted author version posted online: 30 Aug 2018.
Published online: 10 Sep 2018.

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

 Article views: 429

 View Crossmark data [↗](#)



Autophagy mediates phosphatidylserine exposure and phagosome degradation during apoptosis through specific functions of GABARAP/LGG-1 and LC3/LGG-2

Céline Jenzer*, Elena Simionato*, Céline Largeau, Vincent Scarcelli, Christophe Lefebvre, and Renaud Legouis

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

ABSTRACT

Phagocytosis and macroautophagy/autophagy are 2 processes involved in lysosome-mediated clearance of extracellular and intracellular components, respectively. Recent studies have identified the recruitment of the autophagic protein LC3 during phagocytosis of apoptotic corpses in what is now called LC3-associated phagocytosis (LAP). LAP is a distinct process from autophagy but it relies on some members of the autophagy pathway to allow efficient degradation of the phagocytosed cargo. We investigated whether both LC3/LGG-2 and GABARAP/LGG-1 are involved in phagocytosis of apoptotic corpses during embryonic development of *Caenorhabditis elegans*. We discovered that both LGG-1 and LGG-2 are involved in the correct elimination of apoptotic corpses, but that they have different functions. *lgg-1* and *lgg-2* mutants present a delay in phagocytosis of apoptotic cells but genetic analyses indicate that LGG-1 and LGG-2 act upstream and downstream of the engulfment pathways, respectively. Moreover, LGG-1 and LGG-2 display different cellular localizations with enrichment in apoptotic corpses and phagocytic cells, respectively. For both LGG-1 and LGG-2, subcellular localization is vesicular and dependent on UNC-51/ULK1, BEC-1/BECN1 and the lipidation machinery, indicating that their functions during phagocytosis of apoptotic corpses mainly rely on autophagy. Finally, we show that LGG-1 is involved in the exposure of the ‘eat-me signal’ phosphatidylserine at the surface of the apoptotic cell to allow its recognition by the phagocytic cell, whereas LGG-2 is involved in later steps of phagocytosis to allow efficient cell corpse clearance by mediating the maturation/degradation of the phagosome.

ARTICLE HISTORY

Received 28 June 2017
Revised 26 July 2018
Accepted 10 August 2018

KEYWORDS

Apoptosis; *Caenorhabditis elegans*; cell death; embryogenesis; LAP process; lysosome; phagosome; phosphatidylserine; VPS-39

Introduction

Apoptosis is an essential process involved in the elimination of excessive or damaged cells during tissue remodeling and homeostasis. Cells undergoing apoptosis are efficiently recognized and eliminated through a process called phagocytosis, which is performed by professional and/or nonprofessional cells. Phagocytosis is a dynamic multistep process, starting with the recognition of ‘eat-me’ signals exposed on the surface of apoptotic cells by specific cell-surface receptors leading to the internalization of apoptotic cells by phagocytic cells. The engulfing vesicle containing apoptotic cells, also called a phagosome, undergoes a maturation process, which results in the degradation of the dead cells. Efficient phagocytosis avoids the release of harmful contents in the surrounding area preventing tissue injury, inflammation and autoimmune diseases [1].

Recent studies have shown that autophagy, an intracellular degradation process, is involved in optimal clearance of apoptotic cells. In phagocytic cells, it has been shown that the autophagic protein LC3 rapidly decorates the phagosome formed upon engulfment of an apoptotic cell, facilitating the degradation of the internalized cell. This process termed LC3-associated phagocytosis (LAP) also occurs during phagocytosis of entotic cells and pathogens and modulates the immune response [2–4]. LAP shares common components with

classical autophagy such as the class III phosphatidylinositol 3-kinase (PtdIns3K) complex and elements of the ubiquitin-like conjugation system (ATG5, ATG7) [3–5]. Despite some similarities, LAP is a distinct process from classical autophagy because it does not rely on the autophagy preinitiation complex ULK, and seems to require the production of reactive oxygen species via NADPH oxidase [2,6,7]. LAP is also mechanistically different from classical autophagy, since for the former, LC3 is not associated to a double-membrane autophagosome, but recruited and lipidated to a single membrane phagosome [7]. However, LC3 double-membrane-positive vesicles were sometimes observed to localize around and fuse with the phagosome during phagocytosis of apoptotic cells and the pathogens *C. neoformans* and *M. marinum* [8,9]. These observations suggest that LC3 could also be recruited by sequential fusion of autophagosomes with the phagosome arguing for a more complex scenario in which LAP and autophagy can be co-opted for efficient degradation of the internalized cargo. Therefore, the respective contribution of these processes in the degradation of internalized cargo is not well understood and could depend on the types of phagocytic cells.

LAP was identified by analyzing LC3 localization [3], but nothing is known about the role of other mammalian orthologs of yeast Atg8 during LAP. The mammalian Atg8 ortholog

family is composed of at least 7 members grouped in 2 subfamilies, LC3 and GABARAP, based on evolutionary considerations. LC3 and GABARAP proteins are involved in various intracellular processes [10] and present specificities for cargo recognition [11,12]. To address the genetic and molecular functions of each of the 2 subfamilies, LC3 and GABARAP during phagocytosis of apoptotic cells, we used *C. elegans*, which possesses only one ortholog for each family, LGG-1/GABARAP and LGG-2/LC3 [13]. Recent studies have shown that, in *C. elegans*, autophagy proteins are involved in apoptotic cell degradation during embryonic and post-embryonic development [14–16]. Based on localization analysis, LGG-1 has been hypothesized to play a role during phagocytosis of apoptotic cells in embryos and larvae [2,16]. However, the specific functions of LGG-1 and LGG-2 have not been characterized. Here, we show that LGG-1 is required in apoptotic cells for the surface exposure of phosphatidylserine, while LGG-2 is involved, in the phagocytic cell, in the fusion between phagosome and lysosome to promote the degradation of engulfed apoptotic cells. Our data thus reveal 2 distinct roles of autophagy, in apoptotic versus phagocytic cells, to allow the engulfment and degradation of apoptotic cells during embryogenesis.

Results

LGG-1 is enriched in apoptotic corpses and LGG-2 in phagocytic cells

In a previous study, concerning the characterization of the specific roles of LGG-1 and LGG-2 upon fertilization in the early *C. elegans* embryo [13], we also have observed that the 2 proteins are expressed in apoptotic cells during late embryogenesis, which prompted us to further investigate their localization during cell death. In *C. elegans*, a large number of somatic cells die during embryonic development and these apoptotic cells are easily identified in living animals as highly refractive discs (hereafter called ACs, for Apoptotic Corpses) using differential interference contrast (DIC) microscopy [17,18].

We first analyzed the localization of endogenous LGG-1 and LGG-2 proteins using specific antibodies and identified the membrane of the engulfing phagosome with a CED-1::GFP fusion protein (Figure 1(a–c)), the membrane of the AC with CED-8::GFP (Figure 1(a,d,e)) and the nucleus of the AC with a GFP expression driven by the *egl-1* promoter (Fig. S1A). Both LGG-1 and LGG-2 were detected in puncta present at ACs but they displayed different localization patterns (Figure 1(b–e)). In particular, LGG-2 appeared to be enriched at the phagosomal

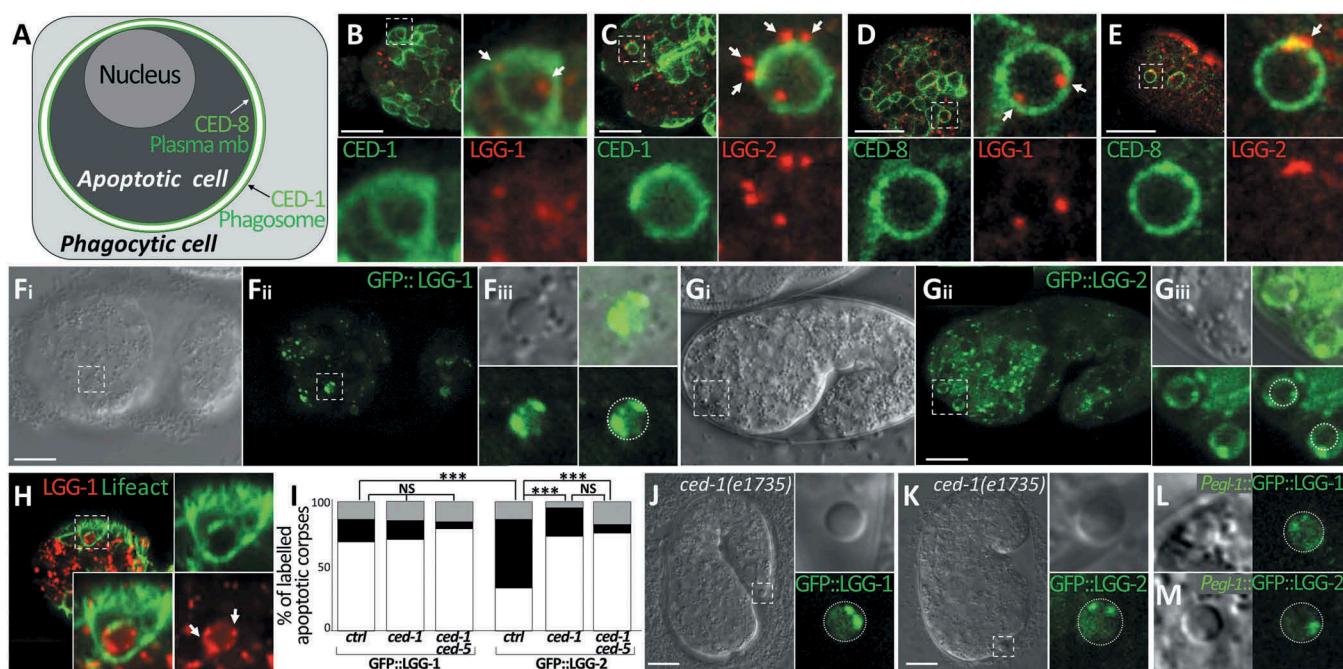


Figure 1. Lgg-1 localizes in puncta inside asc while Lgg-2 forms a peripheral discontinuous ring. (a) Schematic representation of phagocytic and apoptotic cells. P_{ced-8} ::CED-8::GFP fluorescence labels the plasma membrane of apoptotic cells and P_{ced-1} ::CED-1::GFP fluorescence decorates the phagosomal membrane within the phagocytic cell. (b to e) Confocal images of immunofluorescence staining of endogenous Lgg-1 (b and d) or Lgg-2 (c and e) in embryos expressing an apoptotic membrane GFP (CED-8) or the phagosomal protein CED-1::GFP. White arrows point to puncta present at asc. Insets are 6-fold magnifications of asc. Lgg-1 puncta are mainly present inside asc and Lgg-2 puncta are generally localized around phagosome. (f and g) Confocal images of live embryos expressing P_{lgg-1} ::GFP::LGG-1 (f) or P_{lgg-2} ::GFP::LGG-2 (g). Grayscale images are the corresponding DIC acquisitions. Insets (fiii and giii) are 3-fold magnifications of Lgg-1- or Lgg-2-positive asc and correspond to DIC, fluorescent and merge images. The dotted circles on fluorescence images show the outer limit of asc as determined by DIC. In the majority of cases, GFP::LGG-1 localizes in puncta (arrows) inside asc. GFP::LGG-2 is generally detected as a discontinuous ring around asc (53.2%). (h) Confocal images of P_{lgg-1} ::mCherry::LGG-1 forming puncta within asc. P_{ced-1} ::GFP::lifect labels the actin-enriched halo formed during engulfment of asc. Insets are 3-fold magnifications. White arrows show puncta present in asc. (i) Quantitative analysis of the localization of GFP::LGG-1, GFP::LGG-2 at AC in control, *ced-1(e1735)* and *ced-1(e1735) ced-5(RNAi)* (n > 48) (white, black and gray boxes represent the percentages of dotted, peripheral ring and other patterns, respectively). Chi-squared test analysis *** P value < 0.0001. (j and k) Confocal and DIC images of P_{lgg-1} ::GFP::LGG-1 (j) and P_{lgg-2} ::GFP::LGG-2 (k) expressed in *ced-1(e1735)* embryos. Insets show an extruded AC, which outer limit (determined by DIC) is indicated by the dotted circle. Extruded cell corpses do not present GFP::LGG-2 peripheral rings but only internal puncta. (l and m) AC-driven expression using P_{egl-1} ::GFP::LGG-1 (l) and P_{egl-1} ::GFP::LGG-2 (m) shows no peripheral ring. White line shows the outer limit of asc as determined by DIC.

membrane rather than inside the ACs (Figure 1(c)). However, because immunofluorescence, necessitating the use of fixed tissues, is incompatible with DIC analysis for scoring of ACs, we then analyzed functional GFP::LGG-1 and GFP::LGG-2 proteins in living embryos (Figure 1(f–i) and S1B) [13]. Using P_{lgg-1} ::GFP::LGG-1 and P_{lgg-2} ::GFP::LGG-2 transgenic strains, we confirmed that both LGG-1 and LGG-2 localize at embryonic ACs. LGG-1 and LGG-2 labeled 58% ($n = 100$) and 53% ($n = 208$) of ACs, respectively, but they presented different localization patterns. Indeed, GFP::LGG-1 localization was mostly detected in puncta inside AC (Figure 1(f) quantification in I), which was confirmed using mCherry::LGG-1 (Figure 1(h) and S1B). Conversely, although GFP::LGG-2 also formed puncta inside ACs, this protein was mainly present at the periphery of ACs forming a discontinuous ring (Figure 1(g) quantifications in I).

To confirm that LGG-1 puncta mainly localize inside ACs, and LGG-2 puncta around the phagosome, we examined whether GFP::LGG-1 and GFP::LGG-2 localizations are modified in *ced-1(e1735)* mutant and *ced-1(e1735) ced-5(RNAi)* animals [19]. In the absence of CED-1, a receptor involved in apoptotic cell recognition, or CED-5, an ortholog of the human protein DOCK1/DOCK180, the phagocytosis of ACs is strongly affected and several non-engulfed corpses were found floating between the embryo and the eggshell (called extruded corpses). Our analysis of *ced-1(e1735)* and *ced-1*

(*e1735) ced-5(RNAi)* embryos demonstrated that the localization of GFP::LGG-1 was not modified in internal and extruded corpses (Figure 1(i,j) and S1C). However, the presence of the LGG-2 peripheral ring was strongly decreased in internal ACs and was not detected in extruded cell corpses (Figure 1(i,k) and S1C), indicating that this particular localization corresponds to the phagosome formed during the phagocytosis of ACs. This conclusion was further supported by the finding that GFP::LGG-1 and GFP::LGG-2 expression driven specifically in apoptotic cells using the *egl-1* promoter did not lead to formation of a peripheral ring in ACs (Figure 1(l,m)).

LGG-1 and LGG-2 localization is dependent on the canonical autophagy pathway

We then asked whether LGG-1 and LGG-2 localization is related to LAP or autophagy. First, to address whether LGG-1 and LGG-2 dots correspond to vesicles, we analyzed GFP::LGG-1 and GFP::LGG-2 localization using Correlative Light and Electron Microscopy (CLEM) (Figure 2(a,b) and S2A–D) and immuno-EM (Figure 2(c,d) and S2E,F). GFP::LGG-1 puncta within ACs could be associated with vesicular structures of about 200 nm (Figure 2(a,c)). However, ACs were very dense and dark and we were not able to determine whether these LGG-1-positive vesicles had 2 membranes.

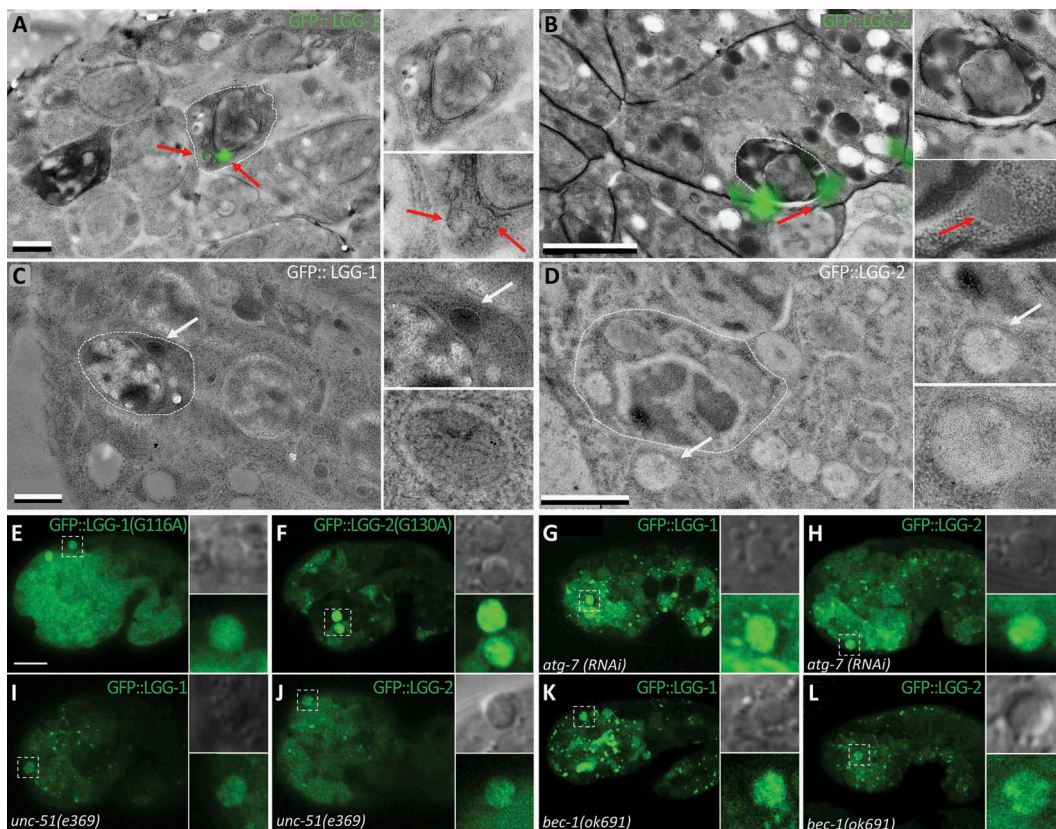


Figure 2. Lgg-1 and Lgg-2 localization at AC is dependent on canonical autophagy. (a and b) CLEM of GFP::lgg-1 (a) and GFP::lgg-2 (b) at asc. A lgg-1-positive vesicle (red arrow) is present within the AC (dark roundish cell surrounded by white dotted line), while lgg-2-positive vesicles are outside the AC in the phagocytic cell. Scale bars: 1 μ m. (c and d) Immuno-EM images of GFP::lgg-1 (c) and GFP::lgg-2 (d) at asc using an anti-GFP antibody. White arrows point to gold beads. Scale bars: 1 μ m. (e and f) Confocal images of GFP::lgg-1^{G116A} (e) and GFP::lgg-2^{G130A} expressed in embryos (f). These mutated forms of lgg-1 and lgg-2 are unable to be conjugated. GFP is diffuse in asc and no rings are observed (insets are 3-fold magnifications). (g–l) Confocal images of P_{lgg-1} ::GFP::lgg-1 (g, i, k) and P_{lgg-2} ::GFP::lgg-2 (h, j, l) in *atg-7(RNAi)* (g and h), *unc-51(e369)* (i, j), and *bec-1(ok691)* (k, l) mutant embryos. Higher magnifications of AC are shown in insets. Both lgg-1 and lgg-2 localization is mainly diffuse and no peripheral ring is visible. Scale bar for E to F: 10 μ m.

EM analysis of GFP::LGG-2 revealed vesicles around engulfed AC (Figure 2(b,d)). Second, we tested whether LGG-1 and LGG-2 localization is dependent on conjugation of these proteins to phosphatidylethanolamine, a lipid present in autophagic membranes. We used previously-characterized mutations of the glycine residue involved in lipidation [13,20] and observed that localization of GFP::LGG-1^{G130A} (n = 30) and GFP::LGG-2^{G130A} (n = 15) was largely diffuse and cytosolic in ACs (Figure 2(e,f)). This result indicates that LGG-1 and LGG-2 puncta are not aggregates, but rather correspond to vesicular localization. Third, we tested whether this vesicular localization was dependent of the autophagy pathway by depleting either ATG-7, a protein involved in LGG-1 and LGG-2 conjugation, or the UNC-51/ULK1 kinase and BEC-1/BECN1/Vps30/Atg6 which are involved in autophagy initiation. In *atg-7(RNAi)* embryos, LGG-1 (55%, n = 68) and LGG-2 (61%, n = 38) localization was diffuse in ACs (Figure 2(g,h)). In *unc-51(e369)* embryos, a majority of ACs presented a fully diffuse localization of LGG-1 (51%, n = 33) and LGG-2 (63%, n = 16) and their localization pattern in other ACs showed very few puncta (Figure 2(i,j)). In *bec-1(ok691)* embryos, a diffuse pattern was observed in 88% of LGG-1-positive ACs (n = 59) and 81% of LGG-2-positive ACs (n = 16) and no LGG-2 AC peripheral rings were detected (Figure 2(k,l)). These observations indicate that LGG-1 and LGG-2 puncta localization in ACs is dependent on canonical autophagy.

Altogether, these data show that, LGG-1 and LGG-2 localize in autophagic structures in ACs and at the phagosome, respectively, suggesting that LGG-1 and LGG-2 may exert different functions during apoptosis and phagocytosis of ACs.

LGG-1 and LGG-2 are required for the clearance of apoptotic corpses

To investigate the roles of LGG-1 and LGG-2 during AC formation and phagocytosis, we tested whether their loss of function affects the number and behavior of dying cells. Because embryonic apoptosis is perfectly stereotyped during *C. elegans* development, we decided to systematically score the number of ACs using DIC microscopy, at embryonic stages during which numerous cell death events occur (comma and 1.5 fold stages, 460 to 500 min after fertilization). In the null mutants, *lgg-1(tm3489)* and *lgg-2(tm5755)* [13], an increased number of ACs was observed (Figure 3(a-d); quantifications in E) but *lgg-1; lgg-2* double-mutants did not display a more severe phenotype than single mutants. This indicates that LGG-1 and LGG-2 act in the same pathway for clearance of ACs, but are dispensable for induction of cell death. We confirmed that these phenotypes are directly linked to *lgg-1* and *lgg-2* mutations since expression of P_{lgg-1}::GFP::LGG-1 and P_{lgg-2}::GFP::LGG-2 transgenes was able to rescue the number of ACs (Fig. S1D). Then, to investigate whether the higher number of ACs in *lgg-1* and *lgg-2* mutants was due to an increase in cell death events or a delay in cell corpse clearance, we performed time lapse microscopy experiment and scored the total number of ACs formed during 200 min after the appearance of the first AC. During this period of time, we did not find any significant difference in the total

number of ACs and the time of their appearance, in *lgg-1*, *lgg-2* or double-mutant embryos compared to the wild type (Figure 3(f)). In contrast, the mean duration of ACs was higher in *lgg-1*, *lgg-2* and double-mutant embryos compared to the wild type (Figure 3(g)). These findings indicate that LGG-1 and LGG-2 are not involved in the cell death process itself but are important for efficient clearance of ACs.

In order to assess whether LGG-1 and LGG-2 function specifically in AC engulfment, we analyzed the genetic interactions between *lgg-1*, *lgg-2* and the engulfment pathways genes. Phagocytosis of ACs requires at least 2 molecular pathways, the CED-10/RAC1 and the CED-1/MEGF10 pathways, which regulate actin rearrangements and extension of the plasma membrane, respectively [21]. Mutations in genes involved in each pathway result in an increased number of ACs with an additive effect when both pathways are affected. To determine if *lgg-1* and *lgg-2* functions could be placed in the engulfment cascade, we constructed double-mutant strains between engulfment genes (CED-10 and CED-1 pathways) and *lgg-2(tm5755)* or *lgg-1(RNAi)* and scored for the number of ACs (Figure 3(h)). If *lgg-1* or *lgg-2* acts in the same genetic pathway with engulfment genes, we expected no additive effect on the number of ACs. Loss of *lgg-1* enhanced the engulfment defects in all mutant backgrounds tested for both the CED-1 and CED-10 pathways, while loss of *lgg-2* did not affect the number of ACs when either pathway was inhibited. These results suggest that LGG-1 acts upstream of both engulfment pathways, while LGG-2 functions through both pathways, in agreement with their respective localization in ACs and at the phagosome. Rescue experiments using specific promoters revealed that the expression of GFP::LGG-1 in ACs can rescue the number of ACs in the *lgg-1(tm3489)* mutant (Fig. S1D), while the expression of GFP::LGG-2 in phagocytic cells can partially rescue the number of ACs in *lgg-2(tm5755)* mutant (Zheng Zhou, personal communication).

Altogether, these results indicate that LGG-1 and LGG-2 are not involved in programmed cell death but they promote the phagocytosis or degradation of AC, by acting in the AC and in the phagocytic cell respectively.

LGG-1, but not LGG-2, is involved in phosphatidylserine exposure

DIC analyses of *lgg-1* and *lgg-2* null mutants revealed a moderate increase of ACs indicating that the clearance process might be slower than in the wild type but not blocked altogether (Figure 3(a-e)). To further characterize the aspect of ACs in embryos mutants for *lgg-1* and *lgg-2*, we next performed transmission electron microscopy (TEM). Based on AC shape, the presence of an encircling membrane, and the aspect of the nucleus, we classified ACs in 3 categories: non-engulfed, engulfed-undegraded, degraded (Figure 4(a-c), quantifications in D, Fig. S3). We first compared the wild type and well-characterized mutants of engulfment (*ced-1; ced-5*) [22] or degradation (*lst-4; snx-1*) [23]. As expected, TEM of the *ced-1(e1735); ced-5(n1812)* engulfment mutant shows a strong increase in the number of non-engulfed ACs. *lst-4(tm2423); snx-1(tm847)* mutant embryos do not present a significant increase of engulfed-undegraded ACs (Figure 4(d)). In *lgg-1*

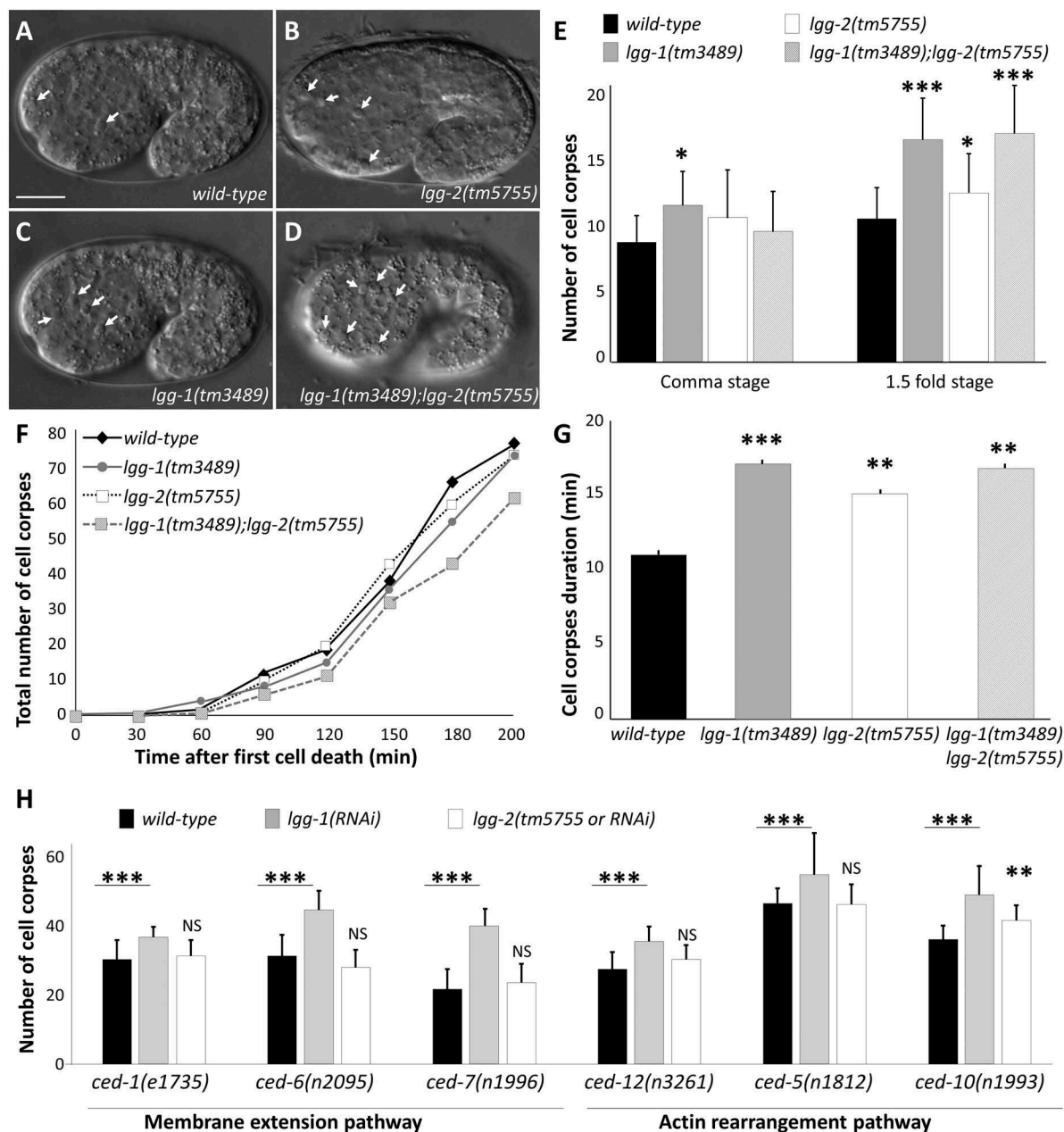


Figure 3. Igg-1 and Igg-2 are involved in the clearance of asc. (a to d) DIC images of the wild type (a), *lgg-2(tm5755)* (b), *lgg-1(tm3489)* (c) and *lgg-1(tm3489);lgg-2(tm5755)* (d) mutant embryos. Arrows indicate cell corpses. Scale bar: 10 μ m. (e) Quantification of the mean number of AC visible in comma and 1.5 fold embryos corresponding respectively to 430 and 460 min of development after fertilization. Error bars represent standard deviation (n = 20). Wilcoxon Mann-Whitney test analysis * P value < 0.05, *** P value < 0.0005. (f) Four-dimensional analysis in wild-type, *lgg-2(tm5755)*, *lgg-1(tm3489)* and *lgg-1(tm3489);lgg-2(tm5755)* embryos, of the number of cell death events occurring during the 200 min following the appearance of the first AC. The y-axis indicates the cumulative number of cell death events (average of 3 embryos for each genotype). The differences are not statistically significant. (g) The mean duration of 30 cell corpses was calculated for triplicates for each indicated genotype. Student t test analysis ** P value < 0.001, *** P value < 0.0001. (h) The mean number of persistent cell corpses was scored in double mutant embryos for *lgg-1* or *lgg-2* and membrane recruitment or actin rearrangement mutants and compared with that in single mutants. Error bars represent the standard deviation, n \geq 15, Wilcoxon-Mann-Whitney test analysis * P value < 0.005, *** P value < 0.0005.

