



HAL
open science

Etude du rôle de l'autophagie et des protéines ATG8 dans l'apprêtement et la présentation de l'antigène OVALBUMINE par les protéines de classe II du Complexe majeur d'histocompatibilité

Leïla Fonderflick

► **To cite this version:**

Leïla Fonderflick. Etude du rôle de l'autophagie et des protéines ATG8 dans l'apprêtement et la présentation de l'antigène OVALBUMINE par les protéines de classe II du Complexe majeur d'histocompatibilité. Biologie cellulaire. Université Bourgogne Franche-Comté, 2020. Français. NNT : 2020UBFCE016 . tel-03356790

HAL Id: tel-03356790

<https://theses.hal.science/tel-03356790v1>

Submitted on 28 Sep 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.



Inserm

Institut national
de la santé et de la recherche médicale

**THESE DE DOCTORAT DE L'ETABLISSEMENT UNIVERSITE BOURGOGNE
FRANCHE-COMTE**

**PREPAREE A UFR Sciences de la santé, UFR sciences et techniques, UMR
1098 INSERM**

Ecole doctorale n°554

Environnements - Santé

Doctorat de Biologie cellulaire et moléculaire, Biochimie

Par

Mme Fonderflick Leïla

**Etude du rôle de l'autophagie et des protéines ATG8 dans l'apprêtement
et la présentation de l'antigène OVALBUMINE par les protéines de classe II du
Complexe majeur d'histocompatibilité**

Thèse présentée et soutenue à Besançon, le 17 décembre 2020,

Composition du Jury :

Mr, Delva, Laurent
Mme, Donzeau, Mariel
Mr, Morel, Etienne
Mme, Lucile, Mollet
Mr, Delva, Laurent
Mr, Delage-Mourroux, Régis
Mme, Adami, Pascale

Fonction et établissement d'exercice
Fonction et établissement d'exercice

Président
Rapporteuse
Rapporteur
Examinatrice
Examineur
Directeur de thèse
Codirecteur de thèse

Remerciements

C'est avec une émotion particulière que j'écris aujourd'hui ces remerciements qui marquent officiellement la fin de cette aventure qu'a été ma thèse. Cette thèse n'est pas seulement le résultat d'un long travail, mais d'un ensemble de personnes qui m'ont soutenue à différents moments et jusqu'à la fin de l'écriture de ce manuscrit. Je tiens donc à tous vous remercier pour votre bienveillance.

Je voudrais d'abord remercier les Docteurs : Mariel DONZEAU, Etienne MOREL, Lucile MOLLET et Laurent DELVA d'avoir accepté de juger ce travail de thèse. Je voudrais également remercier le Pr. Philippe SAAS de m'avoir accueilli dans son unité de recherche et le Pr. Olivier ADOTEVI le directeur de notre équipe « TIMC » pour tous ses conseils précieux et son aide sur les expériences murines. A mes directeurs de thèse le Dr. Pascale ADAMI et le Pr. Régis DELAGE-MOURROUX, merci de m'avoir encadré tout au long de cette thèse et lors de mon stage de M2. Merci pour votre soutien, vos conseils et votre bienveillance tout au long de ce travail, ainsi que l'aide à la rédaction. J'ai beaucoup appris et grandi et c'est en partie grâce à vous.

Je remercie également tous les membres du groupe « AETIC », anciennement EA 3922, pour votre aide et vos conseils. Avant de travailler dans ce laboratoire vous avez été mes professeurs à l'université des sciences et techniques de Besançon, je tiens donc aussi à vous remercier chaleureusement pour tout ce que vous avez pu m'apprendre et me transmettre. A tous les membres de l'UMR 1098 et collègues avec qui j'ai pu manipuler, apprendre ou échanger, notamment Laurie, Laura, Elodie LMJ, Francis, Sabeha et Patricia.

Je voudrais également remercier les stagiaires de Master 2 qui sont maintenant thésards, Céline, Elodie et Timothée, bonne chance pour cette nouvelle aventure : « POULOULO !!! ». Je voudrais également remercier Camille le futur Docteur, et Marine la Docteure depuis quelques mois maintenant, mes deux camarades de bureau avec qui j'ai partagé beaucoup de choses durant cette thèse. Merci, pour tout. Je vous souhaite le meilleur. Merci Sindy, ancienne thésarde et ATER avec moi, pour tout ton soutien, ton aide et ces fous rires pendant toute cette thèse, une belle amitié est née entre nous. Je n'oublie pas les anciennes thésardes du laboratoire : Aurore et Laura. Merci pour votre écoute, vos conseils et tout ce que vous m'avez appris. J'ai également pu faire de belles rencontres en organisant le Forum des Jeunes Chercheurs avec d'autres doctorants : Omy, Quentin, Jérôme, Marie, Paulo et Thibault, merci pour tous ces moments.

Merci à mes amis du Lycée Elise et Baptiste, merci à mes amies de la Fac avec qui j'ai passé de très bons moments, surtout avec vous les filles : Elsa, Julia, Anaïs, Alexia, Juliette et Céline. Tout a commencé un matin avec la fameuse traversée du Tibet.

Un grand merci à toute ma famille, en particulier à mes parents, mon frère Youness et ma sœur Alyssa, mes grands-parents, mes tantes et oncles, mes cousines et cousins pour leurs soutiens pendant toutes mes études. Vous avez toujours cru en moi. Je ne vous remercierai jamais assez.

Enfin de tout mon cœur je te remercie Romain pour tout le soutien et les conseils que tu m'as apportés pendant cette thèse et ta patience pendant la période de rédaction. Merci pour tous les moments de détente que nous avons partagés. Tu as toujours été là pour moi. Je remercie également tes parents pour leur gentillesse.

Sommaire

<i>Remerciements</i>	3
<i>Sommaire</i>	7
<i>Table des figures</i>	15
<i>Acronymes et abréviations</i>	19
Introduction	25
1. L'autophagie	27
1.1. Définition générale : qu'est-ce que l'autophagie ?.....	27
1.2. Les différents types d'autophagie	29
1.2.1. La microautophagie	29
1.2.2. L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes	32
1.2.3. La macroautophagie	33
1.3. Les mécanismes moléculaires de la macroautophagie	34
1.3.1. Phase d'induction/Initiation de l'autophagie	34
1.3.1.1. Le complexe ULK1	36
1.3.1.2. Le complexe Phosphatidylinositol 3-phosphate kinase de classe III (PI3KC3)	38
1.3.2. Nucléation du phagophore	40
1.3.1. Phase d'élongation du phagophore.....	42
1.3.1.1. Le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1.....	42
1.3.1.2. Le système de conjugaison ATG8	44
1.3.1.3. La protéine transmembranaire ATG9 et la régulation de la phase d'élongation du phagophore.....	46
1.3.2. Fermeture et maturation de l'autophagosome	50
1.3.2.1. Fermeture de l'autophagosome	50
1.3.2.2. Maturation de l'autophagosome	53
1.3.3. Transport des autophagosomes	54
1.3.3.1. Transport des autophagosomes vers la périphérie nucléaire.....	54
1.3.3.2. Transport des autophagosomes vers la périphérie	55
1.3.4. Fusion autophagosome-lysosome	56
1.3.5. Dégradation du contenu de l'autolysosome	61
1.4. Autophagie sélective.....	62