(*tm3489*) embryos, a slight decrease in degraded ACs was observed, suggesting a global delay in the phagocytosis process. However, *lgg-2* mutants accumulate engulfed ACs demonstrating that LGG-2 is dispensable for engulfment step of phagocytosis but involved in maturation of the phagosome (Figure 4(d)).

Elimination of ACs by phagocytic cells involves 2 steps: first, rapid engulfment involving actin polymerization and membrane extension, and then slow maturation of the phagosome which involves the sequential recruitment of proteins at the membrane

and fusion with the endo-lysosomal system resulting in the degradation of ACs [24]. To confirm which step of the process is affected in *lgg-1* and *lgg-2* mutants, we used a series of fluorescent-based reporters, CED-1, ACT-5, 2XFYVE, and RAB-7, which decorate the phagosome at various stages of the phagocytic process (Figure 4(e-h) and S4A-D, quantifications in I). A difference in the number of phagosomes labeled with these markers in the mutant vs. wild type gives an indication as to which step of phagocytosis is affected. The moderate reduction of endosomal markers in absence of LGG-2 suggested a maturation defect of the

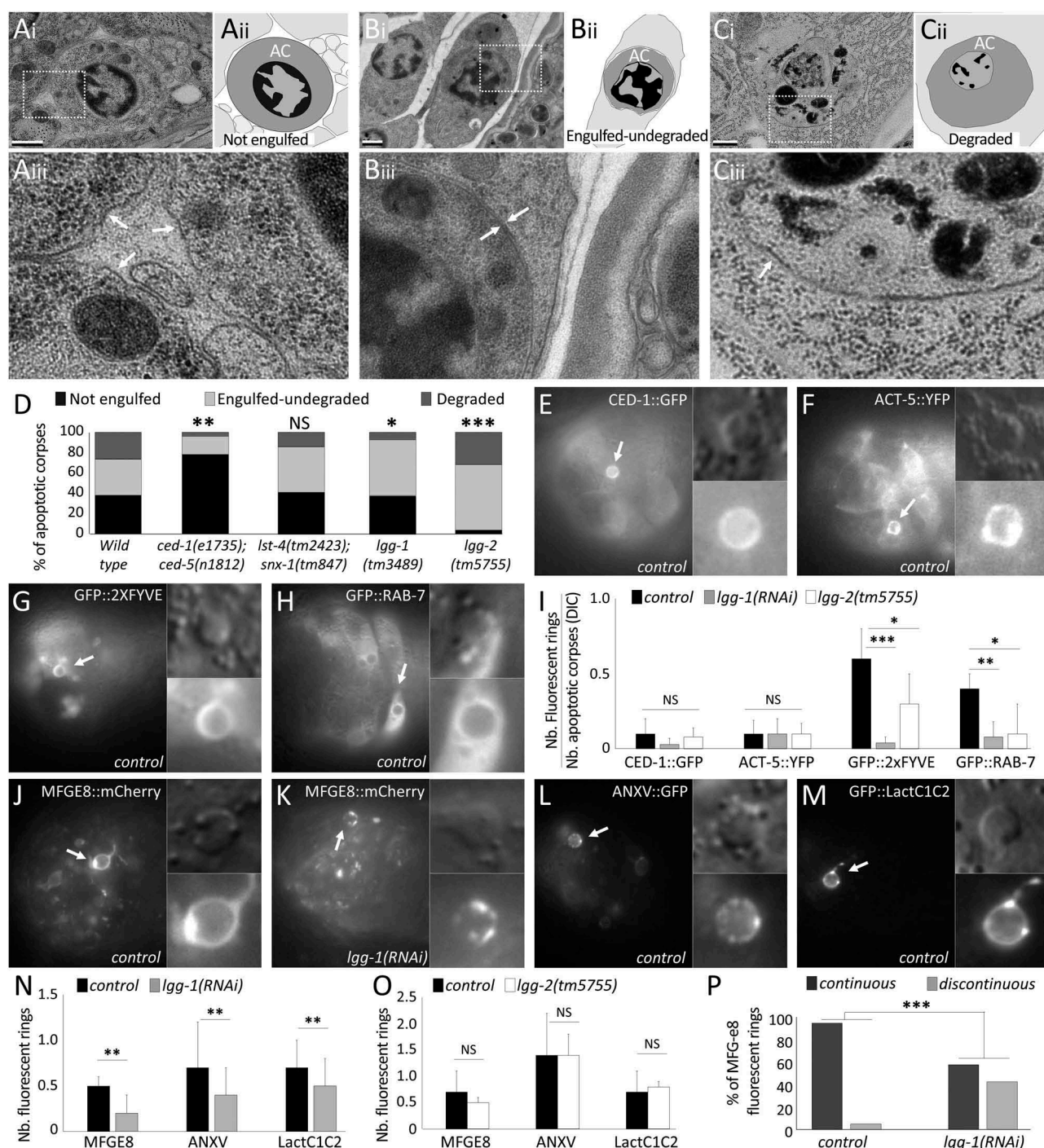


Figure 4. *Igg-1* but not *Igg-2* is involved in phosphatidylserine exposure on AC. (a to c) Transmission electron microscopy images of cell corpses in embryos and their corresponding schematic representations (a ii, b ii, c ii). a ii, b ii, c ii are 3-fold magnifications of the boxed areas showing the membranes surrounding asc (white arrows). Not engulfed asc (a) are easily detected, presenting a dark nucleus, a single surrounding membrane and spaces between neighboring cells. Undegraded-engulfed asc (b) are surrounded by 2 membranes, the cell corpse membrane and the phagosomal membrane. Degraded asc (c) are irregular with a disorganized nucleus and one single surrounding membrane. Scale bar: 0.5 μ m. (d) Quantification of the percentages of the 3 categories of asc in the wild-type as well as in the *ced-1;ced-5* phagocytosis mutant ($n = 45$), *lst-4;snx-1* lysosomal fusion mutant ($n = 29$), *lgg-1* ($n = 27$) and *lgg-2* ($n = 47$) mutant embryos. Fisher test analysis of the distribution of the 3 classes * P value < 0.07, ** P value < 0.005, *** P value < 0.0005. (e to h) Epifluorescence images of embryos expressing the GFP reporters of AC phagocytosis CED-1::GFP (e), ACT-5::YFP (f), GFP::2xFYVE (g) and GFP::RAB-7 (h). Arrows indicate cell corpse positive for the reporters and magnified in the insets. Scale bar: 10 μ m. (i) Quantification of phagocytosis reporters expression levels in control, *lgg-1(RNAi)* and *lgg-2* mutant embryos. Data represent the ratio between the number of GFP rings and the number of asc visible by DIC. Error bars represent the standard deviation ($n \geq 10$). Wilcoxon Mann-Whitney test analysis * P value < 0.05, ** P value < 0.005, *** P value < 0.0005. (j to m) Epifluorescence images of PS fluorescent sensor reporters MFG-e8::mCherry (j,k), ANX::GFP (l) and GFP::Lact (m) in wild-type (j,l,m) and *lgg-1(RNAi)* (k) embryos. Fluorescent asc indicated by arrows are magnified in insets. (n and o) Quantification of PS fluorescent reporter recruitment in control, *lgg-1(RNAi)* or *lgg-2* mutant (o) embryos. Data represent the ratio between the number of fluorescent rings and the number of asc as determined by DIC. Error bars represent the standard deviation ($n \geq 10$). Wilcoxon Mann-Whitney test analysis * P value < 0.05, ** P value < 0.005. (p) Percentage of asc labelled by MFG-e8 with a continuous or discontinuous fluorescent ring in control and *lgg-1(RNAi)* embryos. $n \geq 30$ cell corpses, Fisher test analysis *** P value < 0.0005.

phagosomes. In contrast, in *lgg-1* mutant embryos, we observed a strong reduction in the number of phagosomes labeled with endo-lysosomal markers, suggesting that the engulfment process was reduced. CED-1 and actin, which are transient markers of engulfment, were present in few phagosomes and the slight decrease observed in *lgg-1* mutant embryos is not statistically significant (Figure 4(e,f) quantifications in I). So, engulfment was further analyzed in *lgg-1* mutant embryos by detection of the ‘eat-me’ signal phosphatidylserine (PS) at the surface of ACs. We used 3 well-characterized PS reporters, MFG8/milk-fat-globule-EGF-E8 (MFG8::mCherry) (Figure 4(j,k)), ANXA5/annexin V (referred to as ANXV::GFP hereafter) (Figure 4(l)), and the GFP::LactC1C2 which corresponds to 2 domains of mammalian MFG8 fused to a synthetic signal sequence (Figure 4(m)) [25–27]. In *lgg-1* but not *lgg-2* mutants, we observed significantly fewer PS reporter fluorescent rings than in the wild type, indicating a specific function of LGG-1 for PS exposure (Figure 4(n,o) and S4E to J). Moreover, we observed that almost half of the ACs in *lgg-1* but not in *lgg-2* mutant embryos have a discontinuous MFG-e8::mCherry ring (Figure 4(k), quantifications in P) supporting an abnormal PS exposure in absence of LGG-1.

Recent data have determined that the transmembrane protein CED-8/Xkr8 is essential for promoting PS externalization in ACs [25,28,29]. To analyze if LGG-1 functions together with CED-8, we first examined CED-8::GFP expression in control and *lgg-1(RNAi)* embryos (Figure 5(a–d)) and observed no differences, suggesting that LGG-1 is not involved in CED-8 localization at the plasma membrane of ACs. We then hypothesized that if LGG-1 mediates CED-8 activity, their depletion should result in a similar phenotype. *ced-8(n1891)* mutant embryos are characterized by less ACs with a majority of extruded corpses, while extruded ACs are not present in *lgg-1(RNAi)* embryos (Figure 5(e,f)). Moreover, the depletion of both CED-8 and LGG-1 results in a combination of *ced-8* and *lgg-1* phenotypes, with more ACs compared to *ced-8(n1891)*, but the same ratio of extruded versus internal ACs (Figure 5(g,h)). These data indicate that LGG-1 and CED-8 are acting in different pathways for engulfment of ACs.

Together, these findings show that LGG-1 and LGG-2 have distinct functions during the phagocytosis and degradation of ACs. LGG-1 appears to be involved in mediating PS exposure, allowing AC recognition by phagocytic cells, while LGG-2 may act at a later step of phagosomal maturation.

LGG-2 is involved in the fusion between lysosome and phagosome

To investigate the function of LGG-2, we performed time-lapse analysis of GFP::LGG-2 puncta in the phagocytic cell. The formation of GFP::LGG-2 puncta was observed concomitantly with the apparition of the characteristic button-like morphology of ACs visible by DIC (Figure 6(a) and Movie 1). The puncta persisted for several minutes around the ACs and then disappeared (Figure 6(a), 0 to 6 min). Because GFP fluorescence may be quenched by acidification of phagosomes during maturation, we also performed time-lapse analysis using an mCherry::LGG-2 (Figure 6(b) and Movie 2). mCherry::LGG-2

presented a punctate localization forming a discontinuous ring around the phagosome (Figure 6(b), 8 min). Then, mCherry::LGG-2 became progressively diffuse within the phagosome (Figure 6(b), 12 to 18 min), which correlated with the degradation of the AC, as observed by DIC. These data strongly suggested that LGG-2-positive vesicles were fusing with the membrane of the phagosome during its maturation and that mCherry was released in the phagosomal lumen. Next, we addressed the function of LGG-2 during late steps of maturation/degradation of the phagosome. We have previously demonstrated that during a selective autophagy process, LGG-2 mediates the fusion between autophagosomes and lysosomes via its interaction with VPS-39, a specific subunit of the homeotypic fusion and protein sorting complex [13]. We investigated whether LGG-2 could have a similar function during phagosome maturation in phagocytic cells and at which precise step it could be involved. We first asked whether VPS-39 is recruited at ACs in 1.5 fold stage embryos. By using $P_{vps-39}::VPS-39::mCherry$ transgenic strain, we observed localization of VPS-39 at 63.9% of ACs (n = 155) forming discontinuous rings with some dots at the level of phagosomes (Figure 6(c)). To analyze if VPS-39 is involved in the degradation of ACs, we quantified the number of ACs visible by DIC in *vps-39(tm2253)* mutant and *vps-39(RNAi)* embryos. In both of these contexts, the number of ACs is higher compared to the control, showing that VPS-39 is involved in the degradation of ACs in *C. elegans* embryos (Figure 6(d)). Because VPS-39 presents a similar localization pattern as LGG-2 around ACs, we then analyzed its colocalization either with LGG-2 or LGG-1 by crossing the $P_{vps-39}::VPS-39::mCherry$ strain with either $P_{lgg-2}::GFP::LGG-2$ or $P_{lgg-1}::GFP::LGG-1$ strains and analyzing descendants using confocal microscopy. Analysis of ACs shows that colocalization was frequently detected between VPS-39 and LGG-2, but rarely between VPS-39 and LGG-1 (Figure 6(e,f)). Moreover, quantitative analysis of the colocalization using Manders coefficient, indicates that VPS-39 overlaps 2.8-fold more with LGG-2 than with LGG-1 (Figure 6(i)). These results suggest that LGG-2 could be involved in the fusion between autophagosomes and lysosomes through an interaction with the HOPS protein VPS-39. Further verification of this hypothesis was carried out using a similar colocalization analysis between LGG-2 or LGG-1 and a specific marker of the lysosome, the intraluminal DNase NUC-1. Analysis of ACs reveals that partial colocalization was often detected between NUC-1 and LGG-2, but less frequently between NUC-1 and LGG-1 (Figure 6(g,h)). In addition, Manders quantification of the colocalization indicates that NUC-1 overlaps 2.0 fold more with LGG-2 than LGG-1 (Figure 6(i)). We then analyzed the dynamic of LGG-2 recruitment concomitantly with LAAT-1 (Figure 6(j) and Movie 3), a transmembrane protein of the lysosome, which decorates the membrane of the phagosome upon fusion with lysosomes. The recruitment of LGG-2 puncta at the phagosome starts before the fusion of LAAT-1-positive lysosomes, but regions of colocalization are observed, suggesting a specific role for LGG-2 in the fusion between phagosomes and lysosomes. To check this hypothesis, we performed time lapse observations of LAAT-1::mCherry and DIC, to monitor the final maturation of the phagosomes (Figure 6(k) and Movie 4). Before interaction with lysosomes, ACs were visible by DIC

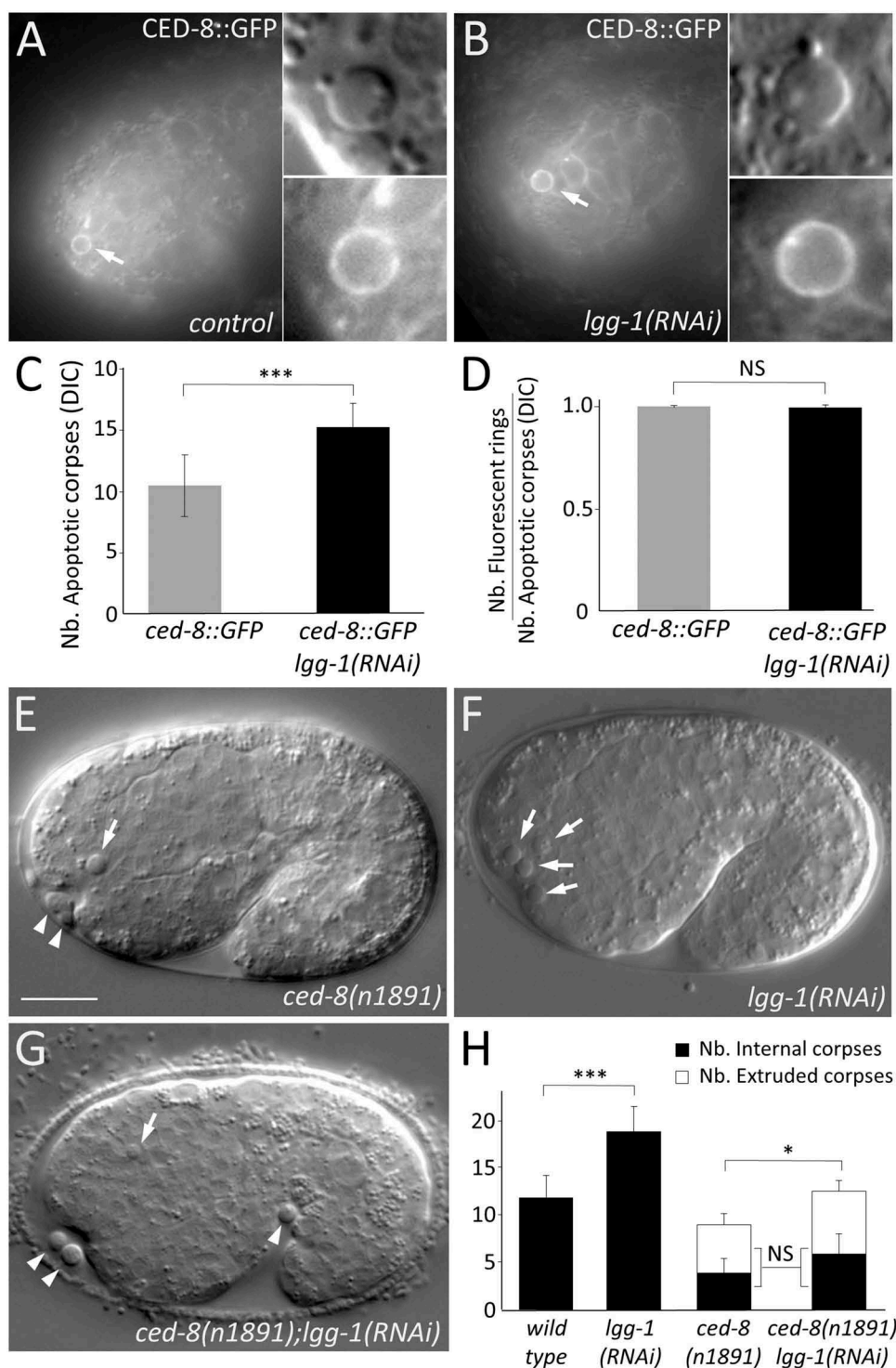


Figure 5. *Igg-1* function in AC is not dependent of CED-8. **(a and b)** Epifluorescence images of CED-8::GFP in control (a) and *lgg-1(RNAi)* embryos (b). White arrows indicate the ring localization of CED-8::GFP at the plasma membrane of an AC which is magnified in the insets. **(c)** Quantification of the mean number of asc in control ($n = 13$) and *lgg-1(RNAi)* ($n = 23$) embryos indicates that expressing CED-8::GFP does not affect the number of asc (compare with Figure 3). Wilcoxon Mann-Whitney test analysis *** P value < 0.0001 . **(d)** Quantification of CED-8::GFP in control ($n = 13$) and *lgg-1(RNAi)* ($n = 23$) embryos indicates that the depletion of *Igg-1* does not affect CED-8::GFP localization. Data represent the ratio between the number of GFP rings and the number of asc visible by DIC, Fisher test analysis. Error bars are standard deviation. **(e to g)** DIC images of *ced-8(n1891)* mutants (e), *lgg-1(RNAi)* (f) and *ced-8(n1891);lgg-1(RNAi)* (g) embryos. White arrows indicate cell corpses. White arrowheads indicate extruded cells. Scale bar: 10 μm . **(h)** Quantification of the mean number of asc and extruded cells in WT, *lgg-1(RNAi)*, *ced-8(n1891)* and double *ced-8(n1891);lgg-1(RNAi)* 1.5 fold embryos ($n = 13$, 12 and 20 respectively). Depletion of *Igg-1* does not modify the fraction of extruded asc of *ced-8(n1891)* (Chi-squared test). Error bars are standard deviation. Total number of asc have been analyzed by Wilcoxon Mann-Whitney test * P value < 0.05 , *** P value < 0.0001 .

as button-like structures without a LAAT-1 ring (category 1). ACs still visible by DIC but also decorated by LAAT-1 indicated early stages of phagosome-lysosome fusion (category 2). Finally, in a third category, ACs were no longer visible by DIC

due to their degradation by lysosomal enzymes, but phagosomes were labelled with LAAT-1. We quantified the 3 categories in control and *lgg-2* mutant embryos (Figure 6(l)). In absence of LGG-2, we observed an increase in the first category

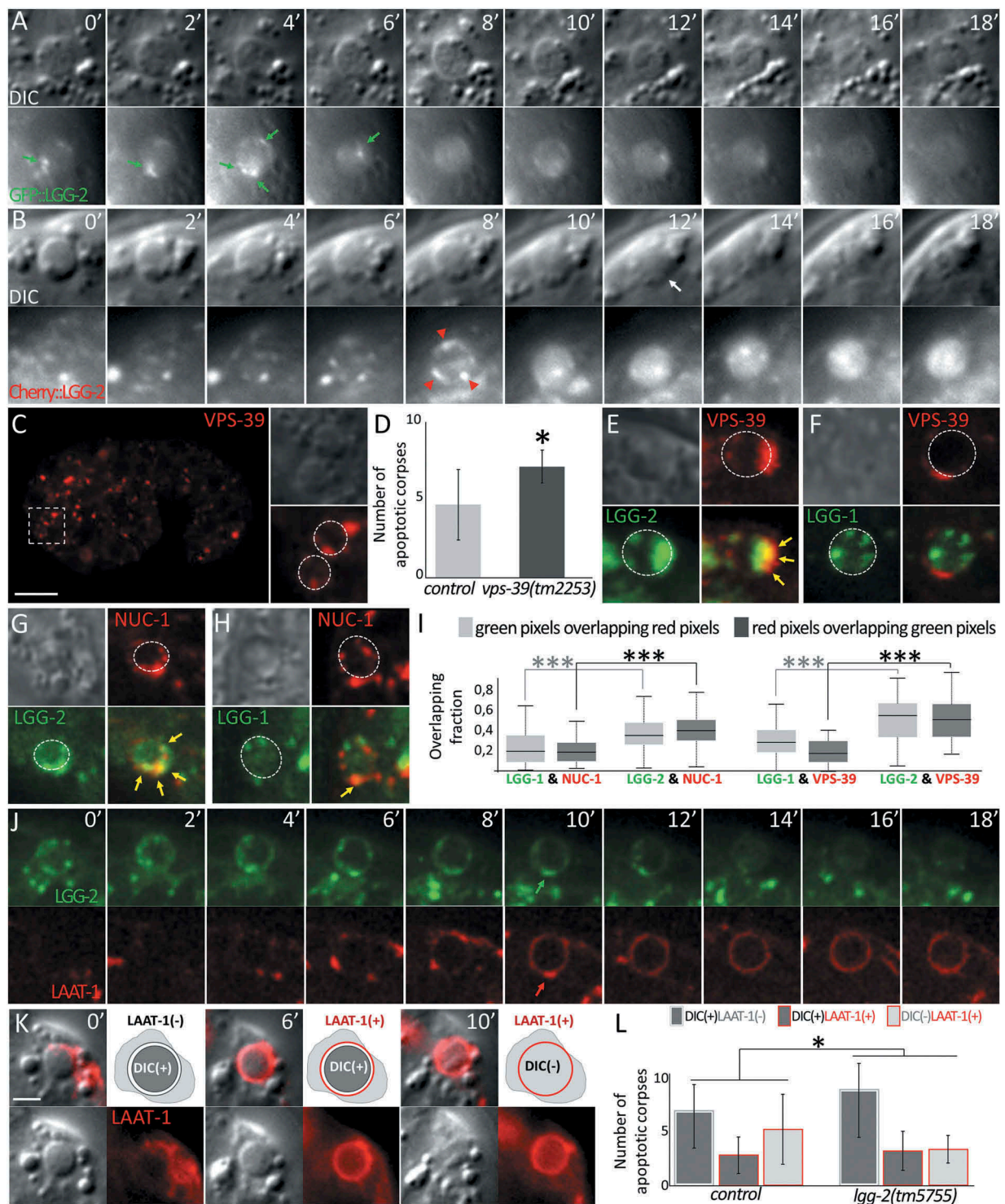


Figure 6. Igg-2 is involved in the interaction between phagosomes and lysosomes. **(a and b)** Time-lapse analysis of $P_{lgg-2}::GFP::lgg-2$ (a) and $P_{lgg-2}::mCherry::lgg-2$ (b) distribution around embryonic asc. Green arrows point to GFP::lgg-2 puncta observed first around the AC then disappearing. mCherry::lgg-2 is first observed as puncta that form a discontinuous ring around the AC (red arrows 8 min) and finally as a diffuse signal inside the phagosome (12 to 18 min). Apparition of the diffuse mCherry signal is concomitant with the degradation of the AC as observed by DIC (white arrow). Images are excerpted from Movies 1 and 2. **(c)** Confocal images of mCherry::VPS-39 expressed in live embryos. Insets are 2.5-fold magnifications of asc in DIC and mCherry fluorescence. White dotted lines in mCherry inset delimit the contours of asc as determined by DIC. Scale bar: 10 μ m. **(d)** Quantification of the mean number of asc in control and *vps-39(tm2253)* embryos ($n = 10$ for control and $n = 19$ for *vps-39*). Error bars are standard deviation. Wilcoxon Mann-Whitney test analysis (P value $* < 0.05$). **(e to h)** Confocal images of asc showing the localization of VPS-39::mCherry (e,f) or NUC-1::mCherry (g,h) and that of either GFP::lgg-2 (e,g) or GFP::lgg-1 (F,H) at the level of the same asc. In the fluorescent images, white dotted lines represent the outer limits of asc as determined by DIC, and yellow arrows point to colocalization. **(i)** Box-plots of the colocalization between Igg-1 and NUC-1 ($n = 67$), Igg-2 and NUC-1 ($n = 66$), Igg-1 and VPS-39 ($n = 27$), Igg-2 and VPS-39 ($n = 42$). Overlapping fractions between green and red pixels correspond to Manders coefficients. Welch Two Sample t test analysis (P value $*** < 0.001$). **(j)** Time-lapse analysis of a GFP::lgg-2 and LAAT-1::mCherry-positive AC. The formation of a GFP::lgg-2 discontinuous ring is detected first and overlaps with the recruitment of LAAT-1::mCherry (6 min). Images are excerpted from Movie 3. **(k)** Time-lapse analysis of a LAAT-1::mCherry-positive AC. The AC is first visible in DIC and negative for LAAT-1::mCherry (0 min), then visible in DIC and positive for LAAT-1::mCherry (6 min) and finally the AC disappears in DIC but remains positive for LAAT-1::mCherry (10 min). For each category, top left image is the merge and bottom pictures are split DIC and mCherry. Images are excerpted from Movie 4. Scale bar: 2 μ m. **(l)** Quantification of the 3 categories of AC in control or *lgg-2(tm5755)* embryos. Chi-squared test analysis (P value $* < 0.05$).

and a decrease of the third category, indicating that late maturation of the phagosome was delayed. These data demonstrate that LGG-2 is involved in the fusion between phagosome and lysosome, which is necessary for the degradation of ACs.