1.4.1.	Généralités.....	62
1.4.2.	Mécanisme de l'autophagie sélective	63
1.4.3.	La mitophagie.....	64
1.4.3.1.	La mitophagie dépendante de la voie PINK1/Parkin.....	64
1.4.3.2.	La mitophagie indépendante de PINK1/Parkin : les récepteurs spécifiques	67
1.4.4.	L'agrégophagie.....	68
1.4.5.	La xénophagie	69
2.	Rôle de l'autophagie dans le cancer.....	70
2.1.	Rôle antitumoral de l'autophagie.....	70
2.1.1.	Rôle antitumoral des protéines de l'autophagie.....	70
2.1.2.	Maintien de l'intégrité du génome et prévention des stress	72
2.1.3.	Inhibition de l'inflammation et de la nécrose	74
2.1.4.	Induction de la sénescence par un oncogène.....	75
2.1.5.	Induction de la mort cellulaire par autophagie.....	75
2.1.6.	L'autophagie dans l'immunité antitumorale	76
2.2.	Rôle pro-tumoral de l'autophagie	77
2.2.1.	Hypoxie et carence nutritive	77
2.2.2.	Autophagie et maintien des propriétés des cellules souches cancéreuses 78	
2.2.3.	L'autophagie favorise les métastases	79
2.2.4.	Autophagie et facteur de résistance aux traitements dans les tumeurs	80
2.3.	Rôle des protéines ATG8 dans le cancer	80
3.	Rôle de l'autophagie dans la présentation antigénique	82
3.1.	La présentation classique d'antigènes par les molécules du CMH de classe I et II	83
3.1.1.	Présentation d'antigènes par les molécules du CMH de classe I.....	83
3.1.2.	Présentation d'antigènes par les molécules du CMH de classe II	86
3.2.	Autophagie et présentation d'antigènes.....	88
3.2.1.	Autophagie et présentation d'antigènes par les molécules du CMH de classe II	88
3.2.1.1.	Autophagie et présentation d'antigènes endogènes par les molécules du CMH-II	88
3.2.1.2.	Autophagie et présentation d'antigènes exogènes par les molécules du CMH-II	90

3.2.2.	Autophagie et présentation d'antigènes par les molécules du CMH de classe I	93
3.2.2.1.	Autophagie et expression des molécules du CMH de classe I	93
3.2.2.2.	Autophagie et présentation d'antigènes endogènes par les molécules du CMH-I	94
3.2.2.3.	Autophagie et présentation croisée d'antigènes par les molécules du CMH-I : Rôle dans les cellules dendritiques	95
3.2.2.4.	Autophagie et présentation croisée d'antigènes par les molécules du CMH-I : Rôle dans les cellules donneuses d'antigènes	96
3.2.3.	Autophagie et présentation d'antigènes de tumeurs	97
3.2.3.1.	Autophagie et présentation des antigènes tumoraux par les molécules du CMH-II	98
3.2.3.2.	Autophagie et présentation croisée : Rôle dans les cellules tumorales comme cellules donneuses d'antigènes	98
3.3.	Autophagie et présentation d'antigènes pour améliorer les immunothérapies	101
3.3.1.	Fractions de vésicules enrichies en autophagosomes (DRibbles)	101
3.3.2.	Utilisation de vaccin à base d'ADN	104
4.	Cadre et but de la thèse	106
	Matériels et méthodes	109
1.	Culture cellulaire	111
1.1.	Les lignées cellulaires utilisées	111
1.1.1.	Modèle de surexpression stable des protéines OVA et OVA-ATG8	111
1.1.2.	Modèle de surexpression transitoire des protéines OVA, OVA-Myc-ATG8 et OVA242-Myc-ATG8	111
1.2.	Modèle cellulaire d'invalidation de GABARAPL1	111
1.3.	Culture primaire de cellules dendritiques	112
2.	Transfections :	112
2.1.	Transfection des cellules B16-F10 par le kit JetPrime™	113
2.2.	Transfection des bmDC par la méthode JetPEI™-Macrophage (Polyplus®)	113
2.3.	Electroporation des bmDC (Amaxa Nucleofector™ kit)	113
3.	Analyse des protéines	114
3.1.	Extraction des protéines	114