Discussion

Our study revealed that in the *C. elegans* embryo, autophagy plays different and successive roles in the process of phagocytosis of ACs and revealed functional specificities for LGG-1/GABARAP and LGG-2/LC3 ortholog families of yeast Atg8 (Figure 7). LGG-1 and LGG-2 are enriched within the AC or at the phagosome, respectively, both localizations are being dependent on the canonical autophagy pathway. Our data demonstrate that in the apoptotic cell, LGG-1 is involved in the exposure of PS in parallel to CED-8, which is essential for recognition by engulfing cells. In the phagocytic cell, LGG-2 autophagosomes are implicated in the interaction between lysosomes and the phagosomal membrane, to allow efficient AC clearance.

In *C. elegans* larvae, a previous study reported that GFP::LGG-1 was detected at the phagosome during phagocytosis of ACs, but the consequence of depleting LGG-1 was not addressed [16]. We did not observe such recruitment in the embryo but it is possible that the process differs, depending on the stage of development and the phagocytic cells. Our genetic approach using mutants and RNAi demonstrates a role for LGG-1 in PS exposure, but we cannot exclude a later contribution that could be masked by its early function. Interestingly, a similar role for autophagy on PS exposure has also been described during mouse development [30,31] and in human microvascular endothelial cells [32]. Studies on mice raised the hypothesis that autophagy

allows the production of an energy supply essential for switching PS in the plasma membrane. Our observation indicates that involvement of autophagy in death signal exposure is a feature common to various species. However, in *C. elegans*, blocking autophagy delays the degradation of AC but does not result in a severe defect, suggesting that compensatory mechanisms exist during the process.

Conversely, our results on LGG-2/LC3 are consistent with those of other studies performed in mammals showing that the recruitment of LC3 allows efficient acidification of phagosomes containing ACs or pathogens [2–4]. To our knowledge, no individual characterization of members of LC3 and GABARAP families has been reported. We describe here a specific role for LGG-2/LC3 during phagosomal maturation and propose that it participates to the interaction between 3 compartments, the phagosomal membrane, the autophagosome and the lysosome. LGG-2-positive autophagosomes colocalize with lysosomal vesicles at the vicinity of the phagosome, and depletion of LGG-2 delays the maturation of the phagosome. Our data indicate that autophagosomes interact with the phagosomal membrane, but we cannot exclude that autophagosomes are also fusing with lysosomes before the interaction with the phagosome. The interaction between LGG-2 and VPS-39 has already been implicated in the formation of autolysosomes during mitophagy [13], suggesting that this tethering function could be a general feature of LGG-2.

The localization of LGG-2 at the single membrane of the phagosome is reminiscent of the LAP process [2,3], but 2 lines of evidence do not support that the process observed here is LAP. First, LGG-2 is not forming a regular ring at the phagosome but rather a discontinuous dotted pattern consistent with the fusion of LGG-2-positive vesicles. Second, the phagosomal

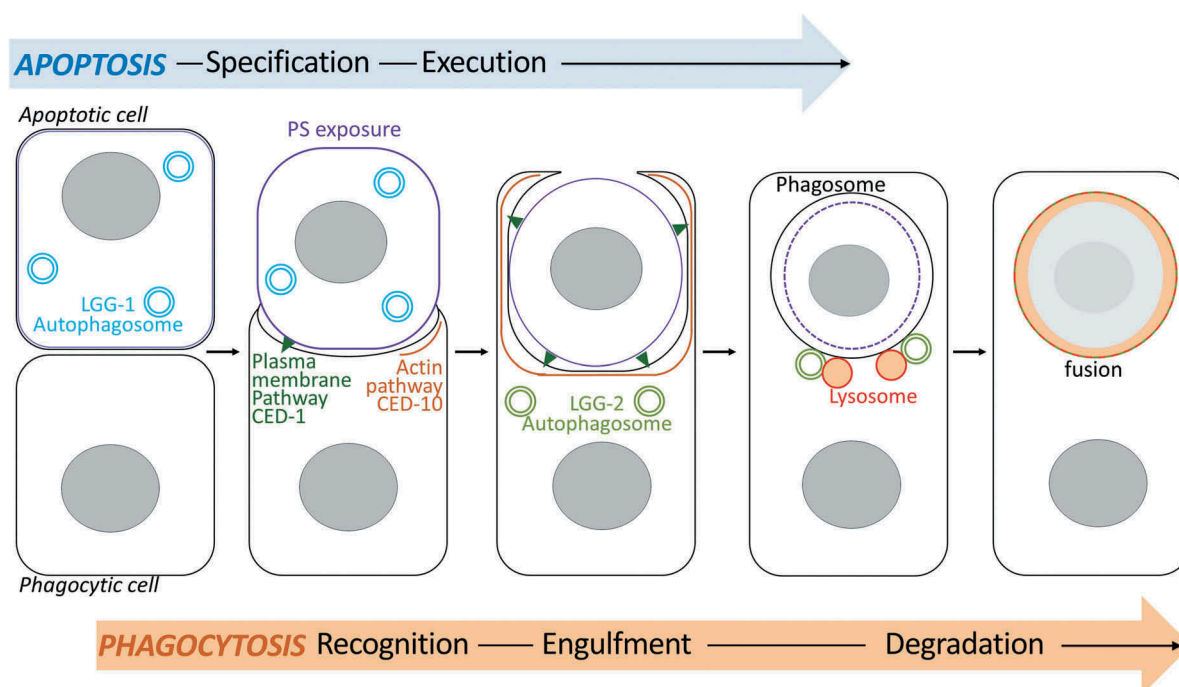


Figure 7. Schematic model of the dual role of autophagy during phagocytosis of apoptotic cells. The model illustrates the involvement of lgg-1 and lgg-2-positive autophagosomes during the phagocytosis of asc in *C. elegans* embryos. lgg-1 is enriched in the apoptotic cell and is involved in the exposition of PS at the plasma membrane. In the phagocytic cell, lgg-2 autophagosomes are implicated in the fusion between the phagosome and lysosomes to allow efficient AC clearance.

localization of LGG-2 is dependent on the autophagy proteins UNC-51, ATG-7, and BEC-1. In regards to recent publications, LAP appears to cover rather heterogeneous processes [33]. The localization of LC3 proteins on the phagosomal membrane could result from direct recruitment by lipid conjugation or fusion with LC3-positive vesicles. For instance, Kageyama and colleagues, have first observed a localization of LC3 as puncta and then in a fluorescent ring on single membrane vesicles containing Salmonella [34]. These puncta do not seem to be autophagosomes because they are formed independently of ATG9A, RBICC1/FIP200 or PtdIns3K. Very recently, autophagy dependent LC3-positive puncta fusing with phagosomes have been described in mouse kidney cells [35]. The complete sequestering of a phagosome by autophagosomes has also been reported. Because of the complexity of the LAP process which could in certain conditions act in collaboration with autophagy, the identification of membrane compartments by EM remains essential. Our analyses in *C. elegans* confirmed the presence of a single membrane phagosome around the ACs and support a model of fusion of LGG-2-positive autophagosomes with the phagosomal membrane.

There are still some questions to address concerning the precise role of LGG-2/LC3 and autophago-lysosome during phagocytosis of ACs in *C. elegans*. In particular, it would be of interest to identify whether specific signaling pathways are involved during this process. LC3-associated phagocytosis has been mainly studied in specialized phagocytic cells, where it implicates a signaling dependent on Toll-like receptors and nitrogen oxide NOX [4,7]. In *C. elegans* phagocytosis is performed by non-specialized phagocytic cells and no true CYBB/NOX2 homolog is present [36]. One possibility is that a coordinated recruitment of autophagosomes and lysosomes is important to degrade efficiently the particularly large AC-containing phagosome.

Materials and methods

C. elegans strains

Nematode strains were grown on nematode growth media (NGM) plates (50 mM NaCl [Sigma-Aldrich, 60,142], 0.25% bacto-peptone [Becton-Dickinson, 211677], 5 µg/ml cholesterol [Sigma-Aldrich, C8667], 2% bacto agar [Becton-Dickinson, 214010] autoclaved and supplemented with 1 mM CaCl₂ [Sigma-Aldrich, C3306], 1 mM MgSO₄ [Sigma-Aldrich, M5921], 20 mM KH₂PO₄ [Sigma-Aldrich, P5655] 1 M, 3.3 mM K₂HPO₄ [Sigma-Aldrich, 60356]) and fed with *Escherichia coli* strain OP50 (Caenorhabditis Genetic Center) [37]. The *C. elegans* Bristol N2 strain was used as a wild-type strain. Genotypes of all the strains used in this study are listed in Table S1. To score ACs labelled with ANXV::GFP or GFP::LACTC1C2, embryos were grown at 20°C and then incubated at 33°C for 45 min followed by a recovery at 20°C for 2 h. The quantification is the ratio between the number of DIC corpses and the fluorescent rings regardless of cell morphology.

Plasmid constructions and transgenic strains

To generate the *P_{egl-1}::gfp::lgg-1* and *P_{egl-1}::gfp::lgg-2* fusion constructs, the genomic sequence of *gfp::lgg-1* from pPD117.01 and

gfp::lgg-2 from pRD117 [20] were placed under the control of the regulatory region of *egl-1* from the pBC99 plasmid (gift from Zheng Zhou). The *P_{lgg-1}::mCherry::lgg-1* construct was generated by polymerase chain reaction amplification of the *mCherry* sequence from PID02 [13] and replacement of the *gfp* sequence by this *mCherry* sequence in PPD117 vector. The plasmids containing *P_{egl-1}::gfp::lgg-1*, *P_{egl-1}::gfp::lgg-2* and *P_{lgg-1}::mCherry::lgg-1* were injected into N2 worms together with the dominant roller injection marker *pRF4 [rol-6(su1006)]* to generate extrachromosomal transgenic lines. The *P_{lgg-1}::gfp::lgg-1G116A* construct was obtained by site-directed mutagenesis. Transgenic integrated lines were generated by microparticle bombardment of *unc-119(ed3)* worms [13]. The RD372 (*lgg-2(pp112)[mCherry::lgg-2]*) strain was obtained by a CRISPR-CAS9 (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-CRISPR-associated 9) approach, using a *dpy-10* co-CRISPR protocol [38]. *mCherry* was inserted in-frame 13 nucleotides after the beginning of exon 1 and the insertion was verified by sequencing.

RNA-mediated interference

RNAi by feeding was performed as described previously [39,40]. Fourth-larval stage (L4) animals or embryos were raised on NGM plates containing 1 mM isopropyl-D-b-thiogalactopyranoside (Sigma-Aldrich, EU0008-CIPTG dioxane free; IPTG) and 25 µg/ml carbenicillin (Euromedex, 1039) and seeded with bacteria (*E. coli* HT115[DE3]) carrying the empty vector L4440 (pPD129.36) as a control or the bacterial clones from the J. Ahringer library, Open Biosystem (*vps-39*: JA:TO8G5.5, *lgg-1*: JA:C32D5.9, *lgg-2*: JA:ZK593.6, *atg-7*: JA:M7.5). RNAi phenotypes of F1 generation embryos were scored one day after the beginning of egg laying by F0 adults.

Immunofluorescence

Embryos were prepared for antibody staining by freeze-fracture and methanol fixation at -20°C (30 min) as described previously [41]. After a saturation step with 1X PBS (0.137 M NaCl, 0.27 mM KCl [VWR, 26764.298], 0.1 mM final Na₂HPO₄·12H₂O [Sigma-Aldrich, 50876], 0.180 mM KH₂PO₄, containing 5% milk [‘Régilait’]) and 0.5% Tween20 (Sigma-Aldrich, P9416) for 40 min and 2 washing steps in 1X PBS Tween 20 0.5%, samples were incubated in 1X PBS, Tween 20 0.5% buffer overnight at 4°C (or 2 h at room temperature [20°C]) with primary antibodies. After 2 30-min washing steps in 1X PBS 0.5% Tween 20, samples were incubated in the same buffer for 90 min at room temperature (20°) with secondary antibodies and a DNA labeling agent. Final mounting was carried out in DABCO 70% glycerol (1.25 g de DABCO [Sigma-Aldrich, D2522] in 15 ml of PBS 1X supplemented with 35 ml ultrapure glycerol [Prolabo, PC0252], mixed during 2 h at least and stored at -20°C). Primary antibodies used in this study: mouse monoclonal anti-GFP at 1:250 (Roche, 1814460), rabbit anti-LGG-1 at 1:100 [42], rabbit anti-LGG-2 at 1:250 [42]. As secondary conjugated antibodies, Alexa Fluor 488 (Thermo Fisher Scientific, A11034) and Alexa Fluor 568 (Thermo Fisher Scientific, A11036) were used at a dilution of 1:500. DNA was labelled using Hoechst at 1:500 (Life Technologies, 33342).

Light microscopy imaging

Routinely, embryos were observed on an Axioskop 2 Plus microscope (Carl Zeiss; Oberkochen Germany) equipped with Nomarski (differential interference contrast, DIC) optics coupled to a camera (Roper Scientific; Cool SNAP Photometrics Lisses, France). Epifluorescence images were captured on an AxioImager M2 microscope (Carl Zeiss; Oberkochen Germany) equipped with Nomarski optics coupled to a camera (Carl Zeiss; AxioCam506mono). Confocal images were captured on a confocal Leica TCS SP8 microscope (Leica Microsystems; Wetzlar Germany). Colocalisation were quantified by the Manders coefficient calculated using the ImageJ JACoP plugin [43].

To quantify the number of cell corpses, embryos at comma and 1.5 fold stages corresponding to 430 and 460 min after fertilization, respectively, were mounted on 2% agarose (Invitrogen, 16,500–500) pads in M9 (42 mM Na₂HPO₄, 22 mM KH₂PO₄, 86 mM NaCl, 1 mM MgSO₄). ACs were visualized as refractive discs using DIC microscopy and scored with the AxioImager M2 microscope. For each embryos, serial z sections of 1 µm were acquired. Images were analyzed using the ImageJ Cell Counter plugin (<http://imagej.nih.gov/ij>). Total AC counting was performed as follows. Adult worms were dissected and 2-cell embryos were placed at 20°C for 180 min. Then, embryos were placed on agar pads in M9 and sealed with petroleum jelly and viewed at 20°C using an AxioObserver compound microscope (Carl Zeiss; Oberkochen Germany). 60 to 80 serial z sections at 0.5 µm/section were captured every 3 min for 200 min and images were analyzed beginning with the appearance of the first cell corpse (200 min after fertilization) and ending at the comma stage (460 min after fertilization).

To perform the time-lapse microscopy experiments in Figure 4, embryos at the comma stage were placed in M9 on agar pads and then visualized at 20°C, by DIC and fluorescence, using the AxioImager M2 microscope. For *Plgg-2::gfp::lgg-2* and *Plgg-2::mCherry::lgg-2* embryos, images were taken with serial z sections of 0.5 µm centered around one apoptotic corpse, every 2 min during 20 to 60 min. GFP::LGG-2 images were acquired with an exposure time of 200 ms (27% of lamp power, binning 2 × 2), and mCherry::LGG-2 images with an exposure time of 1000 ms (42% of lamp power, binning 2 × 2). For *Pced1::laat-1::mCherry* embryos, 25 z sections with a 0.75-µm step were imaged every 2 min during 60 min, with an exposure time of 600 ms (42% of lamp power, binning 3 × 3).

Spinning disc dynamic approaches on RD396 were performed by imaging embryos every 2 min during 60 min and serial z sections of 0.75 µm, with laser power and exposure time of 4% and 300ms for GFP::LGG-2 and 2% and 300 ms for LAAT-1::mCherry, using a Nikon Eclipse Ti E inverted microscope (Nikon instruments Europe BV, Amsterdam, Netherlands) equipped with a CSU-X1-A1 spinning disc module (Yokogawa Electric Corporation, Kanazawa, Japan) and Prime 95B camera (Photometrics, Tucson, AZ, USA).

Electron microscopy

Embryos at comma and 2-fold stages were transferred to M9 20% BSA (Sigma-Aldrich, A7030) on 200 µm-deep flat carriers (Leica Biosystems) (before use, the carriers were incubated a few minutes

in a solution of 1% phosphatidylcholine (Sigma-Aldrich,61755) in chloroform) followed by cryo-immobilization in the EMPACT-2 HPF apparatus (Leica Microsystems; Vienna Austria) and cryo-substitution with Automated Freeze-substitution System (AFS2) with integrated binocular lens and incubating chamber (Leica Microsystems, Vienna Austria) with acetone as described [44]. Blocks were further infiltrated in 100% EPON (Agar Scientific, R1165) and then embedded in fresh EPON. Blocks were cut in a pyramidal shape and surfaces were smoothed using a glass knife. Ultrathin sections of 80 nm were cut on a ultramicrotome (Leica Microsystems, EM UC7, Vienna Austria) using an ultra 35° knife (Diatome) and were collected on a formvar and carbon-coated copper grid (Agar Scientific, S162). Sections were contrasted with 2% uranyl acetate (Merck, 8473) for 15 min and 0.08 M lead citrate (Sigma-Aldrich, 15326) for 8 min. Sections were observed with a Jeol 1400 Transmission Electron Microscope (TEM) (Tokyo, Japan) at 80 kV and images are acquired with a Gatan 11 Mpixels SC1000 Orius CCD camera. For correlative and immuno-EM, samples were frozen with an EMPACT-2 HPF and prepared as described previously [45]. Cryosubstitution was performed at -90°C in 0.01% osmium (Electron Microscopy Sciences, 19190) in acetone. Sample dehydration was performed in 0.1% uranyl acetate in 95% acetone:5% water. Solvent was exchanged for glycol methacrylate resin (SPI Supplies, 02630-AA) (68.1 ml glycol methacrylate supplemented with 30 ml of butyl methacrylate, 3 ml of H₂O and 600 mg of benzoyl peroxide, mixed during 1 h at 4°C and stored at -20°C) (30–70–100%) in 95% ethanol:5% water at -30°C. Resin polymerisation was performed at -30°C with an N,N-dimethyl-p-toluidine (Sigma-Aldrich, D9912). Thin sections of 200 nm were cut using a knife for histology (Diatome, DH4560) and collected on 200-mesh copper finder grids (Agar Scientific, G2761C). Photonic images of 200-nm sections were acquired with an epifluorescence microscope Axioskop2Plus equipped with an EMCCD camera. For immuno-electron microscopy, ultrathin sections of CLEM samples (80 nm) on formvar-carbon-coated Nickel 75-mesh grids (Agar Scientific, S162N6) were sequentially treated, using an Immunogold labelling system (IGL, Leica microsystem, Vienna Austria), for 10 min with 0.5% Tween 20 in PBS and then for 5 min, 2 times, with glycine (Sigma-Aldrich, G7403) 50 mM in PBS and then for 5 min, 2 times, with 0.1% BSAC (Aurion, 60613/2) in PBS. Samples were then labelled during 1 h with the primary rabbit anti-GFP antibody (Abcam, ab6556; 1:10 dilution in 0.1% BSAC in PBS), washed 4 times for 2 min with PBS, and twice for 5 min with 0.1% BSAC in PBS. Samples were then labelled during 30 min with the secondary goat anti-rabbit antibody coupled to 10-nm colloidal gold particles (Aurion, GAR30503/2) at 1:20 dilution in 0.1% BSAC in PBS. Sections were washed 3 times 2 min in PBS and 12 times for 2 min in water, then contrasted for 8 min with 0.05% Oolong tea extract (Ted Pella, 19483) and for 2 min with 0.08 M lead citrate. Sections were observed with a Jeol 1400 TEM at 120 kV and images acquired with a Gatan 11 Mpixels SC1000 Orius CCD camera (Roper Industries, Lakewood Ranch, USA).

Statistics

All statistical analyses were performed by using the R software (www.r-project.org). The error bars represent the standard

deviation (SD). The Shapiro-Wilk test was used to evaluate the normal distribution of the values and the Hartley Fmax test for similar variance analysis. Data derived from different genetic backgrounds were compared by the Wilcoxon-Mann-Whitney test or the Student t test. The Fisher exact test and Chi-squared test were used for nominal variables. Manders' coefficients data were compared using the Welch two sample t test.

Abbreviations

AC	apoptotic corpse
ACT-5	ACTin 5
ANXA5	annexin v
ATG	autophagy related
BEC-1	BEclin (human autophagy) homolog 1
CED	cell death abnormal
CLEM	correlative light electron microscopy
DIC	differential interference contrast
EM	electron microscopy
FYVE	fab1, yotb, vac1 and eea1
GABARAP	GABA type A receptor-associated protein
GFP	green fluorescent protein
LAAT-1	Lysosome Associated Amino acid Transporter 1
LactC1C2	Lactadherin C1C2 domains
LAP	LC3-associated phagocytosis
LST-4	Lateral Signaling Target 4
MFGE8	milk fat globule-EGF factor 8 protein
NUC-1	abnormal NUClease 1
PBS	phosphate-buffered saline
PS	phosphatidylserine
RNAi	ribonucleic acid-mediated interference
SNX-1	Sorting NeXin 1
TEM	transmission electron microscopy
ULK1	unc-51 like autophagy activating kinase 1
UNC-51	UNCoordinated 51
VPS-39	related to yeast Vacuolar Protein Sorting factor 39

Acknowledgments

The authors would like to thank Shohei Mitani, Xiaochen Wang, Ding Xue, Robert Horvitz Julie Plastino, Janet Richmond and the Caenorhabditis Genetic Center which is funded by the NIH National Center for Research Resources (NCRR), for providing reagents. We thank Zheng Zhou for sending strains and sharing unpublished data on Pced-1::GFP::LGG-2. We are grateful to Emmanuel Culetto, François Agnès and Anne-Marie Pret for critical reading of the manuscript and helpful discussions. The present work has benefited from the core facilities of Imagerie-Gif, (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr>), member of IBI SA (<http://www.ibisa.net>), supported by "France-BioImaging" (ANR-10-INBS-04-01), and the Labex "Saclay Plant Science" (ANR-11-IDEX-0003-02). This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (project EAT, ANR-12-BSV2-018) and the Association pour la Recherche contre le Cancer (SFI20111203826). CJ received fellowships from the "Actions IDEX Paris-Saclay 2012 - Initiative Doctorale Interdisciplinaire" and the Association pour la Recherche contre le Cancer. VS received a fellowship from of the Ligue Nationale contre le Cancer. None of the authors of this work have a financial interest related to this work.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche [ANR-12-BSV2-018]; Association pour la Recherche contre le Cancer [SFI 20111203826]

References

- [1] Savill J, Gregory C, Haslett C. Cell biology. *Eat Me Die Science*. 2003;302:1516–1517.
- [2] Florey O, Kim SE, Sandoval CP, et al. Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. *Nat Cell Biol*. 2011;13:1335–1343.
- [3] Martinez J, Almendinger J, Oberst A, et al. 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*. 2011;108:17396–17401.
- [4] Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SWG, et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature*. 2007;450:1253–1257.
- [5] Henault J, Martinez J, Riggs JM, et al. Noncanonical autophagy is required for type I interferon secretion in response to DNA-immune complexes. *Immunity*. 2012;37:986–997.
- [6] Kim J-Y, Zhao H, Martinez J, et al. Noncanonical autophagy promotes the visual cycle. *Cell*. 2013;154:365–376.
- [7] Martinez J, Malireddi RKS, Lu Q, et al. Molecular characterization of LC3-associated phagocytosis reveals distinct roles for Rubicon, NOX2 and autophagy proteins. *Nat Cell Biol*. 2015;17:893–906.
- [8] Lerena MC, Colombo MI. Mycobacterium marinum induces a marked LC3 recruitment to its containing phagosome that depends on a functional ESX-1 secretion system. *Cell Microbiol*. 2011;13:814–835.
- [9] Nicola AM, Albuquerque P, Martinez LR, et al. Macrophage autophagy in immunity to *Cryptococcus neoformans* and *Candida albicans*. *Infect Immun*. 2012;80:3065–3076.
- [10] Shpilka T, Weidberg H, Pietrokovski S, et al. Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biol*. 2011;12:226.
- [11] Behrends C, Sowa ME, Gygi SP, et al. Network organization of the human autophagy system. *Nature*. 2010;466:68–76.
- [12] von Muhlinen N, Akutsu M, Ravenhill BJ, et al. LC3C, bound selectively by a noncanonical LIR motif in NDP52, is required for antibacterial autophagy. *Mol Cell*. 2012;48:329–342.
- [13] Manil-Ségalen M, Lefebvre C, Jenzer C, et al. The *C. elegans* LC3 acts downstream of GABARAP to degrade autophagosomes by interacting with the HOPS subunit VPS39. *Dev Cell*. 2014;28:43–55.
- [14] Cheng S, Wu Y, Lu Q, et al. Autophagy genes coordinate with the class II PI/PtdIns 3-kinase PIK1-1 to regulate apoptotic cell clearance in *C. elegans*. *Autophagy*. 2013;9:2022–2032.
- [15] Huang S, Jia K, Wang Y, et al. Autophagy genes function in apoptotic cell corpse clearance during *C. elegans* embryonic development. *Autophagy*. 2013;9:138–149.
- [16] Li W, Zou W, Yang Y, et al. Autophagy genes function sequentially to promote apoptotic cell corpse degradation in the engulfing cell. *J Cell Biol*. 2012;197:27–35.
- [17] Gumienny TL, Lambie E, Hartweg E, et al. Genetic control of programmed cell death in the *Caenorhabditis elegans* hermaphrodite germline. *Development*. 1999;126:1011–1022.
- [18] Sulston JE, Schierenberg E, White JG, et al. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol*. 1983;100:64–119.
- [19] Denning DP, Hatch V, Horvitz HR. Programmed elimination of cells by caspase-independent cell extrusion in *C. elegans*. *Nature*. 2012;488:226–230.
- [20] Alberti A, Michelet X, Djeddi A, et al. The autophagosomal protein LGG-2 acts synergistically with LGG-1 in dauer formation and longevity in *C. elegans*. *Autophagy*. 2010;6:622–633.
- [21] Yu X, Odera S, Chuang C-H, et al. *C. elegans* dynamin mediates the signaling of phagocytic receptor CED-1 for the engulfment and degradation of apoptotic cells. *Dev Cell*. 2006;10:743–757.

- [22] Ellis RE, Jacobson DM, Horvitz HR. Genes required for the engulfment of cell corpses during programmed cell death in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1991;129:79–94.
- [23] Lu N, Shen Q, Mahoney TR, et al. Three sorting nexins drive the degradation of apoptotic cells in response to PtdIns(3)P signaling. *Mol Biol Cell*. 2011;22:354–374.
- [24] Kinchen JM, Doukometzidis K, Almendinger J, et al. A pathway for phagosome maturation during engulfment of apoptotic cells. *Nat Cell Biol*. 2008;10:556–566.
- [25] Chen Y-Z, Mapes J, Lee E-S, et al. Caspase-mediated activation of *Caenorhabditis elegans* CED-8 promotes apoptosis and phosphatidylserine externalization. *Nat Commun*. 2013;4:2726.
- [26] Mapes J, Chen Y-Z, Kim A, et al. CED-1, CED-7, and TTR-52 regulate surface phosphatidylserine expression on apoptotic and phagocytic cells. *Curr Biol*. 2012;22:1267–1275.
- [27] Venegas V, Zhou Z. Two alternative mechanisms that regulate the presentation of apoptotic cell engulfment signal in *Caenorhabditis elegans*. *Mol Biol Cell*. 2007;18:3180–3192.
- [28] Stanfield GM, Horvitz HR. The *ced-8* gene controls the timing of programmed cell deaths in *C. elegans*. *Mol Cell*. 2000;5:423–433.
- [29] Suzuki J, Denning DP, Imanishi E, et al. Xk-related protein 8 and CED-8 promote phosphatidylserine exposure in apoptotic cells. *Science*. 2013;341:403–406.
- [30] Mellén MA, de la Rosa EJ, Boya P. The autophagic machinery is necessary for removal of cell corpses from the developing retinal neuroepithelium. *Cell Death Differ*. 2008;15:1279–1290.
- [31] Qu X, Zou Z, Sun Q, et al. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development. *Cell*. 2007;128:931–946.
- [32] Muller C, Salvayre R, Nègre-Salvayre A, et al. HDLs inhibit endoplasmic reticulum stress and autophagic response induced by oxidized LDLs. *Cell Death Differ*. 2011;18:817–828.
- [33] Green DR, Oguin TH, Martinez J. The clearance of dying cells: table for two. *Cell Death Differ*. 2016;23:915–926.
- [34] Kageyama S, Omori H, Saitoh T, et al. The LC3 recruitment mechanism is separate from Atg9L1-dependent membrane formation in the autophagic response against *Salmonella*. *Mol Biol Cell*. 2011;22:2290–2300.
- [35] Brooks CR, Yeung MY, Brooks YS, et al. KIM-1-/TIM-1-mediated phagocytosis links ATG5-/ULK1-dependent clearance of apoptotic cells to antigen presentation. *EMBO J*. 2015;34:2441–2464.
- [36] Johnston AD, Ebert PR. The redox system in *C. elegans*, a phylogenetic approach. *J Toxicol*. 2012;2012:546915.
- [37] Brenner S. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 1974;77:71–94.
- [38] Paix A, Folkmann A, Rasoloson D, et al. High efficiency, homology-directed genome editing in *caenorhabditis elegans* using CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein complexes. *Genetics*. 2015;201:47–54.
- [39] Kamath RS, Ahringer J. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods*. 2003;30:313–321.
- [40] Timmons L, Fire A. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature*. 1998;395:854.
- [41] Legouis R, Gansmuller A, Sookharea S, et al. LET-413 is a basolateral protein required for the assembly of adherens junctions in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol*. 2000;2:415–422.
- [42] Al Rawi S, Louvet-Vallée S, Djeddi A, et al. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science*. 2011;334:1144–1147.
- [43] Bolte S, Cordelières F. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J Microsc*. 2006;224:213–232.
- [44] Kolotuev I, Schwab Y, Labouesse M. A precise and rapid mapping protocol for correlative light and electron microscopy of small invertebrate organisms. *Biol Cell*. 2010;102:121–132.
- [45] Watanabe S, Richards J, Hollopeter G, et al. Nano-*fl*EM: protein localization using photo-activated localization microscopy and electron microscopy. *J Vis Exp JoVE*. 2012;70:e3995.

Discussion et perspectives

Le projet mené au cours de ma thèse a visé à mieux comprendre les rôles de RET-1 chez *C. elegans*, du plus canonique dans l'organisation du réseau de tubules de RE au lien entre le réticulum endoplasmique et autophagie.

Au cours de mes travaux de thèse j'ai donc tout d'abord, et pour la première fois caractérisé le locus du gène *ret-1*, ses différentes isoformes et son rôle dans la structuration du réseau de RE, jusqu'à présent peu étudié. J'ai également tenté de mettre en évidence le lien qu'il peut exister entre ce réticulon et le processus de l'autophagie, en effet l'autophagie sélective et ses acteurs étant une question centrale de notre équipe. J'ai par mes travaux pu mettre en évidence que ce gène très complexe conduit à l'expression d'au moins 8 isoformes de tailles différentes et dont les localisations varient au cours du développement. Les patrons d'expression des isoformes longues et intermédiaires m'ont conduit à mettre en évidence une spécificité cellulaire très restreinte des isoformes longues aux cellules musculaires du corps. Les formes intermédiaires D étant majoritairement exprimées dans les neurones. Quant aux formes les plus courtes, majoritaires et réduites à leur domaine RHD, elles sont ubiquitaires et responsables du maintien de l'organisation du réseau de tubules de RE dans l'embryon. Bien qu'il semble y avoir une interaction physique entre RET-1 et LGG-1, j'ai montré que les formes courtes n'étaient pas impliquées dans la formation des autophagosomes. Nous avons donc au cours de cette étude mis en évidence pour la première fois un rôle de RET-1 seul dans la structuration du RE chez *C. elegans*. Un certain nombre de questions demeurent.

I. Quel rôle mécanistique RET-1 a dans l'organisation du RE ?

Nous avons montré qu'en cas de déplétion en RET-1 dans l'embryon précoce, la structure du RE est affectée. Sur les sections d'imagerie confocale en deux dimensions, nous avons observé la présence en grand nombre de structures en anneau de RE de taille variable, en partie au détriment de tubules fines de RE. L'analyse plan par plan et la modélisation 3D de ces structures suggère une organisation en sphère creuse de ces structures, et non des citernes de RE. Le rôle canonique des réticulons, conféré par leur RHD et leur hélice amphipatique en C-terminale, est d'induire et de stabiliser les structures tubulaires et les bords des feuillettes en courbant les membranes. Leur absence dans les cellules pourrait ainsi affaiblir l'échafaudage protéique participant à maintenir les tubules. Sans cet échafaudage, qui implique des protéines du RE et le cytosquelette, on peut imaginer que les bicouches lipidiques des membranes prennent une configuration plus stable thermodynamiquement, avec des membranes moins courbées. Ainsi, en l'absence de RET-1, les tubules de RE ou les membranes qui les constituent d'ordinaire

pourraient se regrouper. Il est également possible que ces sphères se forment en partie au détriment des patches de RE. En effet, ceux-ci pourraient correspondre à des feuilletts ou empilement de feuilletts, mais aussi à des matrices denses de tubules rapprochées (Nixon-Abell *et al*, 2016). Il est également à noter que chez *C. elegans*, la déplétion simple ou conjointe de protéines impliquées dans l'organisation de l'enveloppe nucléaire (la lipine LPIN-1) ou du RE (RAB-5, YOP-1, RET-1) peuvent également conduire à l'apparition de structures en anneaux dans le RE, additionnés à d'autres défauts drastiques du RE et de l'EN (Audhya *et al*, 2007; Golden *et al*, 2009).

Nous savons en outre que le RE établit un grand nombre de contacts avec d'autres systèmes endomembranaires, comme par exemple les endosomes ou les mitochondries, notamment pour échanger du matériel et moduler des processus dynamiques des organites, comme la fission, le tri et le déplacement des vésicules (Wu *et al*, 2018).

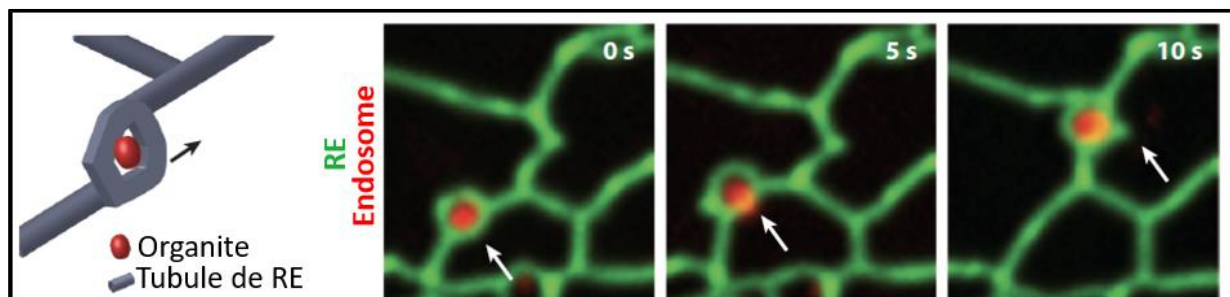


Figure 35 : Les réarrangements de RE en forme de cercle se produisent là où les tubules de RE circonscrivent les organites comme ici les endosomes (adapté de Westrate *et al*, 2015)

Il a été observé que ces sites de contact peuvent prendre la forme d'anneaux autour de certains organites comme les endosomes et les mitochondries (Friedman *et al*, 2010; Zajac *et al*, 2013), et ces constriction correspondent à des zones de fission des endosomes ou des mitochondries (Rowland *et al*, 2014). De plus, En absence de RET-1, les tubules de RE pourraient être ainsi moins stabilisés et ainsi les membranes du RE plus aptes à interagir avec les différents organites, ou plus passivement s'accumuler autour de ceux-ci. Il est donc possible que l'assemblage ou le désassemblage des échafaudages maintenant l'organisation du RE en réseau de tubules soit un élément de régulation de la présence de sites de contact. Afin d'explorer cette hypothèse, il serait intéressant, par l'utilisation de marqueurs des endosomes, gouttelettes lipidiques ou mitochondries par exemple, de déterminer le contenu de ces sphères creuses de RE. De façon intéressante, dans des fibroblastes de souris en culture, la déplétion en Vmp1 (EPG-3 chez le nématode), protéine de l'autophagie, entraîne l'apparition d'anneaux de RE au contact des gouttelettes lipidiques, englobant ces dernières (Zhao *et al*, 2017).

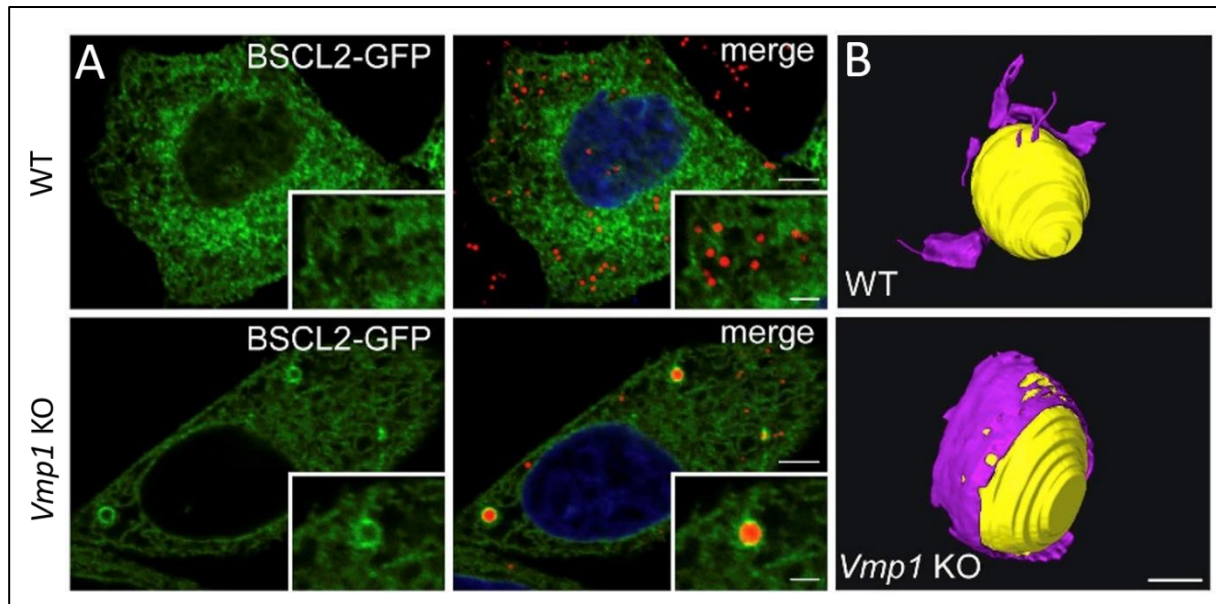


Figure 36 : La déplétion en Vmp1 entraîne l'apparition de structures en anneaux en contact des gouttelettes lipidiques. (A) Cellules HeLa exprimant BSCL2-GFP (vert), protéine membranaire résidente du RE agissant aux sites de contact RE-gouttelettes lipidiques, et marquées au Lipidtox (rouge), révélant les gouttelettes lipidiques. Barre d'échelle : 5 μm, 2μm dans le détail. Dans les cellules WT, les gouttelettes sont présentes à proximité et au contact du RE, organisé de façon homogène. En cas de déplétion en Vmp1, des structures en anneau apparaissent dans le RE et sont enrichies en BSCL2-GFP. Dans ces anneaux sont localisés des gouttelettes lipidiques. (B) Représentations tridimensionnelle des sites de contact RE-gouttelettes lipidiques issues de tomographie en microscopie électronique. Jaune : Gouttelette lipidique, violet : RE. Dans un contexte mutant *Vmp1*, la surface de contact RE-gouttelette lipidique augmente drastiquement, et le RE englobe en partie la gouttelette lipidique. Barre d'échelle : 500nm (adapté de Zhao *et al*, 2017).

Un autre moyen qui peut être envisagé est l'utilisation de microscopie électronique, éventuellement sériée et couplée à de la tomographie, afin d'une part d'observer la présence ou non d'organites dans ces sphères ainsi que de préciser l'organisation du RE constituant celles-ci. En effet, elles pourraient correspondre à un rapprochement compact de tubules, de façon similaire aux matrices, ou bien à un feuillet ou un empilement de feuillet. Les déplétions en différents réticulons entraînent en effet une diminution du réseau tubulaire de RE au profit d'une expansion des feuillet (Voeltz *et al*, 2006).

II. Les différentes isoformes de RET-1 ont-elles des fonctions spécifiques ?

Comme pour l'ensemble des protéines de la famille des réticulons, la variété de taille et de séquence des isoformes de RET-1 suggèrent des fonctions différentes, au moins partiellement. Ajouté à cela, nous avons montré que des isoformes ont des profils d'expression très différents. L'isoforme la plus longue, RET-1C, correspondant à la protéine de type réticulon la plus grande connue, toutes espèces confondues, est exprimée spécifiquement dans les cellules musculaires, à partir du développement larvaire, mais très faiblement. L'expression de l'isoforme D est détectable à partir du début de la morphogénèse dans les cellules précurseur neuronales. Chez le

nématode adulte, l'isoforme D est localisée majoritairement dans les neurones, et plus faiblement exprimée dans les cellules musculaires, de l'épiderme et de l'intestin. Enfin, si nous n'avons pas discriminé les différentes isoformes courtes, constituées très majoritairement du RHD, nous avons pu montrer que leur expression était ubiquitaire dans les tissus et les différents stades développementaux, et ce dès le stade 1 cellule. Roger Pocock et ses collègues ont quant à eux conclu, grâce à l'expression d'une fusion transcriptionnelle de GFP, avec la région promotrice située en amont des transcrits prédits correspondant aux isoformes G, que cette isoforme était très faiblement exprimé avant l'apparition des neurones de la tête de l'embryon où elle devient majoritaire, ainsi que chez l'adulte où le signal est restreint aux neurones. Cette forme étant une isoforme intermédiaire, nos résultats concernant l'autre isoforme intermédiaire D semble en adéquation avec leurs résultats. En revanche, l'utilisation de l'expression d'une GFP seule, en condition de surexpression, pourrait entraîner une accumulation de signal plus ou moins grande en fonction du tissu. Nous avons dans notre étude utilisé des souches générées par transgénèse au locus endogène, c'est donc la protéine tagguée et exprimée à son niveau endogène que nous localisons. Nous pouvons néanmoins en conclure que les formes intermédiaires sont des formes préférentiellement neuronales. Il est intéressant de souligner que dans la littérature des études ont montré un lien entre les réticulons et le système nerveux. Par exemple, RTN4/NOGO chez le poisson zèbre est principalement exprimé dans les neurones et a un effet sur la croissance neuronale (Pinzón-Olejua *et al*, 2014). Plus généralement, la présence de multiples régions promotrices dans les locus de gènes de la famille des réticulons dans les organismes supérieurs suggère un patron d'expression spatio-temporel spécifique en fonction des besoins de différents types cellulaires. Par exemple, l'étude de l'expression des isoformes de RTN-3 dans les différents tissus de la souris a notamment montré que le gène *rtn3* produit différents transcrits suite à des épissages alternatifs différents. Trois sites d'initiation de la transcription sont utilisés et sont tissus spécifiques. Par exemple, le niveau d'expression de RTN3 est bien supérieur dans les neurones que dans les tissus périphériques comme l'intestin, le foie, les yeux, les ovaires ou même les testicules et les formes courtes bien plus représentées que les autres isoformes (Shi *et al*, 2014).

Ces données suggèrent que des protéines réticulon pourraient avoir des fonctions spécifiques au niveau du RE en lien avec le type cellulaire dans lesquelles elles sont présentes. En effet, dans les cellules musculaires, le réticulum sarcoplasmique, en continuité du réticulum endoplasmique, a un rôle fonctionnel important dans la contraction musculaire. Le SR a une structure particulière et est reparti le long des filaments contractiles, et libère au plus près de

l'actine les ions Ca^{2+} nécessaires à l'interaction actine-myosine. Les neurones ont une morphologie particulière avec de longs axones et dendrites, et le RE est présent dans tous les compartiments des neurones, même les plus distants, et maintient sa continuité dans les prolongements les plus fins via des tubules. La structure du RE est ainsi particulièrement importante pour le bon fonctionnement des neurones. D'ailleurs, des mutations dans les protéines de structure du RE ou impliquées dans la fusion homotypique de ses membranes peuvent conduire à des maladies neurodégénératives (Wu *et al*, 2017). En outre, chez *C. elegans*, si la déplétion en RET-1 n'entraîne pas de phénotype majeur dans le développement et la différenciation des tissus dans lesquels les isoformes intermédiaires sont exprimées, il existe chez le mutant nul *ret-1* un défaut du guidage axonal des neurones moteurs spécifiques des hermaphrodites (HSN) (Figure 35, Torpe *et al.*, 2017). D'autres types de neurones sont également affectés, avec une pénétrance faible. La mécanistique de cet effet n'est pas connue.

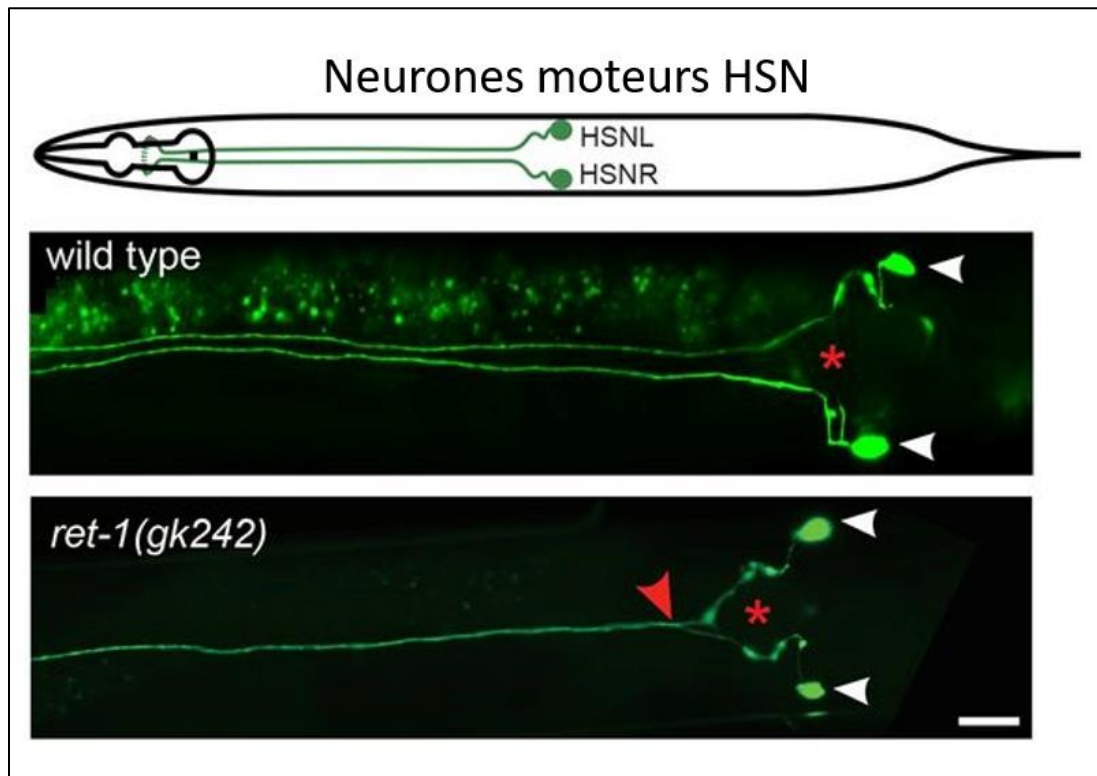


Figure 37 : RET-1 a un rôle dans la guidance des axones des neurones HSN. Vues ventrales de nématode adulte, dont les neurones sont marqués par l'expression du transgène *tph-1^{prom}::gfp* (*zdl13*). Dans le mutant, les corps cellulaires des HSN sont correctement localisés après la vulve, indiquée par l'astérisque. Les axones présentent des défauts de guidance de leur croissance, résultant en leur jonction, alors qu'ils restent indépendants chez un animal sauvage. Barre d'échelle : 20 μ m (issu de Torpe *et al*, 2017)

III. RET-1C/D, un nouveau récepteur de la RE phagie ?

a- Quelles relations possibles entre RE et autophagie ?

La grande question biologique qui anime l'équipe est de mieux comprendre les rôles de l'autophagie et des protéines en lien avec celle-ci, et plus particulièrement de l'autophagie sélective, dans le cadre de mon projet de la RE-phagie. Il serait ainsi d'un intérêt tout particulier de montrer pour la première fois chez l'organisme modèle *C. elegans* le processus de RE-phagie, afin d'en étudier les rôles physiologiques.

Ainsi, au-delà de la fonction de maintien de la structure tubulaire du RE, les réticulons spécifiques de ces tissus pourraient être impliqués dans la différenciation cellulaire en régulant la mise en place et la répartition particulière du réticulum par autophagie. En effet, vu l'interaction potentielle entre RET-1C et RET-1D avec LGG-1, on peut imaginer qu'à l'instar des isoformes longues de RTN3, ces isoformes pourraient être impliquées comme récepteur de la RE-phagie. Ainsi, dans les tissus où RET-1C et RET-1D sont exprimés, la RE-phagie pourrait avoir un rôle particulier dans l'homéostasie du tissu concerné. En effet, certaines pathologies neurodégénératives pouvant être liées à un défaut d'organisation du RE peuvent aussi avoir un lien avec des mutations dans des gènes de l'autophagie, par exemple l'ALS (Chiurchiù *et al*, 2014; Fujikake *et al*, 2018). Ainsi, l'utilisation de *C. elegans* comme modèle pour étudier la RE-phagie et en identifier de nouveaux récepteurs pourrait se révéler particulièrement pertinente pour comprendre les rôles physiologiques de ce type d'autophagie sélective. En outre, parmi les récepteurs de la RE-phagie identifiés jusqu'ici, trois différents comportent des RHD. Chez les mammifères, c'est maintenant cinq récepteurs qui sont connus, on peut donc également imaginer que chez *C. elegans* il peut exister d'autres récepteurs de la RE-phagie que RET-1.

Nos résultats indiquent que les isoformes courtes de RET-1 ne sont pas impliquées dans la biogénèse des autophagosomes dans l'embryon précoce, en conditions normales ou suite à un stress cellulaire important (choc thermique). Cependant, les isoformes de RET-1 exprimées à ce stade, les isoformes courtes, ne sont pas celles comportant le fragment identifié en double hybride interagissant avec LGG-1, et ne présentent pas de LIR. Nous ne pouvons donc pas exclure que RET-1C ou D, en tant qu'interacteur potentiel de LGG-1, ait un rôle dans la biogénèse des autophagosomes, pour par exemple favoriser l'induction du processus autophagique au niveau du RE ou participer à l'apport de membranes au site d'initiation de l'autophagie.

Il a récemment été décrit une autre relation possible entre RE et autophagosomes, dans des cellules humaines en culture. Comme de nombreux composants cellulaires membranaires, les autophagosomes peuvent former des sites de contact avec le RE. Ces sites de contact interviendraient dans le transport et la position des autophagosomes en lien avec le cholestérol, via le capteur de cholestérol ORP1L. Dans des conditions où le cholestérol est peu présent, ORP1L, localisé aux autophagosomes tardifs, interagit avec VAP-A, protéine du RE, ce qui forme un site de contact. Ce site de contact empêche la prise en charge de l'autophagosome par la machinerie de transport et de fusion, notamment le complexe HOPS (Wijdeven *et al*, 2016).

En outre, nous ne pouvons pas exclure un éventuel rôle indépendant de l'autophagie de l'interaction RET-1/LGG-1, Atg8 et ses homologues pouvant avoir des fonctions non autophagiques (Schaaf *et al*, 2016).

b- Quelles approches pour confirmer l'interaction RET-1/LGG-1 et en déterminer le rôle ?

Comme évoqué dans la partie résultat, si le laboratoire et la communauté scientifique disposent d'outils fiables (protéines de fusion fluorescentes, anticorps) pour localiser les autophagosomes et en étudier leur dynamique dans les embryons, ceux-ci ne sont pas nécessairement utilisables pour l'étude chez l'adulte. Par exemple, un moyen classique de localiser les autophagosomes chez les embryons tardifs, les larves et les adultes de *C. elegans* est l'utilisation de la souche transgénique DA2123 permettant la surexpression de GFP::LGG-1. Dans de nombreux tissus, le signal GFP, en plus de présenter un nombre variable de points, considérés comme les autophagosomes, peut également être diffus ou décorer des structures comme les « dense bodies » (corps denses) présents dans le sarcoplasme dans les cellules musculaires. Les dense bodies étant des structures d'ancrage des fibres contractiles d'actine. Les localisations à ces structures sont absentes lors de l'utilisation d'un anticorps reconnaissant LGG-1 endogène, et pourraient être une conséquence de la surexpression de la GFP, illustrant les limites de cette approche. D'autres protéines fusionnées à la GFP peuvent également présenter ce genre de localisation dans les adultes. Si l'immunolocalisation de LGG-1 dans l'adulte est possible, la qualité des images qui en résulte ne permet pas l'analyse fine de la localisation des autophagosomes vis-à-vis du RE. Cela est probablement dû à la préparation particulière pour fixer et perméabiliser les tissus de l'adulte. Pour ces raisons, notre équipe a décidé de générer de nouveaux outils pour l'étude de LGG-1 et LGG-2. Nous avons utilisé l'approche CRISPR-Cas9 afin de générer des souches exprimant GFP::LGG-1, mCherry::LGG-1, et mCherry::LGG-2. Comme cette approche permet la modification directement au locus, cela permet de faire

exprimer les protéines de fusion au niveau endogène et éviter les problèmes liés à la surexpression. Si ces construits sont tous utilisables et fiables dans l'embryon, chez l'adulte, l'expression de la mCherry, conduit à l'apparition de tâches et de fibrilles, éclipsant de façon variable la localisation attendue de la protéine. Comme nous l'avons montré pour la mCherry::RET-1D qui ne se localise pas ou de façon très minoritaire au RE dans les tissus où elle est exprimée. mCherry::LGG-1 est observable en points dans de nombreux tissus, où sont également observables des tâches et des fibrilles. De plus, le nombre de points positifs pour la mCherry dans cette souche est bien supérieur à celui observé par les autres moyens mentionnés auparavant, jetant un doute sur l'interprétation de ce signal. Les limites de ces outils indique qu'il serait peut-être pertinent de générer et de caractériser d'autres protéines de fusion fluorescentes comme par exemple la Cerulean, émettant dans le bleu, potentiellement moins susceptibles d'entraîner des signaux aberrants et permettant d'être combinés avec les souches exprimant la GFP en fusion avec RET-1, par exemple.

D'autres approches peuvent être envisagées pour mettre en évidence la RE-phagie chez *C. elegans*. En effet, une façon d'observer la dégradation d'une protéine ou d'un organite par autophagie est d'observer le clivage de la GFP fusionnée à un marqueur protéique de la structure en question. Par exemple, la présence d'une bande correspondant à la GFP seule de l'ordre de 28kDa en western blot établi à partir d'une souche exprimant GFP::RET-1D suggèrerai que GFP::RET-1D a subi une dégradation dans le lysosome, attestant ainsi d'un évènement de RE-phagie. Une autre approche permettant de démontrer la fonction de récepteur de RET-1D, sera d'analyser la GFP en WB à partir d'extraits obtenus de souches exprimant d'autres protéines résidentes du RE fusionnées à la GFP en contexte sauvage et en contexte mutant pour *ret-1* (toutes formes, ou mutant spécifiques des isoformes C et D). Ce type d'approche est utilisé dans divers modèles, la difficulté de mise en place réside dans le fait que cette GFP clivée n'est souvent détectable qu'en condition d'induction de l'autophagie. Ces approches doivent donc être conduites dans un contexte où l'autophagie et plus particulièrement la RE-phagie est induite, suite par exemple à la starvation ou un stress du RE.

En effet, les études récentes mettant en évidence les récepteurs de la RE-phagie, chez la levure ou dans des cellules de mammifère, utilisent classiquement la condition de stress correspondant à une absence de nutriments, la surexpression de la protéine étudiée, ou la conjonction des deux. Dans ces conditions, une fragmentation du RE est observée, et ces fragments colocalisent avec des autophagosomes. Il apparaît donc crucial de caractériser des conditions de fragmentation du RE chez *C. elegans* pour observer dynamiquement ou non les

événements de RE-phagie. Comme indiqué dans la partie résultat, j'ai utilisé différentes approches pour tenter de déstabiliser le RE et induire une fragmentation. J'ai ainsi utilisé différents ARNi pour, par exemple, perturber le système endomembranaire (*rab-5*) ou la dégradation des protéines du RE (*cdc-48*). Je n'ai pas réussi à observer de fragmentation du RE dans ces conditions. N'étant pas certain de l'efficacité de mes approches, il conviendra de les reproduire en attachant un intérêt tout particulier à l'efficacité du stress effectué.

Chez *C. elegans*, les conditions de starvation sont surtout caractérisées au premier stade larvaire L1, en faisant éclore les embryons sur un milieu sans nourriture. A ce stade, le réseau de RE est très dense et les techniques de microscopie optique classique ne nous permettent pas d'analyser finement l'organisation du RE. Compte tenu de l'effet de la starvation sur des cellules en culture, on peut imaginer que l'un des meilleurs moyens d'induire et d'observer la fragmentation du RE et la RE-phagie chez *C. elegans* est de faire en sorte que des nématodes adultes soient privés de nourriture pendant plusieurs jours. Additionnement, l'utilisation de marqueurs du RE chez l'adulte autres que les différentes isoformes de RET-1 fusionnées à la GFP permettrait d'apprécier une éventuelle différence dans la fragmentation du RE, entre le contrôle et le mutant *ret-1*. L'émergence de nouveaux outils chez *C. elegans* notamment générés par les approches CRISPR-Cas9 peut permettre de choisir le marqueur du plus adapté à l'étude du RE dans un tissu d'intérêt. Par exemple, l'insertion de la GFP au locus *crl-1* a généré une souche exprimant un marqueur du RE de manière ubiquitaire (D'Alessandro *et al*, 2018).

Il a été décrit que la surexpression de récepteur de la RE-phagie comme RTN3 (Grumati *et al*, 2017), associée à une condition de stress, permettait d'induire une fragmentation du RE conduisant ainsi à sa dégradation par autophagie. La construction d'une souche par biolistique exprimant GFP::RET-1D, sous le contrôle d'un promoteur conduisant à une expression dans les embryons précoces comme *Ppie-1*, permettrait de conduire à une surexpression de GFP::RET-1D dans les embryons précoces. En effet, chez *C. elegans*, il est connu que la technique classique de transgénèse, par biolistique, conduit la plupart du temps à la surexpression du transgène. Ainsi surexprimer l'isoforme D dans les embryons précoces ou elle n'est normalement pas exprimée devrait conduire à la fragmentation du RE dans le cas où RET-1 aurait les propriétés d'un récepteur de la RE-phagie. Cette technique de transgénèse nécessite le clonage dans un plasmide de la séquence codante de la protéine d'intérêt. Jusqu'à l'identification de l'isoforme D, seule l'isoforme C était un interacteur potentiel de LGG-1. Sa séquence codante de près de 10 000 nucléotides rendant complexe son insertion dans un plasmide en vue d'une transgénèse, nous

n'avons alors pas envisagé cette possibilité. En outre, cela souligne le caractère crucial de la technologie CRISPR-Cas9 pour étudier la localisation et l'expression de ces isoformes.

Pour mettre en évidence l'adressage d'une protéine ou d'un compartiment aux lysosomes, une approche classique est d'utiliser une protéine de fusion dite tandem : la GFP et la mCherry sont fusionnées ensemble à une protéine. Leurs différences de propriétés physico-chimiques font que la GFP fluoresce à pH neutre, mais pas à pH acide. En revanche, la mCherry reste fluorescente en milieu acide, donc dans le lysosome. L'observation de la présence ou de l'apparition de signal rouge dissocié du signal vert indique donc que la protéine fusionnée est présente dans le lysosome. La construction GFP::mCherry::RET-1D pourrait ainsi mettre en évidence la présence de RE-phagie chez *C. elegans*. La fusion tandem avec une autre protéine du RE, comme SP12, permettrait de connaître l'effet de la déplétion en RET-1D sur la RE-phagie. Cette approche peut être envisagée chez l'adulte, en exploitant le mutant spécifique des formes D, ou en comparant dans l'embryon précoce la condition de surexpression de RET-1D avec un contrôle.

Enfin, pour mieux apprécier les rapprochements entre le RE et les autophagosomes, des approches de microscopie électronique peuvent être envisagées. D'abord, sur la base de l'identification morphologique du RE et des autophagosomes, la microscopie électronique à transmission classique peut être informative. Additionnellement, il conviendrait de localiser RET-1 ou RET-1D au niveau du RE pour pouvoir observer très précisément si la protéine est particulièrement présente au niveau des rapprochements entre RE et autophagosomes. Pour cela, plusieurs approches sont envisageables, comme l'utilisation d'anticorps couplés à des billes d'or, ou l'utilisation de la technique de microscopie corrélative électronique-lumière (CLEM, Correlative Light Electronic Microscopy), qui consiste à préparer les coupes de façon à pouvoir préserver la fluorescence d'une protéine comme la GFP et de pouvoir les imager à la fois en microscopie photonique et électronique. Cette technique permet de corrélérer le signal fluorescent, peu précis, de la protéine couplée à la GFP, à une structure bien définie en MET. Enfin, la fusion d'une protéine d'intérêt avec la HRP (horseradish peroxydase) permet de colorer les coupes pour la microscopie électronique par réaction enzymatique et ainsi localiser la protéine.

L'ensemble de ces approches pourrait permettre de valider *in vivo* et *in situ* l'interaction entre RET-1D ou C et LGG-1, et de mieux comprendre leur lien fonctionnel, et possiblement de mettre en évidence pour la première fois chez *C. elegans* la RE-phagie, impliquant un récepteur de type réticulon.

Les résultats que j'ai obtenus au cours de ma thèse suggèrent ainsi fortement que des isoformes de RET-1 spécifiques de certains tissus et stades développementaux interagissent avec la protéine clé de l'autophagie LGG-1. L'importance du rôle de l'interaction potentielle entre RET-1 et LGG-1 pourrait dépendre de conditions particulières, comme le vieillissement ou le stress thermique. L'élucidation du rôle de RET-1 dans la RE-phagie pourrait conduire à mettre en évidence un type de RE-phagie régulé spatio-temporellement dans un organisme complexe, et ainsi participer à mieux comprendre les liens entre autophagie et pathologies en lien avec un tissu particulier, comme les maladies neurodégénératives ou musculaires.

Bibliographie

- Abeliovich H, Zarei M, Rigbolt KTG, Youle RJ & Dengjel J (2013) Involvement of mitochondrial dynamics in the segregation of mitochondrial matrix proteins during stationary phase mitophagy. *Nat Commun* **4**: 2789
- Abi-Rached L, Gilles A, Shiina T, Pontarotti P & Inoko H (2002) Evidence of en bloc duplication in vertebrate genomes. *Nat. Genet.* **31**: 100–105
- Aburto MR, Sánchez-Calderón H, Hurlé JM, Varela-Nieto I & Magariños M (2012) Early otic development depends on autophagy for apoptotic cell clearance and neural differentiation. *Cell Death Dis* **3**: e394
- Acevedo L, Yu J, Erdjument-Bromage H, Miao RQ, Kim J-E, Fulton D, Tempst P, Strittmatter SM & Sessa WC (2004) A new role for Nogo as a regulator of vascular remodeling. *Nat. Med.* **10**: 382–388
- Aerts L, Craessaerts K, De Strooper B & Morais VA (2015) PINK1 Kinase Catalytic Activity Is Regulated by Phosphorylation on Serines 228 and 402. *J Biol Chem* **290**: 2798–2811
- AhYoung AP, Jiang J, Zhang J, Dang XK, Loo JA, Zhou ZH & Egea PF (2015) Conserved SMP domains of the ERMES complex bind phospholipids and mediate tether assembly. *PNAS* **112**: E3179–E3188
- Aktepe TE, Liebscher S, Prier JE, Simmons CP & Mackenzie JM (2017) The Host Protein Reticulon 3.1A Is Utilized by Flaviviruses to Facilitate Membrane Remodelling. *Cell Rep* **21**: 1639–1654
- Almanza A, Carlesso A, Chintha C, Creedican S, Doultsinos D, Leuzzi B, Luís A, McCarthy N, Montibeller L, More S, Papaioannou A, Püschel F, Sassano ML, Skoko J, Agostinis P, de Bellerocche J, Eriksson LA, Fulda S, Gorman AM, Healy S, et al (2019) Endoplasmic reticulum stress signalling - from basic mechanisms to clinical applications. *The FEBS Journal* **286**: 241–278
- Al-Saif A, Al-Mohanna F & Bohlega S (2011) A mutation in sigma-1 receptor causes juvenile amyotrophic lateral sclerosis. *Ann. Neurol.* **70**: 913–919
- An H, Ordureau A, Paulo JA, Shoemaker CJ, Denic V & Harper JW (2019) TEX264 Is an Endoplasmic Reticulum-Resident ATG8-Interacting Protein Critical for ER Remodeling during Nutrient Stress. *Molecular Cell*: S1097276519302588
- Anderson DJ & Hetzer MW (2007) Nuclear envelope formation by chromatin-mediated reorganization of the endoplasmic reticulum. *Nat. Cell Biol.* **9**: 1160–1166
- Anderson DJ & Hetzer MW (2008) Reshaping of the endoplasmic reticulum limits the rate for nuclear envelope formation. *J Cell Biol* **182**: 911–924
- Aoki Y, Kanki T, Hirota Y, Kurihara Y, Saigusa T, Uchiumi T & Kang D (2011) Phosphorylation of Serine 114 on Atg32 mediates mitophagy. *Mol Biol Cell* **22**: 3206–3217
- Asada R, Kanemoto S, Kondo S, Saito A & Imaizumi K (2011) The signalling from endoplasmic reticulum-resident bZIP transcription factors involved in diverse cellular physiology. *J. Biochem.* **149**: 507–518
- Asare A, Levorse J & Fuchs E (2017) Coupling organelle inheritance with mitosis to balance growth and differentiation. *Science* **355**:
- Audhya A, Desai A & Oegema K (2007) A role for Rab5 in structuring the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **178**: 43–56
- Avivar-Valderas A, Bobrovnikova-Marjon E, Alan Diehl J, Bardeesy N, Debnath J & Aguirre-Ghiso JA (2013) Regulation of autophagy during ECM detachment is linked to a selective inhibition of mTORC1 by PERK. *Oncogene* **32**: 4932–4940
- Baba M, Osumi M & Ohsumi Y (1995) Analysis of the membrane structures involved in autophagy in yeast by freeze-replica method. *Cell Struct. Funct.* **20**: 465–471
- Bach M, Larance M, James DE & Ramm G (2011) The serine/threonine kinase ULK1 is a target of multiple phosphorylation events. *Biochem. J.* **440**: 283–291
- Baerga R, Zhang Y, Chen P-H, Goldman S & Jin S (2009) Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice. *Autophagy* **5**: 1118–1130
- Baughman JM, Perocchi F, Girgis HS, Plovanich M, Belcher-Timme CA, Sancak Y, Bao XR, Strittmatter L, Goldberger O, Bogorad RL, Kotliansky V & Mootha VK (2011) Integrative genomics identifies MCU as an essential component of the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**: 341–345
- Baumann O & Walz B (2001) Endoplasmic reticulum of animal cells and its organization into structural and functional domains. *Int. Rev. Cytol.* **205**: 149–214
- B'chir W, Maurin A-C, Carraro V, Averous J, Jousse C, Muranishi Y, Parry L, Stepien G, Fafournoux P & Bruhat A (2013) The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy gene expression. *Nucleic Acids Res.* **41**: 7683–7699

- Bernales S, McDonald KL & Walter P (2006) Autophagy Counterbalances Endoplasmic Reticulum Expansion during the Unfolded Protein Response. *PLoS Biol* **4**: Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1661684/> [Accessed May 17, 2019]
- Bernales S, Schuck S & Walter P (2007) ER-phagy: selective autophagy of the endoplasmic reticulum. *Autophagy* **3**: 285–287
- Bernard-Marissal N, Médard J-J, Azzedine H & Chrast R (2015) Dysfunction in endoplasmic reticulum-mitochondria crosstalk underlies SIGMAR1 loss of function mediated motor neuron degeneration. *Brain* **138**: 875–890
- Bernardoni P, Fazi B, Costanzi A, Nardacci R, Montagna C, Filomeni G, Ciriolo MR, Piacentini M & Di Sano F (2013) Reticulon1-C modulates protein disulphide isomerase function. *Cell Death Dis* **4**: e581
- Bertolotti A, Zhang Y, Hendershot LM, Harding HP & Ron D (2000) Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2**: 326–332
- Besprozvannaya M, Dickson E, Li H, Ginburg KS, Bers DM, Auwerx J & Nunnari J (2018) GRAM domain proteins specialize functionally distinct ER-PM contact sites in human cells. *Elife* **7**:
- Bettigole SE, Lis R, Adoro S, Lee A-H, Spencer LA, Weller PF & Glimcher LH (2015) The transcription factor XBP1 is selectively required for eosinophil differentiation. *Nat. Immunol.* **16**: 829–837
- Blackstone C (2012) Cellular pathways of hereditary spastic paraplegia. *Annu. Rev. Neurosci.* **35**: 25–47
- Blackstone C, O’Kane CJ & Reid E (2011) Hereditary spastic paraplegias: membrane traffic and the motor pathway. *Nat. Rev. Neurosci.* **12**: 31–42
- Blobel G (1980) Intracellular protein topogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **77**: 1496–1500
- Bobinac Y, Marcaillou C, Morin X & Debec A (2003) Dynamics of the endoplasmic reticulum during early development of *Drosophila melanogaster*. *Cell Motil. Cytoskeleton* **54**: 217–225
- Böckler S & Westermann B (2014) Mitochondrial ER contacts are crucial for mitophagy in yeast. *Dev. Cell* **28**: 450–458
- Bodemann BO, Orvedahl A, Cheng T, Ram RR, Ou Y-H, Formstecher E, Maiti M, Hazelett CC, Wauson EM, Balakireva M, Camonis JH, Yeaman C, Levine B & White MA (2011) RalB and the exocyst mediate the cellular starvation response by direct activation of autophagosome assembly. *Cell* **144**: 253–267
- Bola B & Allan V (2009) How and why does the endoplasmic reticulum move? *Biochem. Soc. Trans.* **37**: 961–965
- Bordi M, Nazio F & Campello S (2017) The Close Interconnection between Mitochondrial Dynamics and Mitophagy in Cancer. *Front Oncol* **7**: Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5411450/> [Accessed April 23, 2019]
- Braakman I & Hebert DN (2013) Protein folding in the endoplasmic reticulum. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **5**: a013201
- Brady JP, Claridge JK, Smith PG & Schnell JR (2015) A conserved amphipathic helix is required for membrane tubule formation by Yop1p. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **112**: E639–648
- Breeze E, Dzimitrowicz N, Kriechbaumer V, Brooks R, Botchway SW, Brady JP, Hawes C, Dixon AM, Schnell JR, Fricker MD & Frigerio L (2016) A C-terminal amphipathic helix is necessary for the in vivo tubule-shaping function of a plant reticulon. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**: 10902–10907
- de Brito OM & Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* **456**: 605–610
- Bronietzki AW, Schuster M & Schmitz I (2015) Autophagy in T-cell development, activation and differentiation. *Immunol. Cell Biol.* **93**: 25–34
- Busa WB & Nuccitelli R (1985) An elevated free cytosolic Ca²⁺ wave follows fertilization in eggs of the frog, *Xenopus laevis*. *J. Cell Biol.* **100**: 1325–1329
- Caccamo A, Majumder S, Richardson A, Strong R & Oddo S (2010) Molecular interplay between mammalian target of rapamycin (mTOR), amyloid-beta, and Tau: effects on cognitive impairments. *J. Biol. Chem.* **285**: 13107–13120
- Cao Y, Zhang A, Cai J, Yuan N, Lin W, Liu S, Xu F, Song L, Li X, Fang Y, Wang Z, Wang Z, Wang J, Zhang H, Zhao W, Hu S, Zhang S & Wang J (2015) Autophagy regulates the cell cycle of murine HSPCs in a nutrient-dependent manner. *Exp. Hematol.* **43**: 229–242
- Cárdenas C, Miller RA, Smith I, Bui T, Molgó J, Müller M, Vais H, Cheung K-H, Yang J, Parker I, Thompson CB, Birnbaum MJ, Hallows KR & Fostkett JK (2010) Essential regulation of cell bioenergetics by constitutive InsP3 receptor Ca²⁺ transfer to mitochondria. *Cell* **142**: 270–283

- Carlsson SR & Simonsen A (2015) Membrane dynamics in autophagosome biogenesis. *Journal of Cell Science* **128**: 193–205
- Cebollero E, van der Vaart A, Zhao M, Rieter E, Klionsky DJ, Helms JB & Reggiori F (2012) Phosphatidylinositol-3-phosphate clearance plays a key role in autophagosome completion. *Curr. Biol.* **22**: 1545–1553
- Chauhan S, Kumar S, Jain A, Ponpuak M, Mudd MH, Kimura T, Choi SW, Peters R, Mandell M, Bruun J-A, Johansen T & Deretic V (2016) TRIMs and Galectins Globally Cooperate and TRIM16 and Galectin-3 Co-direct Autophagy in Endomembrane Damage Homeostasis. *Developmental Cell* **39**: 13–27
- Chen G, Han Z, Feng D, Chen Y, Chen L, Wu H, Huang L, Zhou C, Cai X, Fu C, Duan L, Wang X, Liu L, Liu X, Shen Y, Zhu Y & Chen Q (2014) A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy. *Mol. Cell* **54**: 362–377
- Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE & Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J. Cell Biol.* **160**: 189–200
- Chen H, Wang X, Tong M, Wu D, Wu S, Chen J, Wang X, Wang X, Kang Y, Tang H, Tang C & Jiang W (2013a) Intermedin suppresses pressure overload cardiac hypertrophy through activation of autophagy. *PLoS ONE* **8**: e64757
- Chen H-J, Anagnostou G, Chai A, Withers J, Morris A, Adhikaree J, Pennetta G & de Bellerocche JS (2010) Characterization of the properties of a novel mutation in VAPB in familial amyotrophic lateral sclerosis. *J. Biol. Chem.* **285**: 40266–40281
- Chen M, Chen Z, Wang Y, Tan Z, Zhu C, Li Y, Han Z, Chen L, Gao R, Liu L & Chen Q (2016) Mitophagy receptor FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics and mitophagy. *Autophagy* **12**: 689–702
- Chen Q, Xiao Y, Chai P, Zheng P, Teng J & Chen J (2019) ATL3 Is a Tubular ER-Phagy Receptor for GABARAP-Mediated Selective Autophagy. *Curr. Biol.* **29**: 846-855.e6
- Chen R, Jin R, Wu L, Ye X, Yang Y, Luo K, Wang W, Wu D, Ye X, Huang L, Huang T & Xiao G (2011) Reticulon 3 attenuates the clearance of cytosolic prion aggregates via inhibiting autophagy. *Autophagy* **7**: 205–216
- Chen S, Novick P & Ferro-Novick S (2013b) ER structure and function. *Current Opinion in Cell Biology* **25**: 428–433
- Chen Y, Scarcelli V & Legouis R (2017) Approaches for Studying Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Cells* **6**: 27
- Cheng S, Wu Y, Lu Q, Yan J, Zhang H & Wang X (2013) Autophagy genes coordinate with the class II PI/PtdIns 3-kinase PIK1-1 to regulate apoptotic cell clearance in *C. elegans*. *Autophagy* **9**: 2022–2032
- Cheong H, Yorimitsu T, Reggiori F, Legakis JE, Wang C-W & Klionsky DJ (2005) Atg17 regulates the magnitude of the autophagic response. *Mol. Biol. Cell* **16**: 3438–3453
- Chino H, Hatta T, Natsume T & Mizushima N (2019) Intrinsically Disordered Protein TEX264 Mediates ER-phagy. *Molecular Cell* Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1097276519302576> [Accessed May 21, 2019]
- Chiramel AI, Dougherty JD, Nair V, Robertson SJ & Best SM (2016) FAM134B, the Selective Autophagy Receptor for Endoplasmic Reticulum Turnover, Inhibits Replication of Ebola Virus Strains Makona and Mayinga. *J. Infect. Dis.* **214**: S319–S325
- Chiurchiù V, Maccarrone M & Orlandi A (2014) The role of reticulons in neurodegenerative diseases. *Neuromolecular Med.* **16**: 3–15
- Cho B, Cho HM, Jo Y, Kim HD, Song M, Moon C, Kim H, Kim K, Sesaki H, Rhyu IJ, Kim H & Sun W (2017) Constriction of the mitochondrial inner compartment is a priming event for mitochondrial division. *Nat Commun* **8**: Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5472732/> [Accessed May 17, 2019]
- Choi J, Jung W & Koo JS (2013) Expression of autophagy-related markers beclin-1, light chain 3A, light chain 3B and p62 according to the molecular subtype of breast cancer. *Histopathology* **62**: 275–286
- Chu CT, Ji J, Dagda RK, Jiang JF, Tyurina YY, Kapralov AA, Tyurin VA, Yanamala N, Shrivastava IH, Mohammadyani D, Wang KZQ, Zhu J, Klein-Seetharaman J, Balasubramanian K, Amoscato AA, Borisenko G, Huang Z, Gusdon AM, Cheikhi A, Steer EK, et al (2013) Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol* **15**: 1197–1205

- Chung J, Torta F, Masai K, Lucast L, Czapla H, Tanner LB, Narayanaswamy P, Wenk MR, Nakatsu F & Camilli PD (2015) PI4P/phosphatidylserine countertransport at ORP5- and ORP8-mediated ER-plasma membrane contacts. *Science* **349**: 428–432
- Cirulli ET, Lasseigne BN, Petrovski S, Sapp PC, Dion PA, Leblond CS, Couthouis J, Lu Y-F, Wang Q, Krueger BJ, Ren Z, Keebler J, Han Y, Levy SE, Boone BE, Wimbish JR, Waite LL, Jones AL, Carulli JP, Day-Williams AG, et al (2015) Exome sequencing in amyotrophic lateral sclerosis identifies risk genes and pathways. *Science* **347**: 1436–1441
- Clapham DE (2007) Calcium signaling. *Cell* **131**: 1047–1058
- Clark SL (1957) Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol* **3**: 349–362
- Cleland WW (1964) DITHIOTHREITOL, A NEW PROTECTIVE REAGENT FOR SH GROUPS. *Biochemistry* **3**: 480–482
- Costello JL, Castro IG, Hacker C, Schrader TA, Metz J, Zeuschner D, Azadi AS, Godinho LF, Costina V, Findeisen P, Manner A, Islinger M & Schrader M (2017) ACBD5 and VAPB mediate membrane associations between peroxisomes and the ER. *J Cell Biol* **216**: 331–342
- Cozzolino M & Carri MT (2012) Mitochondrial dysfunction in ALS. *Prog. Neurobiol.* **97**: 54–66
- Cuervo AM (2004) Autophagy: in sickness and in health. *Trends Cell Biol.* **14**: 70–77
- Cui H, Kong Y & Zhang H (2012) Oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *J Signal Transduct* **2012**: 646354
- D'Alessandro M, Richard M, Stigloher C, Gache V, Boulin T, Richmond JE & Bessereau J-L (2018) CRELD1 is an evolutionarily-conserved maturational enhancer of ionotropic acetylcholine receptors. *eLife* **7**: e39649
- Darsow T, Burd CG & Emr SD (1998) Acidic di-leucine motif essential for AP-3-dependent sorting and restriction of the functional specificity of the Vam3p vacuolar t-SNARE. *J. Cell Biol.* **142**: 913–922
- De Duve C (1963) The lysosome. *Sci. Am.* **208**: 64–72
- De Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattiaux R & Appelmans F (1955) Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* **60**: 604–617
- De Duve C & Wattiaux R (1966) Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* **28**: 435–492
- De Stefani D, Raffaello A, Teardo E, Szabò I & Rizzuto R (2011) A forty-kilodalton protein of the inner membrane is the mitochondrial calcium uniporter. *Nature* **476**: 336–340
- Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gélinas C, Fan Y, Nelson DA, Jin S & White E (2006) Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **10**: 51–64
- Deosaran E, Larsen KB, Hua R, Sargent G, Wang Y, Kim S, Lamark T, Jauregui M, Law K, Lippincott-Schwartz J, Brech A, Johansen T & Kim PK (2013) NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes. *J. Cell. Sci.* **126**: 939–952
- Dephoure N, Zhou C, Villén J, Beausoleil SA, Bakalarski CE, Elledge SJ & Gygi SP (2008) A quantitative atlas of mitotic phosphorylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**: 10762–10767
- Deretic V, Saitoh T & Akira S (2013) Autophagy in infection, inflammation and immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **13**: 722–737
- Di Santo F, Bernardoni P & Piacentini M (2012) The reticulons: Guardians of the structure and function of the endoplasmic reticulum. *Experimental Cell Research* **318**: 1201–1207
- Di Santo F, Fazi B, Tufi R, Nardacci R & Piacentini M (2007) Reticulon-1C acts as a molecular switch between endoplasmic reticulum stress and genotoxic cell death pathway in human neuroblastoma cells. *J. Neurochem.* **102**: 345–353
- Dragatsis I, Levine MS & Zeitlin S (2000) Inactivation of Hdh in the brain and testis results in progressive neurodegeneration and sterility in mice. *Nat. Genet.* **26**: 300–306
- Dupuis L, Gonzalez de Aguilar J-L, di Scala F, Rene F, de Tapia M, Pradat P-F, Lacomblez L, Seihlan D, Prinjha R, Walsh FS, Meininger V & Loeffler J-P (2002) Nogo provides a molecular marker for diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. *Neurobiol. Dis.* **10**: 358–365
- Egan D, Kim J, Shaw RJ & Guan K-L (2011) The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK and mTOR. *Autophagy* **7**: 643–644
- Elbaz-Alon Y, Eisenberg-Bord M, Shinder V, Stiller SB, Shimoni E, Wiedemann N, Geiger T & Schuldiner M (2015) Lam6 Regulates the Extent of Contacts between Organelles. *Cell Rep* **12**: 7–14

- Elbaz-Alon Y, Rosenfeld-Gur E, Shinder V, Futerman AH, Geiger T & Schuldiner M (2014) A dynamic interface between vacuoles and mitochondria in yeast. *Dev. Cell* **30**: 95–102
- Endo M (2009) Calcium-induced calcium release in skeletal muscle. *Physiol. Rev.* **89**: 1153–1176
- Eskelinen E-L (2006) Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol. Aspects Med.* **27**: 495–502
- Evans EA, Gilmore R & Blobel G (1986) Purification of microsomal signal peptidase as a complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **83**: 581–585
- Fader CM, Sánchez DG, Mestre MB & Colombo MI (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
- Fagone P & Jackowski S (2009) Membrane phospholipid synthesis and endoplasmic reticulum function. *J. Lipid Res.* **50** **Suppl**: S311–316
- Fan G, Baker ML, Wang Z, Baker MR, Sinyagovskiy PA, Chiu W, Ludtke SJ & Serysheva II (2015) Gating machinery of InsP3R channels revealed by electron cryomicroscopy. *Nature* **527**: 336–341
- Farré J-C, Burkenroad A, Burnett SF & Subramani S (2013) Phosphorylation of mitophagy and pexophagy receptors coordinates their interaction with Atg8 and Atg11. *EMBO Rep.* **14**: 441–449
- Farré J-C, Manjithaya R, Mathewson RD & Subramani S (2008) PpAtg30 tags peroxisomes for turnover by selective autophagy. *Dev. Cell* **14**: 365–376
- Fazi B, Melino S, De Rubeis S, Bagni C, Paci M, Piacentini M & Di Sano F (2009) Acetylation of RTN-1C regulates the induction of ER stress by the inhibition of HDAC activity in neuroectodermal tumors. *Oncogene* **28**: 3814–3824
- Fehrenbacher KL, Davis D, Wu M, Boldogh I & Pon LA (2002) Endoplasmic reticulum dynamics, inheritance, and cytoskeletal interactions in budding yeast. *Mol. Biol. Cell* **13**: 854–865
- Fei W, Shui G, Gaeta B, Du X, Kuerschner L, Li P, Brown AJ, Wenk MR, Parton RG & Yang H (2008) Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast. *J. Cell Biol.* **180**: 473–482
- Feng Y, Yao Z & Klionsky DJ (2015) How to control self-digestion: transcriptional, post-transcriptional, and post-translational regulation of autophagy. *Trends Cell Biol.* **25**: 354–363
- Fernández-Busnadiego R, Saheki Y & De Camilli P (2015) Three-dimensional architecture of extended synaptotagmin-mediated endoplasmic reticulum–plasma membrane contact sites. *Proc Natl Acad Sci U S A* **112**: E2004–E2013
- Feske S, Gwack Y, Prakriya M, Srikanth S, Puppel S-H, Tanasa B, Hogan PG, Lewis RS, Daly M & Rao A (2006) A mutation in Orai1 causes immune deficiency by abrogating CRAC channel function. *Nature* **441**: 179–185
- Fill M & Copello JA (2002) Ryanodine receptor calcium release channels. *Physiol. Rev.* **82**: 893–922
- Fimia GM, Stoykova A, Romagnoli A, Giunta L, Di Bartolomeo S, Nardacci R, Corazzari M, Fuoco C, Ucar A, Schwartz P, Gruss P, Piacentini M, Chowdhury K & Cecconi F (2007) Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature* **447**: 1121–1125
- Fischer D, Schabhüttl M, Wieland T, Windhager R, Strom TM & Auer-Grumbach M (2014) A novel missense mutation confirms ATL3 as a gene for hereditary sensory neuropathy type 1. *Brain* **137**: e286
- Forrester A, De Leonibus C, Grumati P, Fasana E, Piemontese M, Staiano L, Fregno I, Raimondi A, Marazza A, Bruno G, Iavazzo M, Intartaglia D, Seczynska M, van Anken E, Conte I, De Matteis MA, Dikic I, Molinari M & Settembre C (2019) A selective ER-phagy exerts procollagen quality control via a Calnexin-FAM134B complex. *EMBO J.* **38**:
- Fregno I & Molinari M (2018) Endoplasmic reticulum turnover: ER-phagy and other flavors in selective and non-selective ER clearance. *F1000Res* **7**: 454
- Friedman JR, Dibenedetto JR, West M, Rowland AA & Voeltz GK (2013) Endoplasmic reticulum-endosome contact increases as endosomes traffic and mature. *Mol. Biol. Cell* **24**: 1030–1040
- Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J & Voeltz GK (2011) ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* **334**: 358–362
- Friedman JR, Webster BM, Mastronarde DN, Verhey KJ & Voeltz GK (2010) ER sliding dynamics and ER-mitochondrial contacts occur on acetylated microtubules. *J. Cell Biol.* **190**: 363–375
- Fujikake N, Shin M & Shimizu S (2018) Association Between Autophagy and Neurodegenerative Diseases. *Front Neurosci* **12**: 255

- Fumagalli F, Noack J, Bergmann TJ, Cebollero E, Pisoni GB, Fasana E, Fregno I, Galli C, Loi M, Soldà T, D'Antuono R, Raimondi A, Jung M, Melnyk A, Schorr S, Schreiber A, Simonelli L, Varani L, Wilson-Zbinden C, Zerbe O, et al (2016) Translocon component Sec62 acts in endoplasmic reticulum turnover during stress recovery. *Nat. Cell Biol.* **18**: 1173–1184
- Gandre-Babbe S & van der Blik AM (2008) The Novel Tail-anchored Membrane Protein Mff Controls Mitochondrial and Peroxisomal Fission in Mammalian Cells. *Mol Biol Cell* **19**: 2402–2412
- Gatica D, Lahiri V & Klionsky DJ (2018) Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nature Cell Biology* **20**: 233–242
- Gatta AT, Wong LH, Sere YY, Calderón-Noreña DM, Cockcroft S, Menon AK & Levine TP (2015) A new family of StART domain proteins at membrane contact sites has a role in ER-PM sterol transport. *Elife* **4**:
- Ge L, Melville D, Zhang M & Schekman R (2013) The ER–Golgi intermediate compartment is a key membrane source for the LC3 lipidation step of autophagosome biogenesis. *eLife* **2**: Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3736544/> [Accessed May 18, 2019]
- Gegg ME, Cooper JM, Chau K-Y, Rojo M, Schapira AHV & Taanman J-W (2010) Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet* **19**: 4861–4870
- Geisler JG, Stubbs LJ, Wasserman WW & Mucenski ML (1998) Molecular cloning of a novel mouse gene with predominant muscle and neural expression. *Mamm. Genome* **9**: 274–282
- Geisler S, Holmström KM, Skujat D, Fiesel FC, Rothfuss OC, Kahle PJ & Springer W (2010) PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.* **12**: 119–131
- Geng J & Klionsky DJ (2010) The Golgi as a potential membrane source for autophagy. *Autophagy* **6**: 950–951
- Giampietri C, Petrunaro S, Conti S, Facchiano A, Filippini A & Ziparo E (2015) Cancer Microenvironment and Endoplasmic Reticulum Stress Response. *Mediators Inflamm.* **2015**: 417281
- Gilkey JC, Jaffe LF, Ridgway EB & Reynolds GT (1978) A free calcium wave traverses the activating egg of the medaka, *Oryzias latipes*. *J. Cell Biol.* **76**: 448–466
- Giordano F, Saheki Y, Idevall-Hagren O, Colombo SF, Pirruccello M, Milosevic I, Gracheva EO, Bagriantsev SN, Borgese N & De Camilli P (2013) PI(4,5)P(2)-dependent and Ca(2+)-regulated ER-PM interactions mediated by the extended synaptotagmins. *Cell* **153**: 1494–1509
- Golden A, Liu J & Cohen-Fix O (2009) Inactivation of the *C. elegans* lipin homolog leads to ER disorganization and to defects in the breakdown and reassembly of the nuclear envelope. *J Cell Sci* **122**: 1970–1978
- Gomes LC, Odedra D, Dikic I & Pohl C (2016) Autophagy and modular restructuring of metabolism control germline tumor differentiation and proliferation in *C. elegans*. *Autophagy* **12**: 529–546
- Goyal U & Blackstone C (2013) Untangling the web: Mechanisms underlying ER network formation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1833**: 2492–2498
- Grigoriev I, Gouveia SM, van der Vaart B, Demmers J, Smyth JT, Honnappa S, Splinter D, Steinmetz MO, Putney JW, Hoogenraad CC & Akhmanova A (2008) STIM1 is a MT-plus-end-tracking protein involved in remodeling of the ER. *Curr. Biol.* **18**: 177–182
- Grippa A, Buxó L, Mora G, Funaya C, Idrissi F-Z, Mancuso F, Gomez R, Muntanyà J, Sabidó E & Carvalho P (2015) The seipin complex Fld1/Ldb16 stabilizes ER-lipid droplet contact sites. *J. Cell Biol.* **211**: 829–844
- Grumati P, Dikic I & Stolz A (2018) ER-phagy at a glance. *Journal of Cell Science* **131**: jcs217364
- Grumati P, Morozzi G, Hölper S, Mari M, Harwardt M-LI, Yan R, Müller S, Reggiori F, Heilemann M & Dikic I (2017) Full length RTN3 regulates turnover of tubular endoplasmic reticulum via selective autophagy. *eLife Sciences* **6**: e25555
- Gu J, Hu W, Song Z-P, Chen Y-G, Zhang D-D & Wang C-Q (2016) Rapamycin Inhibits Cardiac Hypertrophy by Promoting Autophagy via the MEK/ERK/Beclin-1 Pathway. *Front Physiol* **7**: 104
- Guo L, Huang J-X, Liu Y, Li X, Zhou S-R, Qian S-W, Liu Y, Zhu H, Huang H-Y, Dang Y-J & Tang Q-Q (2013) Transactivation of Atg4b by C/EBP β promotes autophagy to facilitate adipogenesis. *Mol. Cell. Biol.* **33**: 3180–3190
- Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK & Lippincott-Schwartz J (2010) Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell* **141**: 656–667

- Hamasaki M, Furuta N, Matsuda A, Nezu A, Yamamoto A, Fujita N, Oomori H, Noda T, Haraguchi T, Hiraoka Y, Amano A & Yoshimori T (2013) Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* **495**: 389–393
- Han D, Lerner AG, Vande Walle L, Upton J-P, Xu W, Hagen A, Backes BJ, Oakes SA & Papa FR (2009) IRE1alpha kinase activation modes control alternate endoribonuclease outputs to determine divergent cell fates. *Cell* **138**: 562–575
- Hanada K, Kumagai K, Yasuda S, Miura Y, Kawano M, Fukasawa M & Nishijima M (2003) Molecular machinery for non-vesicular trafficking of ceramide. *Nature* **426**: 803–809
- Hara T, Nakamura K, Matsui M, Yamamoto A, Nakahara Y, Suzuki-Migishima R, Yokoyama M, Mishima K, Saito I, Okano H & Mizushima N (2006) Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature* **441**: 885–889
- Harding HP, Zhang Y, Bertolotti A, Zeng H & Ron D (2000) Perk is essential for translational regulation and cell survival during the unfolded protein response. *Mol. Cell* **5**: 897–904
- Harding HP, Zhang Y & Ron D (1999) Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature* **397**: 271–274
- Hardy J (2010) Genetic analysis of pathways to Parkinson disease. *Neuron* **68**: 201–206
- Hartl FU & Hayer-Hartl M (2009) Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**: 574–581
- Hartleben B, Gödel M, Meyer-Schwesinger C, Liu S, Ulrich T, Köbler S, Wiech T, Grahammer F, Arnold SJ, Lindenmeyer MT, Cohen CD, Pavenstädt H, Kerjaschki D, Mizushima N, Shaw AS, Walz G & Huber TB (2010) Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice. *J. Clin. Invest.* **120**: 1084–1096
- Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T & Yamamoto A (2009) A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell Biol.* **11**: 1433–1437
- He C & Klionsky DJ (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu. Rev. Genet.* **43**: 67–93
- He W, Lu Y, Qahwash I, Hu X-Y, Chang A & Yan R (2004) Reticulon family members modulate BACE1 activity and amyloid-beta peptide generation. *Nat. Med.* **10**: 959–965
- He W, Shi Q, Hu X & Yan R (2007) The membrane topology of RTN3 and its effect on binding of RTN3 to BACE1. *J. Biol. Chem.* **282**: 29144–29151
- Hernández-Ochoa EO, Pratt SJ, Lovering RM & Schneider MF (2016) Critical role of intracellular RyR1 calcium release channels in skeletal muscle function and disease. *Front. Physiol.* **6**: Available at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fphys.2015.00420/full> [Accessed May 18, 2019]
- Hirabayashi Y, Kwon S-K, Paek H, Pernice WM, Paul MA, Lee J, Erfani P, Raczkowski A, Petrey DS, Pon LA & Polleux F (2017) ER-mitochondria tethering by PDZD8 regulates Ca²⁺ dynamics in mammalian neurons. *Science* **358**: 623–630
- Hollien J, Lin JH, Li H, Stevens N, Walter P & Weissman JS (2009) Regulated Ire1-dependent decay of messenger RNAs in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **186**: 323–331
- Holtzman DM, Morris JC & Goate AM (2011) Alzheimer's disease: the challenge of the second century. *Sci Transl Med* **3**: 77sr1
- Hönscher C, Mari M, Auffarth K, Bohnert M, Griffith J, Geerts W, van der Laan M, Cabrera M, Reggiori F & Ungermann C (2014) Cellular metabolism regulates contact sites between vacuoles and mitochondria. *Dev. Cell* **30**: 86–94
- Hsieh C-H, Shaltouki A, Gonzalez AE, da Cruz AB, Burbulla LF, St Lawrence E, Schüle B, Krainc D, Palmer TD & Wang X (2016) Functional Impairment in Miro Degradation and Mitophagy Is a Shared Feature in Familial and Sporadic Parkinson's Disease. *Cell Stem Cell* **19**: 709–724
- Hu G, McQuiston T, Bernard A, Park Y-D, Qiu J, Vural A, Zhang N, Waterman SR, Blewett NH, Myers TG, Maraia RJ, Kehrl JH, Uzel G, Klionsky DJ & Williamson PR (2015) A conserved mechanism of TOR-dependent RCK-mediated mRNA degradation regulates autophagy. *Nat. Cell Biol.* **17**: 930–942
- Hu J, Shibata Y, Voss C, Shemesh T, Li Z, Coughlin M, Kozlov MM, Rapoport TA & Prinz WA (2008) Membrane proteins of the endoplasmic reticulum induce high-curvature tubules. *Science* **319**: 1247–1250
- Hu J, Shibata Y, Zhu P-P, Voss C, Rismanchi N, Prinz WA, Rapoport TA & Blackstone C (2009) A class of dynamin-like GTPases involved in the generation of the tubular ER network. *Cell* **138**: 549–561

- Hu X, Shi Q, Zhou X, He W, Yi H, Yin X, Gearing M, Levey A & Yan R (2007) Transgenic mice overexpressing reticulon 3 develop neuritic abnormalities. *EMBO J.* **26**: 2755–2767
- Huo H, Zhou Z, Wang B, Qin J, Liu W & Gu Y (2014) Dramatic suppression of colorectal cancer cell growth by the dual mTORC1 and mTORC2 inhibitor AZD-2014. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**: 406–412
- Hurley JH (2015) ESCRTs are everywhere. *EMBO J.* **34**: 2398–2407
- Hyttinen JMT, Niittykoski M, Salminen A & Kaarniranta K (2013) Maturation of autophagosomes and endosomes: a key role for Rab7. *Biochim. Biophys. Acta* **1833**: 503–510
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T & Ohsumi Y (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**: 488–492
- Idevall-Hagren O, Lü A, Xie B & De Camilli P (2015) Triggered Ca²⁺ influx is required for extended synaptotagmin 1-induced ER-plasma membrane tethering. *EMBO J.* **34**: 2291–2305
- Islam F, Gopalan V & Lam AK-Y (2017) RETREG1 (FAM134B): A new player in human diseases: 15 years after the discovery in cancer. *J. Cell. Physiol.*
- Islam F, Gopalan V, Law S, Tang JC-O & Lam AK-Y (2019) FAM134B promotes esophageal squamous cell carcinoma in vitro and its correlations with clinicopathologic features. *Hum. Pathol.*
- Itakura E, Kishi-Itakura C & Mizushima N (2012) The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* **151**: 1256–1269
- Itakura E & Mizushima N (2013) Syntaxin 17: the autophagosomal SNARE. *Autophagy* **9**: 917–919
- Iwahashi J, Kawasaki I, Kohara Y, Gengyo-Ando K, Mitani S, Ohshima Y, Hamada N, Hara K, Kashiwagi T & Toyoda T (2002) *Caenorhabditis elegans* reticulon interacts with RME-1 during embryogenesis. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **293**: 698–704
- Jacquemyn J, Cascalho A & Goodchild RE (2017) The ins and outs of endoplasmic reticulum-controlled lipid biosynthesis. *EMBO reports* **18**: 1905–1921
- Jacquier N, Choudhary V, Mari M, Toulmay A, Reggiori F & Schneider R (2011) Lipid droplets are functionally connected to the endoplasmic reticulum in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Cell. Sci.* **124**: 2424–2437
- Jaeger PA, Pickford F, Sun C-H, Lucin KM, Masliah E & Wyss-Coray T (2010) Regulation of amyloid precursor protein processing by the Beclin 1 complex. *PLoS ONE* **5**: e11102
- Jagannathan S, Reid DW, Cox AH & Nicchitta CV (2014) De novo translation initiation on membrane-bound ribosomes as a mechanism for localization of cytosolic protein mRNAs to the endoplasmic reticulum. *RNA* **20**: 1489–1498
- Jahreiss L, Menzies FM & Rubinsztein DC (2008) The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes. *Traffic* **9**: 574–587
- Jenzer C, Simionato E, Largeau C, Scarcelli V, Lefebvre C & Legouis R (2019) Autophagy mediates phosphatidylserine exposure and phagosome degradation during apoptosis through specific functions of GABARAP/LGG-1 and LC3/LGG-2. *Autophagy* **15**: 228–241
- Jeong H, Park J, Jun Y & Lee C (2017) Crystal structures of Mmm1 and Mdm12–Mmm1 reveal mechanistic insight into phospholipid trafficking at ER-mitochondria contact sites. *PNAS* **114**: E9502–E9511
- Jia W, Pua HH, Li Q-J & He Y-W (2011) Autophagy regulates endoplasmic reticulum homeostasis and calcium mobilization in T lymphocytes. *J. Immunol.* **186**: 1564–1574
- Jiang P, Nishimura T, Sakamaki Y, Itakura E, Hatta T, Natsume T & Mizushima N (2014) The HOPS complex mediates autophagosome–lysosome fusion through interaction with syntaxin 17. *Mol. Biol. Cell*: mbc.E13-08-0447
- Jiang X, Overholtzer M & Thompson CB (2015) Autophagy in cellular metabolism and cancer. *J. Clin. Invest.* **125**: 47–54
- Joensuu M, Belevich I, Rämö O, Nevzorov I, Vihinen H, Puhka M, Witkos TM, Lowe M, Vartiainen MK & Jokitalo E (2014) ER sheet persistence is coupled to myosin 1c-regulated dynamic actin filament arrays. *Mol Biol Cell* **25**: 1111–1126
- Jokic N, Gonzalez de Aguilar J-L, Pradat P-F, Dupuis L, Echaniz-Laguna A, Muller A, Dubourg O, Seilhean D, Hauw J-J, Loeffler J-P & Meisinger V (2005) Nogo expression in muscle correlates with amyotrophic lateral sclerosis severity. *Ann. Neurol.* **57**: 553–556

- Josephson A, Widenfalk J, Widmer HW, Olson L & Spenger C (2001) NOGO mRNA Expression in Adult and Fetal Human and Rat Nervous Tissue and in Weight Drop Injury. *Experimental Neurology* **169**: 319–328
- Jung HS, Chung KW, Won Kim J, Kim J, Komatsu M, Tanaka K, Nguyen YH, Kang TM, Yoon K-H, Kim J-W, Jeong YT, Han MS, Lee M-K, Kim K-W, Shin J & Lee M-S (2008) Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia. *Cell Metab.* **8**: 318–324
- Kabeya Y, Kamada Y, Baba M, Takikawa H, Sasaki M & Ohsumi Y (2005) Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy. *Mol. Biol. Cell* **16**: 2544–2553
- Kadir R, Harel T, Markus B, Perez Y, Bakhrat A, Cohen I, Volodarsky M, Feintsein-Linial M, Chervinski E, Zlotogora J, Sivan S, Birnbaum RY, Abdu U, Shalev S & Birk OS (2016) ALFY-Controlled DVL3 Autophagy Regulates Wnt Signaling, Determining Human Brain Size. *PLoS Genet.* **12**: e1005919
- Kaizuka T & Mizushima N (2016) Atg13 Is Essential for Autophagy and Cardiac Development in Mice. *Mol. Cell. Biol.* **36**: 585–595
- Kalvakolanu DV & Gade P (2012) IFNG and autophagy: a critical role for the ER-stress mediator ATF6 in controlling bacterial infections. *Autophagy* **8**: 1673–1674
- Kang Y-A, Sanalkumar R, O’Geen H, Linnemann AK, Chang C-J, Bouhassira EE, Farnham PJ, Keles S & Bresnick EH (2012) Autophagy driven by a master regulator of hematopoiesis. *Mol. Cell. Biol.* **32**: 226–239
- Kanki T, Furukawa K & Yamashita S (2015) Mitophagy in yeast: Molecular mechanisms and physiological role. *Biochim. Biophys. Acta* **1853**: 2756–2765
- Kanki T & Klionsky DJ (2008) Mitophagy in yeast occurs through a selective mechanism. *J. Biol. Chem.* **283**: 32386–32393
- Kanki T, Wang K, Cao Y, Baba M & Klionsky DJ (2009) Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev. Cell* **17**: 98–109
- Kant R van der, Zondervan I, Janssen L & Neefjes J (2013) Cholesterol-binding molecules MLN64 and ORP1L mark distinct late endosomes with transporters ABCA3 and NPC1. *J. Lipid Res.* **54**: 2153–2165
- Karnezis T, Mandemakers W, McQualter JL, Zheng B, Ho PP, Jordan KA, Murray BM, Barres B, Tessier-Lavigne M & Bernard CCA (2004) The neurite outgrowth inhibitor Nogo A is involved in autoimmune-mediated demyelination. *Nat. Neurosci.* **7**: 736–744
- Kaushik S & Cuervo AM (2015) Degradation of lipid droplet-associated proteins by chaperone-mediated autophagy facilitates lipolysis. *Nat. Cell Biol.* **17**: 759–770
- Kawaguchi N, Tashiro K, Taniguchi K, Kawai M, Tanaka K, Okuda J, Hayashi M & Uchiyama K (2018) Nogo-B (Reticulon-4B) functions as a negative regulator of the apoptotic pathway through the interaction with c-FLIP in colorectal cancer cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1864**: 2600–2609
- Kawamata T, Kamada Y, Kabeya Y, Sekito T & 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 AK, Akutsu M, Liebmann L, Stolz A, Nietzsche S, Koch N, Mauthe M, Katona I, Qualmann B, Weis J, Reggiori F, Kurth I, Hübner CA & Dikic I (2015) Regulation of endoplasmic reticulum turnover by selective autophagy. *Nature* **522**: 354–358
- Khan SA, Sathyanarayan A, Mashek MT, Ong KT, Wollaston-Hayden EE & Mashek DG (2015) ATGL-catalyzed lipolysis regulates SIRT1 to control PGC-1 α /PPAR- α signaling. *Diabetes* **64**: 418–426
- Kim J, Dalton VM, Eggerton KP, Scott SV & Klionsky DJ (1999) Apg7p/Cvt2p is required for the cytoplasm-to-vacuole targeting, macroautophagy, and peroxisome degradation pathways. *Mol. Biol. Cell* **10**: 1337–1351
- Kim J, Kamada Y, Stromhaug PE, Guan J, Hefner-Gravink A, Baba M, Scott SV, Ohsumi Y, Dunn WA & Klionsky DJ (2001) Cvt9/Gsa9 functions in sequestering selective cytosolic cargo destined for the vacuole. *J. Cell Biol.* **153**: 381–396
- Kim J, Kim YC, Fang C, Russell RC, Kim JH, Fan W, Liu R, Zhong Q & Guan K-L (2013a) Differential regulation of distinct Vps34 complexes by AMPK in nutrient stress and autophagy. *Cell* **152**: 290–303
- Kim J, Kundu M, Viollet B & Guan K-L (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* **13**: 132–141
- Kim PK, Hailey DW, Mullen RT & Lippincott-Schwartz J (2008) Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins and peroxisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 20567–20574

- Kim S, Kedan A, Marom M, Gavert N, Keinan O, Selitrennik M, Laufman O & Lev S (2013b) The phosphatidylinositol-transfer protein Nir2 binds phosphatidic acid and positively regulates phosphoinositide signalling. *EMBO Rep.* **14**: 891–899
- Kim YC & Guan K-L (2015) mTOR: a pharmacologic target for autophagy regulation. *J. Clin. Invest.* **125**: 25–32
- Kim YJ, Guzman-Hernandez M-L, Wisniewski E & Balla T (2015) Phosphatidylinositol-Phosphatidic Acid Exchange by Nir2 at ER-PM Contact Sites Maintains Phosphoinositide Signaling Competence. *Dev. Cell* **33**: 549–561
- Kirisako T, Baba M, Ishihara N, Miyazawa K, Ohsumi M, Yoshimori T, Noda T & Ohsumi Y (1999) Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J. Cell Biol.* **147**: 435–446
- Kirisako T, Ichimura Y, Okada H, Kabeya Y, Mizushima N, Yoshimori T, Ohsumi M, Takao T, Noda T & Ohsumi Y (2000) The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway. *J. Cell Biol.* **151**: 263–276
- Kiriyama Y & Nochi H (2015) The Function of Autophagy in Neurodegenerative Diseases. *Int J Mol Sci* **16**: 26797–26812
- Kirkin V, McEwan DG, Novak I & Dikic I (2009) A role for ubiquitin in selective autophagy. *Mol. Cell* **34**: 259–269
- Klionsky DJ & Codogno P (2013) The mechanism and physiological function of macroautophagy. *J Innate Immun* **5**: 427–433
- Klionsky DJ & Ohsumi Y (1999) Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **15**: 1–32
- Klopfenstein DR, Kappeler F & Hauri HP (1998) A novel direct interaction of endoplasmic reticulum with microtubules. *EMBO J.* **17**: 6168–6177
- Klopfenstein DR, Klumperman J, Lustig A, Kammerer RA, Oorschot V & Hauri H-P (2001) Subdomain-specific Localization of CLIMP-63 (p63) in the Endoplasmic Reticulum Is Mediated by Its Luminal α -Helical Segment. *The Journal of Cell Biology* **153**: 13
- Knævelsrud H, Sjøreng K, Raiborg C, Håberg K, Rasmuson F, Brech A, Liestøl K, Rusten TE, Stenmark H, Neufeld TP, Carlsson SR & Simonsen A (2013) Membrane remodeling by the PX-BAR protein SNX18 promotes autophagosome formation. *J. Cell Biol.* **202**: 331–349
- Kojima R, Endo T & Tamura Y (2016) A phospholipid transfer function of ER-mitochondria encounter structure revealed in vitro. *Sci Rep* **6**: 30777
- Komatsu M, Waguri S, Chiba T, Murata S, Iwata J, Tanida I, Ueno T, Koike M, Uchiyama Y, Kominami E & Tanaka K (2006) Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature* **441**: 880–884
- Komatsu M, Waguri S, Ueno T, Iwata J, Murata S, Tanida I, Ezaki J, Mizushima N, Ohsumi Y, Uchiyama Y, Kominami E, Tanaka K & Chiba T (2005) Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J. Cell Biol.* **169**: 425–434
- Kondapalli C, Kazlauskaitė A, Zhang N, Woodroof HI, Campbell DG, Gurlay R, Burchell L, Walden H, Macartney TJ, Deak M, Knebel A, Alessi DR & Muqit MMK (2012) PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biol* **2**: 120080
- Kondo-Okamoto N, Noda NN, Suzuki SW, Nakatogawa H, Takahashi I, Matsunami M, Hashimoto A, Inagaki F, Ohsumi Y & Okamoto K (2012) Autophagy-related protein 32 acts as autophagic degron and directly initiates mitophagy. *J. Biol. Chem.* **287**: 10631–10638
- Kornak U, Mademan I, Schinke M, Voigt M, Krawitz P, Hecht J, Barvencik F, Schinke T, Gießelmann S, Beil FT, Pou-Serradell A, Vílchez JJ, Beetz C, Deconinck T, Timmerman V, Kaether C, De Jonghe P, Hübner CA, Gal A, Amling M, et al (2014) Sensory neuropathy with bone destruction due to a mutation in the membrane-shaping atlastin GTPase 3. *Brain* **137**: 683–692
- Kornmann B, Currie E, Collins SR, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman JS & Walter P (2009) An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* **325**: 477–481
- Kovsan J, Bashan N, Greenberg AS & Rudich A (2010) Potential role of autophagy in modulation of lipid metabolism. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **298**: E1–7
- Kriechbaumer V, Maneta-Peyret L, Fouillen L, Botchway SW, Upson J, Hughes L, Richardson J, Kittelmann M, Moreau P & Hawes C (2018) The odd one out: Arabidopsis reticulon 20 does not bend ER

- membranes but has a role in lipid regulation. *Scientific Reports* **8**: Available at: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-20840-0> [Accessed April 6, 2019]
- Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T & Mizushima N (2004) The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* **432**: 1032–1036
- Kume H, Konishi Y, Murayama KS, Kametani F & Araki W (2009) Expression of reticulon 3 in Alzheimer's disease brain. *Neuropathology and Applied Neurobiology* **35**: 178–188
- Kundu M, Lindsten T, Yang C-Y, Wu J, Zhao F, Zhang J, Selak MA, Ney PA & Thompson CB (2008) Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood* **112**: 1493–1502
- Lamb CA, Yoshimori T & Tooze SA (2013) The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **14**: 759–774
- Lang A, John Peter AT & Kornmann B (2015) ER-mitochondria contact sites in yeast: beyond the myths of ERMES. *Curr. Opin. Cell Biol.* **35**: 7–12
- Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, Sideris DP, Fogel AI & Youle RJ (2015) The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature* **524**: 309–314
- Leber R, Silles E, Sandoval IV & Mazón MJ (2001) Yol082p, a novel CVT protein involved in the selective targeting of aminopeptidase I to the yeast vacuole. *J. Biol. Chem.* **276**: 29210–29217
- Lee A-H, Chu GC, Iwakoshi NN & Glimcher LH (2005) XBP-1 is required for biogenesis of cellular secretory machinery of exocrine glands. *EMBO J.* **24**: 4368–4380
- Lee C & Chen LB (1988) Dynamic behavior of endoplasmic reticulum in living cells. *Cell* **54**: 37–46
- Lee E, Koo Y, Ng A, Wei Y, Luby-Phelps K, Juraszek A, Xavier RJ, Cleaver O, Levine B & Amatruda JF (2014) Autophagy is essential for cardiac morphogenesis during vertebrate development. *Autophagy* **10**: 572–587
- Lees JA, Messa M, Sun EW, Wheeler H, Torta F, Wenk MR, Camilli PD & Reinisch KM (2017) Lipid transport by TMEM24 at ER-plasma membrane contacts regulates pulsatile insulin secretion. *Science* **355**: eaah6171
- Lennemann NJ & Coyne CB (2017) Dengue and Zika viruses subvert reticulophagy by NS2B3-mediated cleavage of FAM134B. *Autophagy* **13**: 322–332
- Lepock JR (2005) How do cells respond to their thermal environment? *Int J Hyperthermia* **21**: 681–687
- Levine B & Kroemer G (2008) Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell* **132**: 27–42
- Lewis SC, Uchiyama LF & Nunnari J (2016) ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science* **353**: aaf5549
- Li M, Hou Y, Wang J, Chen X, Shao Z-M & Yin X-M (2011) Kinetics comparisons of mammalian Atg4 homologues indicate selective preferences toward diverse Atg8 substrates. *J. Biol. Chem.* **286**: 7327–7338
- Li S, Wang G, Gao L-R, Lu W-H, Wang X-Y, Chuai M, Lee KKH, Cao L & Yang X (2015) Autophagy is involved in ethanol-induced cardiac bifida during chick cardiogenesis. *Cell Cycle* **14**: 3306–3317
- Li Z, Schulze RJ, Weller SG, Krueger EW, Schott MB, Zhang X, Casey CA, Liu J, Stöckli J, James DE & McNiven MA (2016) A novel Rab10-EHBPI-EHD2 complex essential for the autophagic engulfment of lipid droplets. *Sci Adv* **2**: e1601470
- Liang JR, Lingeman E, Ahmed S & Corn JE (2018) Atlastins remodel the endoplasmic reticulum for selective autophagy. *The Journal of Cell Biology* **217**: 3354–3367
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H & Levine B (1999) Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* **402**: 672–676
- Lin C-Y, Zhang P-H, Chen Y-J, Wu C-L & Tsai H-J (2019) Conditional Overexpression of rtn4al in Muscle of Adult Zebrafish Displays Defects Similar to Human Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Mar Biotechnol* **21**: 52–64
- Liu L, Sakakibara K, Chen Q & Okamoto K (2014) Receptor-mediated mitophagy in yeast and mammalian systems. *Cell Res.* **24**: 787–795
- Liu R, Zhi X & Zhong Q (2015) ATG14 controls SNARE-mediated autophagosome fusion with a lysosome. *Autophagy* **11**: 847–849
- Liu X-X & Liu F-J (2015) Novel bioinformatic identification of differentially expressed tissue-specific and cancer-related proteins from the Human Protein Atlas for biomarker discovery. *Genet. Mol. Res.* **14**: 4557–4565

- Liu Y, Dargusch R, Maher P & Schubert D (2008) A broadly neuroprotective derivative of curcumin. *Journal of Neurochemistry* **105**: 1336–1345
- Lodhi IJ & Semenkovich CF (2014) Peroxisomes: a nexus for lipid metabolism and cellular signaling. *Cell Metab.* **19**: 380–392
- Loewen CJR, Roy A & Levine TP (2003) A conserved ER targeting motif in three families of lipid binding proteins and in Opi1p binds VAP. *EMBO J.* **22**: 2025–2035
- Longatti A, Lamb CA, Razi M, Yoshimura S, Barr FA & Tooze SA (2012) TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *J. Cell Biol.* **197**: 659–675
- Lu J, Sun D, Liu Z, Li M, Hong H, Liu C, Gao S, Li H, Cai Y, Chen S, Li Z, Ye J & Liu P (2016) SIRT6 suppresses isoproterenol-induced cardiac hypertrophy through activation of autophagy. *Transl Res* **172**: 96–112.e6
- Lu K, den Brave F & Jentsch S (2017) Receptor oligomerization guides pathway choice between proteasomal and autophagic degradation. *Nat. Cell Biol.* **19**: 732–739
- Lu L, Ladinsky MS & Kirchhausen T (2009) Cisternal organization of the endoplasmic reticulum during mitosis. *Mol. Biol. Cell* **20**: 3471–3480
- Lu L, Ladinsky MS & Kirchhausen T (2011) Formation of the postmitotic nuclear envelope from extended ER cisternae precedes nuclear pore assembly. *J. Cell Biol.* **194**: 425–440
- Lv X, Jiang H, Li B, Liang Q, Wang S, Zhao Q & Jiao J (2014) The crucial role of Atg5 in cortical neurogenesis during early brain development. *Sci Rep* **4**: 6010
- Mackeh R, Perdiz D, Lorin S, Codogno P & Poüs C (2013) Autophagy and microtubules - new story, old players. *J. Cell. Sci.* **126**: 1071–1080
- Maejima I, Takahashi A, Omori H, Kimura T, Takabatake Y, Saitoh T, Yamamoto A, Hamasaki M, Noda T, Isaka Y & Yoshimori T (2013) Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury. *EMBO J* **32**: 2336–2347
- Magré J, Delépine M, Khallouf E, Gedde-Dahl T, Maldergem LV, Sobel E, Papp J, Meier M, Mégarbané A, Group BW, Lathrop M & Capeau J (2001) Identification of the gene altered in Berardinelli–Seip congenital lipodystrophy on chromosome 11q13. *Nature Genetics* **28**: 365
- Majumder S, Richardson A, Strong R & Oddo S (2011) Inducing autophagy by rapamycin before, but not after, the formation of plaques and tangles ameliorates cognitive deficits. *PLoS ONE* **6**: e25416
- Malhotra JD & Kaufman RJ (2007) Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid. Redox Signal.* **9**: 2277–2293
- Manford AG, Stefan CJ, Yuan HL, Macgurn JA & Emr SD (2012) ER-to-plasma membrane tethering proteins regulate cell signaling and ER morphology. *Dev. Cell* **23**: 1129–1140
- Manil-Ségalen M, Lefebvre C, Jenzer C, Trichet M, Boulogne C, Satiat-Jeuemaitre B & Legouis R (2014) The *C. elegans* LC3 acts downstream of GABARAP to degrade autophagosomes by interacting with the HOPS subunit VPS39. *Dev. Cell* **28**: 43–55
- Mann SS & Hammarback JA (1994) Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A and MAP1B. *J. Biol. Chem.* **269**: 11492–11497
- Mao K, Wang K, Liu X & Klionsky DJ (2013) The scaffold protein Atg11 recruits fission machinery to drive selective mitochondria degradation by autophagy. *Dev Cell* **26**: 9–18
- Martina JA, Chen Y, Gucek M & Puertollano R (2012) MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB. *Autophagy* **8**: 903–914
- Martinez-Lopez N, Garcia-Macia M, Sahu S, Athonvarangkul D, Liebling E, Merlo P, Cecconi F, Schwartz GJ & Singh R (2016) Autophagy in the CNS and Periphery Coordinate Lipophagy and Lipolysis in the Brown Adipose Tissue and Liver. *Cell Metab.* **23**: 113–127
- Maruyama H & Kawakami H (2013) Optineurin and amyotrophic lateral sclerosis. *Geriatrics & Gerontology International* **13**: 528–532
- Masiero E, Agatea L, Mammucari C, Blaauw B, Loro E, Komatsu M, Metzger D, Reggiani C, Schiaffino S & Sandri M (2009) Autophagy is required to maintain muscle mass. *Cell Metab.* **10**: 507–515
- Matos L, Gouveia AM & Almeida H (2015) ER Stress Response in Human Cellular Models of Senescence. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* **70**: 924–935
- Matsushima M, Fujiwara T, Takahashi E, Minaguchi T, Eguchi Y, Tsujimoto Y, Suzumori K & Nakamura Y (1998) Isolation, mapping, and functional analysis of a novel human cDNA (BNIP3L) encoding a protein homologous to human NIP3. *Genes Chromosomes Cancer* **21**: 230–235

- Mavlyutov TA, Epstein ML, Andersen KA, Ziskind-Conhaim L & Ruoho AE (2010) The sigma-1 receptor is enriched in postsynaptic sites of C-terminals in mouse motoneurons. An anatomical and behavioral study. *Neuroscience* **167**: 247–255
- McCorquodale DS, Ozomaro U, Huang J, Montenegro G, Kushman A, Citrigno L, Price J, Speziani F, Pericak-Vance MA & Züchner S (2011) Mutation screening of spastin, atlastin, and REEP1 in hereditary spastic paraplegia. *Clin. Genet.* **79**: 523–530
- McCullough S & Lucocq J (2005) Endoplasmic reticulum positioning and partitioning in mitotic HeLa cells. *Journal of Anatomy* **206**: 415–425
- McLelland G-L, Lee SA, McBride HM & Fon EA (2016) Syntaxin-17 delivers PINK1/parkin-dependent mitochondrial vesicles to the endolysosomal system. *J Cell Biol* **214**: 275–291
- McQuiston A & Diehl JA (2017) Recent insights into PERK-dependent signaling from the stressed endoplasmic reticulum. *F1000Res* **6**: 1897
- Mesmin B, Bigay J, Moser von Filseck J, Lacas-Gervais S, Drin G & Antonny B (2013) A four-step cycle driven by PI(4)P hydrolysis directs sterol/PI(4)P exchange by the ER-Golgi tether OSBP. *Cell* **155**: 830–843
- Meyer DI, Krause E & Dobberstein B (1982) Secretory protein translocation across membranes—the role of the ‘docking protein’. *Nature* **297**: 647
- Miller BC, Zhao Z, Stephenson LM, Cadwell K, Pua HH, Lee HK, Mizushima NN, Iwasaki A, He Y-W, Swat W & Virgin HW (2008) The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development. *Autophagy* **4**: 309–314
- Min S-W, Chang W-P & Südhof TC (2007) E-Syts, a family of membranous Ca²⁺-sensor proteins with multiple C2 domains. *PNAS* **104**: 3823–3828
- Miracco C, Cosci E, Oliveri G, Luzi P, Pacenti L, Monciatti I, Mannucci S, De Nisi MC, Toscano M, Malagnino V, Falzarano SM, Pirtoli L & Tosi P (2007) Protein and mRNA expression of autophagy gene Beclin 1 in human brain tumours. *Int. J. Oncol.* **30**: 429–436
- Mizushima N & Levine B (2010) Autophagy in mammalian development and differentiation. *Nature cell biology* **12**: 823–830
- Mochida K, Oikawa Y, Kimura Y, Kirisako H, Hirano H, Ohsumi Y & Nakatogawa H (2015) Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus. *Nature* **522**: 359
- Mollereau B (2015) Cooling-Induced ER Stress is Good for Your Brain. *EBioMedicine* **2**: 482–483
- Montenegro G, Rebelo AP, Connell J, Allison R, Babalini C, D’Aloia M, Montieri P, Schüle R, Ishiura H, Price J, Strickland A, Gonzalez MA, Baumbach-Reardon L, Deconinck T, Huang J, Bernardi G, Vance JM, Rogers MT, Tsuji S, De Jonghe P, et al (2012) Mutations in the ER-shaping protein reticulon 2 cause the axon-degenerative disorder hereditary spastic paraplegia type 12. *J. Clin. Invest.* **122**: 538–544
- Morel E (2017) La formation de l’autophagosome - Un nouveau défi pour le biologiste cellulaire. *Med Sci (Paris)* **33**: 217–220
- Mortensen M, Soilleux EJ, Djordjevic G, Tripp R, Lutteropp M, Sadighi-Akha E, Stranks AJ, Glanville J, Knight S, Jacobsen S-EW, Kranc KR & Simon AK (2011) The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance. *J. Exp. Med.* **208**: 455–467
- Motley AM, Nuttall JM & Hettema EH (2012) Pex3-anchored Atg36 tags peroxisomes for degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **31**: 2852–2868
- Mulkey RM & Zucker RS (1991) Action potentials must admit calcium to evoke transmitter release. *Nature* **350**: 153–155
- Müller O, Sattler T, Flötenmeyer M, Schwarz H, Plattner H & Mayer A (2000) Autophagic tubes: vacuolar invaginations involved in lateral membrane sorting and inverse vesicle budding. *J. Cell Biol.* **151**: 519–528
- Murley A, Lackner LL, Osman C, West M, Voeltz GK, Walter P & Nunnari J (2013) ER-associated mitochondrial division links the distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast. *Elife* **2**: e00422
- Murley A, Sarsam RD, Toulmay A, Yamada J, Prinz WA & Nunnari J (2015) Ltc1 is an ER-localized sterol transporter and a component of ER-mitochondria and ER-vacuole contacts. *J. Cell Biol.* **209**: 539–548
- Nakai A, Yamaguchi O, Takeda T, Higuchi Y, Hikoso S, Taniike M, Omiya S, Mizote I, Matsumura Y, Asahi M, Nishida K, Hori M, Mizushima N & Otsu K (2007) The role of autophagy in cardiomyocytes in the basal state and in response to hemodynamic stress. *Nat. Med.* **13**: 619–624

- Nakatogawa H & Mochida K (2015) Reticulophagy and nucleophagy: New findings and unsolved issues. *Autophagy* **11**: 2377–2378
- Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen D-F, Gautier CA, Shen J, Cookson MR & Youle RJ (2010) PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin. *PLoS Biol* **8**: Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2811155/> [Accessed April 23, 2019]
- Nascimbeni AC, Giordano F, Dupont N, Grasso D, Vaccaro MI, Codogno P & Morel E (2017) ER-plasma membrane contact sites contribute to autophagosome biogenesis by regulation of local PI3P synthesis. *EMBO J*. **36**: 2018–2033
- Nazarko TY, Farré J-C & Subramani S (2009) Peroxisome size provides insights into the function of autophagy-related proteins. *Mol. Biol. Cell* **20**: 3828–3839
- Nguyen TT, Lewandowska A, Choi J-Y, Markgraf DF, Junker M, Bilgin M, Ejsing CS, Voelker DR, Rapoport TA & Shaw JM (2012) Gem1 and ERMES do not directly affect phosphatidylserine transport from ER to mitochondria or mitochondrial inheritance. *Traffic* **13**: 880–890
- Ni H-M, Williams JA & Ding W-X (2014) Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control. *Redox Biol* **4**: 6–13
- Nishida K & Otsu K (2015) Autophagy during cardiac remodeling. *J. Mol. Cell. Cardiol.*
- Nixon RA, Wegiel J, Kumar A, Yu WH, Peterhoff C, Cataldo A & Cuervo AM (2005) Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64**: 113–122
- Nixon-Abell J, Obara CJ, Weigel AV, Li D, Legant WR, Xu CS, Pasolli HA, Harvey K, Hess HF, Betzig E, Blackstone C & Lippincott-Schwartz J (2016) Increased spatiotemporal resolution reveals highly dynamic dense tubular matrices in the peripheral ER. *Science* **354**: aaf3928
- Noda NN, Kumeta H, Nakatogawa H, Satoo K, Adachi W, Ishii J, Fujioka Y, Ohsumi Y & Inagaki F (2008) Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy. *Genes Cells* **13**: 1211–1218
- Novak I & Dikic I (2011) Autophagy receptors in developmental clearance of mitochondria. *Autophagy* **7**: 301–303
- Oakes SA & Papa FR (2015) The role of endoplasmic reticulum stress in human pathology. *Annu Rev Pathol* **10**: 173–194
- Ochaba J, Lukacsovich T, Csikos G, Zheng S, Margulis J, Salazar L, Mao K, Lau AL, Yeung SY, Humbert S, Saudou F, Klionsky DJ, Finkbeiner S, Zeitlin SO, Marsh JL, Housman DE, Thompson LM & Steffan JS (2014) Potential function for the Huntingtin protein as a scaffold for selective autophagy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **111**: 16889–16894
- Oertle T, Klinger M, Stuermer CAO & Schwab ME (2003) A reticular rhapsody: phylogenetic evolution and nomenclature of the *RTN/Nogo* gene family. *The FASEB Journal* **17**: 1238–1247
- Olden K, Pratt RM & Yamada KM (1979) Role of carbohydrate in biological function of the adhesive glycoprotein fibronectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **76**: 3343–3347
- Olmos Y, Hodgson L, Mantell J, Verkade P & Carlton JG (2015) ESCRT-III controls nuclear envelope reformation. *Nature* **522**: 236–239
- Osellame LD, Singh AP, Stroud DA, Palmer CS, Stojanovski D, Ramachandran R & Ryan MT (2016) Cooperative and independent roles of the Drp1 adaptors Mff, MiD49 and MiD51 in mitochondrial fission. *J. Cell. Sci.* **129**: 2170–2181
- Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ & Mihara K (2010) Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Biol.* **191**: 1141–1158
- Oude Weernink PA, Han L, Jakobs KH & Schmidt M (2007) Dynamic phospholipid signaling by G protein-coupled receptors. *Biochim. Biophys. Acta* **1768**: 888–900
- Paix A, Folkmann A, Rasoloson D & Seydoux G (2015) High Efficiency, Homology-Directed Genome Editing in *Caenorhabditis elegans* Using CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Complexes. *Genetics* **201**: 47–54
- Palikaras K, Lionaki E & Tavernarakis N (2015) Mitophagy: In sickness and in health. *Mol Cell Oncol* **3**: Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4845207/> [Accessed April 23, 2019]
- Palmer CS, Osellame LD, Laine D, Koutsopoulos OS, Frazier AE & Ryan MT (2011) MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep.* **12**: 565–573
- Palomo GM & Manfredi G (2015) Exploring new pathways of neurodegeneration in ALS: the role of mitochondria quality control. *Brain Res.* **1607**: 36–46

- Pampliega O, Orhon I, Patel B, Sridhar S, Díaz-Carretero A, Beau I, Codogno P, Satir BH, Satir P & Cuervo AM (2013) Functional interaction between autophagy and ciliogenesis. *Nature* **502**: 194–200
- Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G & 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
- Papinski D & Kraft C (2014) Atg1 kinase organizes autophagosome formation by phosphorylating Atg9. *Autophagy* **10**: 1338–1340
- Parekh AB & Penner R (1997) Store depletion and calcium influx. *Physiol. Rev.* **77**: 901–930
- Parekh VV, Wu L, Boyd KL, Williams JA, Gaddy JA, Olivares-Villagómez D, Cover TL, Zong W-X, Zhang J & Van Kaer L (2013) Impaired autophagy, defective T cell homeostasis, and a wasting syndrome in mice with a T cell-specific deletion of Vps34. *J. Immunol.* **190**: 5086–5101
- Pathak GP, Shah R, Kennedy BE, Murphy JP, Clements D, Konda P, Giacomantonio M, Xu Z, Schlaepfer IR & Gujar S (2018) RTN4 Knockdown Dysregulates the AKT Pathway, Destabilizes the Cytoskeleton, and Enhances Paclitaxel-Induced Cytotoxicity in Cancers. *Molecular Therapy* **26**: 2019–2033
- Peretti D, Dahan N, Shimoni E, Hirschberg K & Lev S (2008) Coordinated Lipid Transfer between the Endoplasmic Reticulum and the Golgi Complex Requires the VAP Proteins and Is Essential for Golgi-mediated Transport. *MBoC* **19**: 3871–3884
- Peter ATJ, Herrmann B, Antunes D, Rapaport D, Dimmer KS & Kornmann B (2017) Vps13-Mcp1 interact at vacuole–mitochondria interfaces and bypass ER–mitochondria contact sites. *J Cell Biol* **216**: 3219–3229
- Pfaffenwimmer T, Reiter W, Brach T, Nogellova V, Papinski D, Schuschnig M, Abert C, Ammerer G, Martens S & Kraft C (2014) Hrr25 kinase promotes selective autophagy by phosphorylating the cargo receptor Atg19. *EMBO Rep.* **15**: 862–870
- Phillips MJ & Voeltz GK (2016) Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **17**: 69–82
- Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B & Wyss-Coray T (2008) The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease and regulates amyloid beta accumulation in mice. *J. Clin. Invest.* **118**: 2190–2199
- Pinzón-Olejua A, Welte C, Abdesselem H, Málaga-Trillo E & Stuermer CA (2014) Essential roles of zebrafish rtn4/Nogo paralogues in embryonic development. *Neural Development* **9**: 8
- Poteryaev D, Squirrell JM, Campbell JM, White JG & Spang A (2005) Involvement of the actin cytoskeleton and homotypic membrane fusion in ER dynamics in *Caenorhabditis elegans*. *Mol. Biol. Cell* **16**: 2139–2153
- Potter MD & Nicchitta CV (2002) Endoplasmic reticulum-bound ribosomes reside in stable association with the translocon following termination of protein synthesis. *J. Biol. Chem.* **277**: 23314–23320
- Prakriya M & Lewis RS (2015) Store-Operated Calcium Channels. *Physiol. Rev.* **95**: 1383–1436
- Pua HH, Dzhagalov I, Chuck M, Mizushima N & He Y-W (2007) A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *J. Exp. Med.* **204**: 25–31
- Puhka M, Joensuu M, Vihinen H, Belevich I & Jokitalo E (2012) Progressive sheet-to-tubule transformation is a general mechanism for endoplasmic reticulum partitioning in dividing mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **23**: 2424–2432
- Puhka M, Vihinen H, Joensuu M & Jokitalo E (2007) Endoplasmic reticulum remains continuous and undergoes sheet-to-tubule transformation during cell division in mammalian cells. *The Journal of Cell Biology* **179**: 895–909
- Puri C, Renna M, Bento CF, Moreau K & Rubinsztein DC (2013) Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell* **154**: 1285–1299
- Putney JW (1986) A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium* **7**: 1–12
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen E-L, Mizushima N, Ohsumi Y, Cattoretti G & Levine B (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J. Clin. Invest.* **112**: 1809–1820
- Raiborg C, Wenzel EM, Pedersen NM, Olsvik H, Schink KO, Schultz SW, Vietri M, Nisi V, Bucci C, Brech A, Johansen T & Stenmark H (2015) Repeated ER-endosome contacts promote endosome translocation and neurite outgrowth. *Nature* **520**: 234–238

- Rämö O, Kumar D, Gucciardo E, Joensuu M, Saarekas M, Vihinen H, Belevich I, Smolander O-P, Qian K, Auvinen P & Jokitalo E (2016) NOGO-A/RTN4A and NOGO-B/RTN4B are simultaneously expressed in epithelial, fibroblast and neuronal cells and maintain ER morphology. *Scientific Reports* **6**: Available at: <http://www.nature.com/articles/srep35969> [Accessed March 6, 2019]
- Rapizzi E, Pinton P, Szabadkai G, Wieckowski MR, Vandecasteele G, Baird G, Tuft RA, Fogarty KE & Rizzuto R (2002) Recombinant expression of the voltage-dependent anion channel enhances the transfer of Ca²⁺ microdomains to mitochondria. *J Cell Biol* **159**: 613–624
- Rapoport TA (2007) Protein translocation across the eukaryotic endoplasmic reticulum and bacterial plasma membranes. *Nature* **450**: 663–669
- Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C & Rubinsztein DC (2010) Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat. Cell Biol.* **12**: 747–757
- Redmann M, Darley-Usmar V & Zhang J (2016) The Role of Autophagy, Mitophagy and Lysosomal Functions in Modulating Bioenergetics and Survival in the Context of Redox and Proteotoxic Damage: Implications for Neurodegenerative Diseases. *Aging Dis* **7**: 150–162
- Reid DW & Nicchitta CV (2015) Diversity and selectivity in mRNA translation on the endoplasmic reticulum. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16**: 221–231
- Reimold AM, Iwakoshi NN, Manis J, Vallabhajosyula P, Szomolanyi-Tsuda E, Gravalles EM, Friend D, Grusby MJ, Alt F & Glimcher LH (2001) Plasma cell differentiation requires the transcription factor XBP-1. *Nature* **412**: 300–307
- Richardson CE, Kinkel S & Kim DH (2011) Physiological IRE-1-XBP-1 and PEK-1 Signaling in *Caenorhabditis elegans* Larval Development and Immunity. *PLoS Genetics* **7**: e1002391
- Rismanchi N, Soderblom C, Stadler J, Zhu P-P & Blackstone C (2008) Atlastin GTPases are required for Golgi apparatus and ER morphogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **17**: 1591–1604
- Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA & Pozzan T (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* **280**: 1763–1766
- Rocha N, Kuijl C, van der Kant R, Janssen L, Houben D, Janssen H, Zwart W & Neefjes J (2009) Cholesterol sensor ORP1L contacts the ER protein VAP to control Rab7-RILP-p150 Glued and late endosome positioning. *J. Cell Biol.* **185**: 1209–1225
- Roebroek AJ, Contreras B, Pauli IG & Van de Ven WJ (1998) cDNA cloning, genomic organization, and expression of the human RTN2 gene, a member of a gene family encoding reticulons. *Genomics* **51**: 98–106
- Roos J, DiGregorio PJ, Yeromin AV, Ohlsen K, Lioudyno M, Zhang S, Safrina O, Kozak JA, Wagner SL, Cahalan MD, Velicelebi G & Stauderman KA (2005) STIM1, an essential and conserved component of store-operated Ca²⁺ channel function. *J. Cell Biol.* **169**: 435–445
- Rowland AA, Chitwood PJ, Phillips MJ & Voeltz GK (2014) ER Contact Sites Define the Position and Timing of Endosome Fission. *Cell* **159**: 1027–1041
- Ruggiano A, Foresti O & Carvalho P (2014) Quality control: ER-associated degradation: protein quality control and beyond. *J. Cell Biol.* **204**: 869–879
- Rui Y-N, Xu Z, Patel B, Chen Z, Chen D, Tito A, David G, Sun Y, Stimming EF, Bellen HJ, Cuervo AM & Zhang S (2015) Huntingtin functions as a scaffold for selective macroautophagy. *Nat. Cell Biol.* **17**: 262–275
- Russell RC, Yuan H-X & Guan K-L (2014) Autophagy regulation by nutrient signaling. *Cell Res* **24**: 42–57
- Saheki Y, Bian X, Schauder CM, Sawaki Y, Surma MA, Klose C, Pincet F, Reinisch KM & De Camilli P (2016) Control of plasma membrane lipid homeostasis by the extended synaptotagmins. *Nat. Cell Biol.* **18**: 504–515
- Salo VT, Belevich I, Li S, Karhinen L, Vihinen H, Vigouroux C, Magré J, Thiele C, Hölttä-Vuori M, Jokitalo E & Ikonen E (2016) Seipin regulates ER–lipid droplet contacts and cargo delivery. *The EMBO Journal* **35**: 2699–2716
- Sandoval H, Thiagarajan P, Dasgupta SK, Schumacher A, Prchal JT, Chen M & Wang J (2008) Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells. *Nature* **454**: 232–235
- Sanger JM, Dome JS, Mittal B, Somlyo AV & Sanger JW (1989) Dynamics of the endoplasmic reticulum in living non-muscle and muscle cells. *Cell Motil. Cytoskeleton* **13**: 301–319
- Sato TK, Darsow T & Emr SD (1998) Vam7p, a SNAP-25-like molecule, and Vam3p, a syntaxin homolog, function together in yeast vacuolar protein trafficking. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 5308–5319

- Schaaf MBE, Keulers TG, Vooijs MA & Rouschop KMA (2016) LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions. *The FASEB Journal* **30**: 3961–3978
- Schanda K, Hermann M, Stefanova N, Gredler V, Bandtlow C & Reindl M (2011) Nogo-B is associated with cytoskeletal structures in human monocyte-derived macrophages. *BMC Res Notes* **4**: 6
- Schauder CM, Wu X, Saheki Y, Narayanaswamy P, Torta F, Wenk MR, De Camilli P & Reinisch KM (2014) Structure of a lipid-bound extended synaptotagmin indicates a role in lipid transfer. *Nature* **510**: 552–555
- Schroeder B, Schulze RJ, Weller SG, Sletten AC, Casey CA & McNiven MA (2015) The small GTPase Rab7 as a central regulator of hepatocellular lipophagy. *Hepatology* **61**: 1896–1907
- Schuck S, Gallagher CM & Walter P (2014) ER-phagy mediates selective degradation of endoplasmic reticulum independently of the core autophagy machinery. *J. Cell. Sci.* **127**: 4078–4088
- Schuck S, Prinz WA, Thorn KS, Voss C & Walter P (2009) Membrane expansion alleviates endoplasmic reticulum stress independently of the unfolded protein response. *The Journal of Cell Biology* **187**: 525–536
- Schulze RJ, Sathyanarayan A & Mashek DG (2017) Breaking fat: The regulation and mechanisms of lipophagy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids* **1862**: 1178–1187
- Schwab ME (2010) Functions of Nogo proteins and their receptors in the nervous system. *Nat Rev Neurosci* **11**: 799–811
- Schwarz RT & Datema R (1980) Inhibitors of protein glycosylation. *Trends in Biochemical Sciences* **5**: 65–67
- Schweizer A, Ericsson M, Bächli T, Griffiths G & Hauri HP (1993) Characterization of a novel 63 kDa membrane protein. Implications for the organization of the ER-to-Golgi pathway. *J. Cell. Sci.* **104 (Pt 3)**: 671–683
- Scott SV, Guan J, Hutchins MU, Kim J & Klionsky DJ (2001) Cvt19 Is a Receptor for the Cytoplasm-to-Vacuole Targeting Pathway. *Mol Cell* **7**: 1131–1141
- Sentelle RD, Senkal CE, Jiang W, Ponnusamy S, Gencer S, Selvam SP, Ramshesh VK, Peterson YK, Lemasters JJ, Szulc ZM, Bielawski J & Ogretmen B (2012) Ceramide targets autophagosomes to mitochondria and induces lethal mitophagy. *Nat Chem Biol* **8**: 831–838
- Shen Y-C, Chen C-F & Chiou W-F (2002) Andrographolide prevents oxygen radical production by human neutrophils: possible mechanism(s) involved in its anti-inflammatory effect. *Br. J. Pharmacol.* **135**: 399–406
- Shen Z, Li Y, Gasparski AN, Abeliovich H & Greenberg ML (2017) Cardiolipin Regulates Mitophagy through the Protein Kinase C Pathway. *J. Biol. Chem.* **292**: 2916–2923
- Shi Q, Ge Y, He W, Hu X & Yan R (2017) RTN1 and RTN3 protein are differentially associated with senile plaques in Alzheimer's brains. *Sci Rep* **7**: Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5522448/> [Accessed April 22, 2019]
- Shi Q, Ge Y, Sharoar MdG, He W, Xiang R, Zhang Z, Hu X & Yan R (2014) Impact of RTN3 Deficiency on Expression of BACE1 and Amyloid Deposition. *J Neurosci* **34**: 13954–13962
- Shi Y, Vattem KM, Sood R, An J, Liang J, Stramm L & Wek RC (1998) Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol. Cell. Biol.* **18**: 7499–7509
- Shibata Y, Shemesh T, Prinz WA, Palazzo AF, Kozlov MM & Rapoport TA (2010) Mechanisms determining the morphology of the peripheral ER. *Cell* **143**: 774–788
- Shibata Y, Voss C, Rist JM, Hu J, Rapoport TA, Prinz WA & Voeltz GK (2008) The Reticulon and Dp1/Yop1p Proteins Form Immobile Oligomers in the Tubular Endoplasmic Reticulum. *Journal of Biological Chemistry* **283**: 18892–18904
- Shoshan-Barmatz V & Gincel D (2003) The voltage-dependent anion channel: characterization, modulation, and role in mitochondrial function in cell life and death. *Cell Biochem. Biophys.* **39**: 279–292
- Singh R, Xiang Y, Wang Y, Baikati K, Cuervo AM, Luu YK, Tang Y, Pessin JE, Schwartz GJ & Czaja MJ (2009) Autophagy regulates adipose mass and differentiation in mice. *J. Clin. Invest.* **119**: 3329–3339
- Smith MD, Harley ME, Kemp AJ, Wills J, Lee M, Arends M, von Kriegsheim A, Behrends C & Wilkinson S (2018) CCPG1 Is a Non-canonical Autophagy Cargo Receptor Essential for ER-Phagy and Pancreatic ER Proteostasis. *Dev. Cell* **44**: 217–232.e11

- Smyth JT, Beg AM, Wu S, Putney JW & Rusan NM (2012) Phosphoregulation of STIM1 leads to exclusion of the endoplasmic reticulum from the mitotic spindle. *Curr. Biol.* **22**: 1487–1493
- Song B, Chi Y, Li X, Du W, Han Z-B, Tian J, Li J, Chen F, Wu H, Han L, Lu S, Zheng Y & Han Z (2015) Inhibition of Notch Signaling Promotes the Adipogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Through Autophagy Activation and PTEN-PI3K/AKT/mTOR Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* **36**: 1991–2002
- Sparkes I, Tolley N, Aller I, Svozil J, Osterrieder A, Botchway S, Mueller C, Frigerio L & Hawes C (2010) Five Arabidopsis reticulon isoforms share endoplasmic reticulum location, topology, and membrane-shaping properties. *Plant Cell* **22**: 1333–1343
- Spilman P, Podluskaya N, Hart MJ, Debnath J, Gorostiza O, Bredesen D, Richardson A, Strong R & Galvan V (2010) Inhibition of mTOR by rapamycin abolishes cognitive deficits and reduces amyloid-beta levels in a mouse model of Alzheimer's disease. *PLoS ONE* **5**: e9979
- Sriburi R, Jackowski S, Mori K & Brewer JW (2004) XBP1: a link between the unfolded protein response, lipid biosynthesis, and biogenesis of the endoplasmic reticulum. *J. Cell Biol.* **167**: 35–41
- Stefan CJ, Manford AG, Baird D, Yamada-Hanff J, Mao Y & Emr SD (2011) Osh Proteins Regulate Phosphoinositide Metabolism at ER-Plasma Membrane Contact Sites. *Cell* **144**: 389–401
- Steffan JS (2010) Does Huntingtin play a role in selective macroautophagy? *Cell Cycle* **9**: 3401–3413
- Steiner P, Kulangara K, Sarria JCF, Glauser L, Regazzi R & Hirling H (2004) Reticulon 1-C/neuroendocrine-specific protein-C interacts with SNARE proteins. *J. Neurochem.* **89**: 569–580
- Stolz A, Ernst A & Dikic I (2014) Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat. Cell Biol.* **16**: 495–501
- Strohecker AM, Guo JY, Karsli-Uzunbas G, Price SM, Chen GJ, Mathew R, McMahon M & White E (2013) Autophagy sustains mitochondrial glutamine metabolism and growth of BrafV600E-driven lung tumors. *Cancer Discov* **3**: 1272–1285
- Sugiura A, McLelland G-L, Fon EA & McBride HM (2014) A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J* **33**: 2142–2156
- Suzuki K, Kirisako T, Kamada Y, Mizushima N, Noda T & Ohsumi Y (2001) The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *The EMBO journal* **20**: 5971–5981
- Suzuki K & Ohsumi Y (2010) Current knowledge of the pre-autophagosomal structure (PAS). *FEBS Lett.* **584**: 1280–1286
- Szabadkai G, Bianchi K, Várnai P, De Stefani D, Wieckowski MR, Cavagna D, Nagy AI, Balla T & Rizzuto R (2006) Chaperone-mediated coupling of endoplasmic reticulum and mitochondrial Ca²⁺ channels. *J. Cell Biol.* **175**: 901–911
- Szymanski KM, Binns D, Bartz R, Grishin NV, Li W-P, Agarwal AK, Garg A, Anderson RGW & Goodman JM (2007) The lipodystrophy protein seipin is found at endoplasmic reticulum lipid droplet junctions and is important for droplet morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**: 20890–20895
- Tabb JS, Molyneaux BJ, Cohen DL, Kuznetsov SA & Langford GM (1998) Transport of ER vesicles on actin filaments in neurons by myosin V. *J. Cell. Sci.* **111 (Pt 21)**: 3221–3234
- Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, Eishi Y, Hino O, Tanaka K & Mizushima N (2011) Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* **25**: 795–800
- Takáts S, Nagy P, Varga A, Pircs K, Kárpáti M, Varga K, Kovács AL, Hegedűs K & Juhász G (2013) Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in *Drosophila*. *J. Cell Biol.* **201**: 531–539
- Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T & Ohsumi Y (1992) Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* **119**: 301–311
- Talaber G, Miklossy G, Oaks Z, Liu Y, Tooze SA, Chudakov DM, Banki K & Perl A (2014) HRES-1/Rab4 promotes the formation of LC3(+) autophagosomes and the accumulation of mitochondria during autophagy. *PLoS ONE* **9**: e84392
- Tan T, Ozbalci C, Brügger B, Rapaport D & Dimmer KS (2013) Mcp1 and Mcp2, two novel proteins involved in mitochondrial lipid homeostasis. *J. Cell. Sci.* **126**: 3563–3574
- Taneike M, Nishida K, Omiya S, Zarrinpashneh E, Misaka T, Kitazume-Taneike R, Austin R, Takaoka M, Yamaguchi O, Gambello MJ, Shah AM & Otsu K (2016) mTOR Hyperactivation by Ablation of Tuberous Sclerosis Complex 2 in the Mouse Heart Induces Cardiac Dysfunction with the Increased

- Number of Small Mitochondria Mediated through the Down-Regulation of Autophagy. *PLoS ONE* **11**: e0152628
- Tang WK, Chui CH, Fatima S, Kok SHL, Pak KC, Ou TM, Hui KS, Wong MM, Wong J, Law S, Tsao SW, Lam KY, Beh PSL, Srivastava G, Chan ASC, Ho KP & Tang JCO (2007) Oncogenic properties of a novel gene JK-1 located in chromosome 5p and its overexpression in human esophageal squamous cell carcinoma. *Int. J. Mol. Med.* **19**: 915–923
- Tang Z, Lin MG, Stowe TR, Chen S, Zhu M, Stearns T, Franco B & Zhong Q (2013) Autophagy promotes primary ciliogenesis by removing OFD1 from centriolar satellites. *Nature* **502**: 254–257
- Tang Z, Zhu M & Zhong Q (2014) Self-eating to remove cilia roadblock. *Autophagy* **10**: 379–381
- Terasaki M, Chen LB & Fujiwara K (1986) Microtubules and the endoplasmic reticulum are highly interdependent structures. *The Journal of Cell Biology* **103**: 1557–1568
- Terasaki M, Song J, Wong JR, Weiss MJ & Chen LB (1984) Localization of endoplasmic reticulum in living and glutaraldehyde-fixed cells with fluorescent dyes. *Cell* **38**: 101–108
- Tews B, Schönig K, Arzt ME, Clementi S, Rioult-Pedotti M-S, Zemmar A, Berger SM, Schneider M, Enkel T, Weinmann O, Kasper H, Schwab ME & Bartsch D (2013) Synthetic microRNA-mediated downregulation of Nogo-A in transgenic rats reveals its role as regulator of synaptic plasticity and cognitive function. *PNAS* **110**: 6583–6588
- Thurston TLM, Ryzhakov G, Bloor S, von Muhlinen N & Randow F (2009) The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. *Nat. Immunol.* **10**: 1215–1221
- Thurston TLM, Wandel MP, von Muhlinen N, Foeglein A & Randow F (2012) Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. *Nature* **482**: 414–418
- Tolley N, Sparkes I, Craddock CP, Eastmond PJ, Runions J, Hawes C & Frigerio L (2010) Transmembrane domain length is responsible for the ability of a plant reticulon to shape endoplasmic reticulum tubules in vivo. *The Plant Journal* **64**: 411–418
- Tolley N, Sparkes IA, Hunter PR, Craddock CP, Nuttall J, Roberts LM, Hawes C, Pedrazzini E & Frigerio L (2008) Overexpression of a Plant Reticulon Remodels the Lumen of the Cortical Endoplasmic Reticulum but Does not Perturb Protein Transport. *Traffic* **9**: 94–102
- Torpe N, Nørgaard S, Høye AM & Pocock R (2017) Developmental Wiring of Specific Neurons Is Regulated by RET-1/Nogo-A in *Caenorhabditis elegans*. *Genetics* **205**: 295–302
- Toulmay A & Prinz WA (2012) A conserved membrane-binding domain targets proteins to organelle contact sites. *J Cell Sci* **125**: 49–58
- Trempe J-F, Sauvé V, Grenier K, Seirafi M, Tang MY, Ménade M, Al-Abdul-Wahid S, Krett J, Wong K, Kozlov G, Nagar B, Fon EA & Gehring K (2013) Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. *Science* **340**: 1451–1455
- Tsukada M & Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **333**: 169–174
- Ueda H, Yokota E, Kutsuna N, Shimada T, Tamura K, Shimmen T, Hasezawa S, Dolja VV & Hara-Nishimura I (2010) Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **107**: 6894–6899
- van der Vaart A, Griffith J & Reggiori F (2010) Exit from the Golgi is required for the expansion of the autophagosomal phagophore in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **21**: 2270–2284
- Vance JE (1990) Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J. Biol. Chem.* **265**: 7248–7256
- Vázquez P, Arroba AI, Cecconi F, de la Rosa EJ, Boya P & de Pablo F (2012) Atg5 and Ambra1 differentially modulate neurogenesis in neural stem cells. *Autophagy* **8**: 187–199
- Vedrenne C, Klopfenstein DR & Hauri H-P (2005) Phosphorylation controls CLIMP-63-mediated anchoring of the endoplasmic reticulum to microtubules. *Mol. Biol. Cell* **16**: 1928–1937
- Vevea JD, Garcia EJ, Chan RB, Zhou B, Schultz M, Di Paolo G, McCaffery JM & Pon LA (2015) Role for Lipid Droplet Biogenesis and Microlipophagy in Adaptation to Lipid Imbalance in Yeast. *Dev. Cell* **35**: 584–599
- Vietri M, Schink KO, Campsteijn C, Wegner CS, Schultz SW, Christ L, Thoresen SB, Brech A, Raiborg C & Stenmark H (2015) Spastin and ESCRT-III coordinate mitotic spindle disassembly and nuclear envelope sealing. *Nature* **522**: 231–235
- Voeltz GK, Prinz WA, Shibata Y, Rist JM & Rapoport TA (2006) A class of membrane proteins shaping the tubular endoplasmic reticulum. *Cell* **124**: 573–586

- Vollrath JT, Sechi A, Dreser A, Katona I, Wiemuth D, Vervoorts J, Dohmen M, Chandrasekar A, Prause J, Brauers E, Jesse CM, Weis J & Goswami A (2014) Loss of function of the ALS protein SigR1 leads to ER pathology associated with defective autophagy and lipid raft disturbances. *Cell Death Dis* **5**: e1290
- Wagner W, Brenowitz SD & Hammer JA (2011) Myosin-Va transports the endoplasmic reticulum into the dendritic spines of Purkinje neurons. *Nat. Cell Biol.* **13**: 40–48
- Wakana Y, Koyama S, Nakajima K, Hatsuzawa K, Nagahama M, Tani K, Hauri H-P, Melançon P & Tagaya M (2005) Reticulon 3 is involved in membrane trafficking between the endoplasmic reticulum and Golgi. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334**: 1198–1205
- Wakefield S & Tear G (2006) The Drosophila reticulon, Rtnl-1, has multiple differentially expressed isoforms that are associated with a sub-compartment of the endoplasmic reticulum. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**: 2027–2038
- Wälchli T, Pernet V, Weinmann O, Shiu J-Y, Guzik-Kornacka A, Decrey G, Yüksel D, Schneider H, Vogel J, Ingber DE, Vogel V, Frei K & Schwab ME (2013) Nogo-A is a negative regulator of CNS angiogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **110**: E1943-1952
- Walther TC, Chung J & Farese RV (2017) Lipid Droplet Biogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **33**: 491–510
- Wan Q, Kuang E, Dong W, Zhou S, Xu H, Qi Y & Liu Y (2007) Reticulon 3 mediates Bcl-2 accumulation in mitochondria in response to endoplasmic reticulum stress. *Apoptosis* **12**: 319–328
- Wang C-W, Miao Y-H & Chang Y-S (2014) Control of lipid droplet size in budding yeast requires the collaboration between Fld1 and Ldb16. *J. Cell. Sci.* **127**: 1214–1228
- Wang G, Huang W, Cui S, Li S, Wang X, Li Y, Chuai M, Cao L, Li J, Lu D & Yang X (2015) Autophagy is involved in high glucose-induced heart tube malformation. *Cell Cycle* **14**: 772–783
- Wang H, Becuwe M, Housden BE, Chitraju C, Porras AJ, Graham MM, Liu XN, Thiam AR, Savage DB, Agarwal AK, Garg A, Olarte M-J, Lin Q, Fröhlich F, Hannibal-Bach HK, Upadhyayula S, Perrimon N, Kirchhausen T, Ejsing CS, Walther TC, et al (2016) Seipin is required for converting nascent to mature lipid droplets. *Elife* **5**:
- Wang X, Winter D, Ashrafi G, Schlehe J, Wong YL, Selkoe D, Rice S, Steen J, LaVoie MJ & Schwarz TL (2011) PINK1 and Parkin Target Miro for Phosphorylation and Degradation to Arrest Mitochondrial Motility. *Cell* **147**: 893–906
- Wang Y, Mattson MP & Furukawa K (2002) Endoplasmic reticulum calcium release is modulated by actin polymerization. *J. Neurochem.* **82**: 945–952
- Waterman-Storer CM, Gregory J, Parsons SF & Salmon ED (1995) Membrane/microtubule tip attachment complexes (TACs) allow the assembly dynamics of plus ends to push and pull membranes into tubulovesicular networks in interphase Xenopus egg extracts. *The Journal of Cell Biology* **130**: 1161–1169
- Waterman-Storer CM & Salmon ED (1998) Endoplasmic reticulum membrane tubules are distributed by microtubules in living cells using three distinct mechanisms. *Curr. Biol.* **8**: 798–806
- Webb JL, Ravikumar B & Rubinsztein DC (2004) Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **36**: 2541–2550
- Wei Y, Chiang W-C, Sumpter R, Mishra P & Levine B (2017) Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell* **168**: 224-238.e10
- Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V & Elazar Z (2010) LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J.* **29**: 1792–1802
- West M, Zurek N, Hoenger A & Voeltz GK (2011) A 3D analysis of yeast ER structure reveals how ER domains are organized by membrane curvature. *The Journal of Cell Biology* **193**: 333–346
- Westrate LM, Lee JE, Prinz WA & Voeltz GK (2015) Form follows function: the importance of endoplasmic reticulum shape. *Annu. Rev. Biochem.* **84**: 791–811
- White E (2015) The role for autophagy in cancer. *J. Clin. Invest.* **125**: 42–46
- Wijdeven RH, Janssen H, Nahidiazar L, Janssen L, Jalink K, Berlin I & Neefjes J (2016) Cholesterol and ORP1L-mediated ER contact sites control autophagosome transport and fusion with the endocytic pathway. *Nature Communications* **7**: 11808

- Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov VV, Brady NR, Richter B, Korac J, Waidmann O, Choudhary C, Dötsch V, Bumann D & Dikic I (2011) Phosphorylation of the Autophagy Receptor Optineurin Restricts Salmonella Growth. *Science* **333**: 228–233
- Wilfling F, Thiam AR, Olarte M-J, Wang J, Beck R, Gould TJ, Allgeyer ES, Pincet F, Bewersdorf J, Farese RV & Walther TC (2014) Arf1/COPI machinery acts directly on lipid droplets and enables their connection to the ER for protein targeting. *Elife* **3**: e01607
- Wojcik S, Engel WK & Askanas V (2006) Increased expression of Noga-A in ALS muscle biopsies is not unique for this disease. *Acta Myol* **25**: 116–118
- Woo JS, Srikanth S, Nishi M, Ping P, Takeshima H & Gwack Y (2016) Junctophilin-4, a component of the endoplasmic reticulum–plasma membrane junctions, regulates Ca²⁺ dynamics in T cells. *PNAS* **113**: 2762–2767
- Wu H, Carvalho P & Voeltz GK (2018) Here, there, and everywhere: The importance of ER membrane contact sites. *Science* **361**:
- Wu W, Lin C, Wu K, Jiang L, Wang X, Li W, Zhuang H, Zhang X, Chen H, Li S, Yang Y, Lu Y, Wang J, Zhu R, Zhang L, Sui S, Tan N, Zhao B, Zhang J, Li L, et al (2016a) FUNDC1 regulates mitochondrial dynamics at the ER–mitochondrial contact site under hypoxic conditions. *EMBO J* **35**: 1368–1384
- Wu X, Fleming A, Ricketts T, Pavel M, Virgin H, Menzies FM & Rubinsztein DC (2016b) Autophagy regulates Notch degradation and modulates stem cell development and neurogenesis. *Nat Commun* **7**: 10533
- Wu Y, Whiteus C, Xu CS, Hayworth KJ, Weinberg RJ, Hess HF & Camilli PD (2017) Contacts between the endoplasmic reticulum and other membranes in neurons. *PNAS* **114**: E4859–E4867
- Xilouri M & Stefanis L (2015) Chaperone mediated autophagy to the rescue: A new-fangled target for the treatment of neurodegenerative diseases. *Mol. Cell. Neurosci.* **66**: 29–36
- Xu D, Li Y, Wu L, Li Y, Zhao D, Yu J, Huang T, Ferguson C, Parton RG, Yang H & Li P (2018) Rab18 promotes lipid droplet (LD) growth by tethering the ER to LDs through SNARE and NRZ interactions. *J. Cell Biol.* **217**: 975–995
- Xu D-W, Zhang G-Q, Wang Z-W, Xu X-Y & Liu T-X (2015) Autophagy in tumorigenesis and cancer treatment. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **16**: 2167–2175
- Xu H, Zhou Q, Liu X & Qi Y-P (2006) Co-involvement of the mitochondria and endoplasmic reticulum in cell death induced by the novel ertargeted protein HAP. *Cellular and Molecular Biology Letters* **11**: 249–255
- Xu N, Zhang SO, Cole RA, McKinney SA, Guo F, Haas JT, Bobba S, Farese RV & Mak HY (2012) The FATP1-DGAT2 complex facilitates lipid droplet expansion at the ER-lipid droplet interface. *J. Cell Biol.* **198**: 895–911
- Yamamoto A, Tagawa Y, Yoshimori T, Moriyama Y, Masaki R & Tashiro Y (1998) Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. *Cell Struct. Funct.* **23**: 33–42
- Yamamoto Y & Sakisaka T (2018) The peroxisome biogenesis factors posttranslationally target reticulon homology domain-containing proteins to the endoplasmic reticulum membrane. *Scientific Reports* **8**: Available at: <http://www.nature.com/articles/s41598-018-20797-0> [Accessed March 6, 2019]
- Yang J, Carra S, Zhu W-G & Kampinga HH (2013) The regulation of the autophagic network and its implications for human disease. *Int. J. Biol. Sci.* **9**: 1121–1133
- Yang YS & Strittmatter SM (2007) The reticulons: a family of proteins with diverse functions. *Genome Biology* **8**: 234
- Yazdankhah M, Farioli-Vecchioli S, Tonchev AB, Stoykova A & Cecconi F (2014) The autophagy regulators Ambra1 and Beclin 1 are required for adult neurogenesis in the brain subventricular zone. *Cell Death Dis* **5**: e1403
- Yokota T, Mishra M, Akatsu H, Tani Y, Miyauchi T, Yamamoto T, Kosaka K, Nagai Y, Sawada T & Heese K (2006) Brain site-specific gene expression analysis in Alzheimer’s disease patients. *Eur. J. Clin. Invest.* **36**: 820–830
- Yorimitsu T & Klionsky DJ (2007) Endoplasmic reticulum stress: a new pathway to induce autophagy. *Autophagy* **3**: 160–162
- Yu L, McPhee CK, Zheng L, Mardones GA, Rong Y, Peng J, Mi N, Zhao Y, Liu Z, Wan F, Hailey DW, Oorschot V, Klumperman J, Baehrecke EH & Lenardo MJ (2010) Termination of autophagy and reformation of lysosomes regulated by mTOR. *Nature* **465**: 942–946

- Yuan H-X, Russell RC & Guan K-L (2013) Regulation of PIK3C3/VPS34 complexes by MTOR in nutrient stress-induced autophagy. *Autophagy* **9**: 1983–1995
- Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ & Heintz N (2003) Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 15077–15082
- Zajac AL, Goldman YE, Holzbaur ELF & Ostap EM (2013) Local cytoskeletal and organelle interactions impact molecular-motor-driven early endosomal trafficking. *Curr. Biol.* **23**: 1173–1180
- van der Zand A, Gent J, Braakman I & Tabak HF (2012) Biochemically distinct vesicles from the endoplasmic reticulum fuse to form peroxisomes. *Cell* **149**: 397–409
- Zeeshan HMA, Lee GH, Kim H-R & Chae H-J (2016) Endoplasmic Reticulum Stress and Associated ROS. *International Journal of Molecular Sciences* **17**: 327
- Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, Gonzalez FJ & Semenza GL (2008) Mitochondrial Autophagy Is an HIF-1-dependent Adaptive Metabolic Response to Hypoxia. *J Biol Chem* **283**: 10892–10903
- Zhang J, Liu J, Liu L, McKeehan WL & Wang F (2012a) The fibroblast growth factor signaling axis controls cardiac stem cell differentiation through regulating autophagy. *Autophagy* **8**: 690–691
- Zhang J, Loyd MR, Randall MS, Waddell MB, Kriwacki RW & Ney PA (2012b) A short linear motif in BNIP3L (NIX) mediates mitochondrial clearance in reticulocytes. *Autophagy* **8**: 1325–1332
- Zhang J, Tripathi DN, Jing J, Alexander A, Kim J, Powell RT, Dere R, Tait-Mulder J, Lee J-H, Paull TT, Pandita RK, Charaka VK, Pandita TK, Kastan MB & Walker CL (2015) ATM functions at the peroxisome to induce pexophagy in response to ROS. *Nat. Cell Biol.* **17**: 1259–1269
- Zhang SL, Yeromin AV, Zhang XH-F, Yu Y, Safrina O, Penna A, Roos J, Stauderman KA & Cahalan MD (2006) Genome-wide RNAi screen of Ca²⁺ influx identifies genes that regulate Ca²⁺ release-activated Ca²⁺ channel activity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**: 9357–9362
- Zhang Y, Goldman S, Baerga R, Zhao Y, Komatsu M & Jin S (2009) Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**: 19860–19865
- Zhao J, Liu T, Jin S, Wang X, Qu M, Uhlén P, Tomilin N, Shupliakov O, Lendahl U & Nistér M (2011) Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J.* **30**: 2762–2778
- Zhao YG, Chen Y, Miao G, Zhao H, Qu W, Li D, Wang Z, Liu N, Li L, Chen S, Liu P, Feng D & Zhang H (2017) The ER-Localized Transmembrane Protein EPG-3/VMP1 Regulates SERCA Activity to Control ER-Isolation Membrane Contacts for Autophagosome Formation. *Molecular Cell* **67**: 974–989.e6
- Zheng S, Clabough EBD, Sarkar S, Futter M, Rubinsztein DC & Zeitlin SO (2010) Deletion of the huntingtin polyglutamine stretch enhances neuronal autophagy and longevity in mice. *PLoS Genet.* **6**: e1000838
- Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T & Brumell JH (2009) The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J. Immunol.* **183**: 5909–5916
- Zhou Y, Lee J, Reno CM, Sun C, Park SW, Chung J, Lee J, Fisher SJ, White MF, Biddinger SB & Ozcan U (2011) Regulation of glucose homeostasis through a XBP-1-FoxO1 interaction. *Nat. Med.* **17**: 356–365
- Zurek N, Sparks L & Voeltz G (2011) Reticulon short hairpin transmembrane domains are used to shape ER tubules. *Traffic* **12**: 28–41
- van Zutphen T, Todde V, de Boer R, Kreim M, Hofbauer HF, Wolinski H, Veenhuis M, van der Klei IJ & Kohlwein SD (2014) Lipid droplet autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell* **25**: 290–301

Titre : Caractérisation des réticulons chez *Caenorhabditis elegans* : spécificités tissulaires, rôle dans l'organisation du réticulum endoplasmique et lien avec l'autophagie

Mots clés : Réticulum endoplasmique, Réticulon, Autophagie, *Caenorhabditis elegans*

Résumé : L'autophagie est un processus de dégradation bien conservé chez les eucaryotes. Ce processus de recyclage peut être très sélectif. L'homéostasie du réticulum endoplasmique (ER) est nécessaire au maintien de ses différentes fonctions biologiques. Le RE est un réseau contigu de feuillettes et de tubules interconnectés formant des domaines distincts répartis de l'enveloppe nucléaire à la membrane plasmique, comprenant le RE périmoléculaire et périphérique. Plusieurs protéines jouent un rôle important dans la formation et l'organisation du réseau de RE, notamment les protéines de la famille des réticulons telle que RTN4/Nogo-A, qui génèrent et maintiennent la structure du tubule. Dans les cellules de mammifère, dans des conditions de stress, les différents domaines du RE sont dégradés par une autophagie sélective (RE-phagie), médiée par des récepteurs réticulon spécifiques tels que FAM134B ou RTN3L. La présence de plusieurs isoformes exprimées par les gènes réticulons peut suggérer un modèle d'expression spatio-temporel spécifique en fonction des besoins de différents types de cellules.

Mon travail de thèse a consisté à caractériser le locus du seul gène de réticulon chez *C. elegans*, *ret-1*, et j'ai montré la spécificité d'expression des trois catégories d'isoformes. Les isoformes longues et intermédiaires sont exprimées dans les cellules musculaires et les neurones respectivement, tandis que les isoformes courtes de RET-1 sont ubiquitaires et sont les seules isoformes présentes dans les premiers stades embryonnaires. La déplétion de RET-1 conduit à une structure anormale du RE. J'ai montré que des isoformes courtes sont nécessaires à la mise en place du réseau tubulaire du RE mais ne sont pas impliquées dans la biogenèse des autophagosomes dans les embryons. Mes résultats indiquent que la distribution des autophagosomes dans les cellules des embryons n'est pas aléatoire et étroitement associée au réseau de RE. L'ensemble de mes résultats, associés au fait que seules les isoformes longues de RTN3 interviennent dans la RE-phagie, suggèrent que des isoformes spécifiques de RET-1 pourraient médier des processus de RE-phagie uniquement dans certains tissus.

Title : Characterization of reticulons in *Caenorhabditis elegans* : tissue specificities, role in the shaping of endoplasmic reticulum, and link with autophagy

Keywords : Endoplasmic reticulum, Reticulon, Autophagy, *Caenorhabditis elegans*

Abstract : Autophagy is a degradative process well conserved among eukaryotes. This recycling process can be very selective. Homeostasis of endoplasmic reticulum (ER) ensures the correct biological activity of its distinct domains. The ER is a contiguous network of interconnected sheets and tubules forming distinct domains that spread from nuclear envelope to the cell cortex including perinuclear and peripheral ER. Several proteins play an important role in shaping and organizing the endoplasmic reticulum network, including a reticulon family proteins as RTN4/Nogo-A that generate and maintain tubule structure. In mammalian cell, in stress conditions, the different domains of ER are degraded by a selective autophagy (ER-phagy), mediated by specific reticulon receptors as FAM134B or RTN3L. The presence of multiple isoforms of reticulon may suggest a specific spatio-temporal expression pattern depending on the needs of different cell types.

My thesis work consisted in the characterization of the locus of the only reticulon gene in *C. elegans*, *ret-1* and showed the specificity of expression of the three categories of isoforms. The long and intermediate isoforms are expressed in muscle cells and neurons respectively, while the short RET-1 isoforms are ubiquitous and the only isoforms expressed in early embryos. The RET-1 depletion results in abnormal ER shape. I showed that short isoforms are necessary for the establishment of the tubular ER network but are not involved in the biogenesis of autophagosomes in embryos. My results highlight that the distribution of autophagosomes in the cell of the embryos is not random and closely associated with the ER network. All my results, added to the fact that only long isoforms of RTN3 are involved in ER-phagy, suggest that specific RET-1 isoforms could mediate ER-phagy processes only in some tissues.