3.2. Western blotting.....	114
4. Etude des cellules par microscopie confocale.....	115
4.1. Immunofluorescence.....	115
4.2. Transfection transitoire de protéines fluorescentes.....	116
5. Clonage.....	116
5.1. Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction.....	116
5.2. Extraction des ADN plasmidiques.....	116
5.3. Ligature.....	117
5.4. Transformation des bactéries compétentes.....	117
6. Etude des phénotypes cancéreux.....	118
6.1. Test de prolifération cellulaire in vitro : test XTT.....	118
6.2. Croissances tumorales in vivo dans des souris et extractions des lymphocytes infiltrant les tumeurs.....	118
7. Souches murines.....	119
8. Cytométrie en flux.....	119
8.1. Etude de la prolifération des lymphocytes T CD4 ⁺ OT-II et CD8 ⁺ OT-I : marquage au CFSE.....	119
8.2. Etude de l'activation des lymphocytes T CD4 ⁺ et CD8 ⁺	120
8.3. Etude de la fonctionnalité des lymphocytes infiltrant les tumeurs.....	120
Résultats.....	121
1. Etude de l'adressage de l'antigène OVA fusionné aux différentes protéines ATG8 dans les autophagosomes pour favoriser la présentation de l'antigène OVA par les molécules du CMH-II.....	123
1.1. Publication I.....	127
1.2. Résultats complémentaires.....	168
2. Etude de l'impact de l'invalidation de GABARAPL1 dans les cellules B16-OVA : sur la présentation de l'antigène OVA par les molécules du CMH-I et II et dans la croissance tumorale dans des souris immunocompétentes.....	183
3. Etude du rôle de la protéine autophagique ATG9A dans le cancer du sein	203
Discussion Générale.....	223
1.1. Cellules dendritiques et irradiation.....	227
1.2. Immunothérapie basée sur les cellules dendritiques.....	229
1.2.1. Préparation des cellules dendritiques pour la vaccination.....	230

1.2.2. Choix de l'antigène de tumeurs et approche de l'adressage de l'antigène dans les DC pour augmenter l'immunisation	231
1.2.3. Les différentes techniques permettant la présentation de peptides dérivés de l'antigène dans les cellules dendritiques	232
1.2.3.1. Les cellules dendritiques chargées avec des peptides.....	232
1.2.3.2. Les cellules dendritiques préparées avec de l'ADN	233
1.2.3.3. Les cellules dendritiques incubées avec du lysat tumoral, des cellules tumorales entières ou des DRibbles.....	235
Annexes.....	237
Revue :	239
Liste des communications orales	262
Liste des communications affichées.....	263
POSTER 1 :	264
POSTER 2 :	266
POSTER 3 :	268
POSTER 4 :	270
POSTER 5 :	272
Bibliographie.....	275

Table des figures

Figure 1 : Représentation schématique des 3 types d'autophagies.	30
Figure 2 : Différentes étapes de la macroautophagie.	35
Figure 3 : Régulation du complexe ULK1 par les senseurs énergétiques mTOR et AMPK.	37
Figure 4 : Régulation du complexe PI3KC3-C1 par le senseur énergétique AMPK et le complexe ULK1.....	39
Figure 5 : Les étapes moléculaires de l'initiation de l'autophagie et rôle des protéines WIPI pour l'élongation.....	41
Figure 6 : les systèmes de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L et ATG8.....	43
Figure 7 : Alignement des protéines des familles GABARAP et LC3 chez l'Homme et d'Atg8 chez la levure.....	44
Figure 8 : Proposition de modèle pour la localisation d'ATG9A et la formation des autophagosomes.	48
Figure 9 : Différence entre une scission et une fusion membranaire.	51
Figure 10 : Mécanisme possible de fermeture du phagophore pour donner un autophagosome.	52
Figure 11 : Transport des autophagosomes matures.....	56
Figure 12 : Fusion de l'autophagosome avec les endosomes tardifs/lysosomes et formation de l'autolysosome.....	58
Figure 13 : Schéma récapitulatif des différents cargos à dégrader de l'autophagie sélective. ...	62
Figure 14 : Mécanisme de l'autophagie sélective.....	64
Figure 15 : Mitophagie dépendante de l'ubiquitine, la voie PINK1/Parkin.	66
Figure 16 : Mitophagie médiée par des récepteurs indépendants de l'ubiquitine.....	67
Figure 17 : Mécanisme de l'agrégation.....	68
Figure 18 : Rôle de l'autophagie dans le cancer et relation avec l'inflammation et l'immunité.	77
Figure 19 : Représentation schématique de la voie classique de présentation par les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I.....	85
Figure 20 : Représentation schématique de la voie classique de présentation par le CMH de classe II.	87
Figure 21 : contribution schématique de l'autophagie dans l'apprêtement d'antigènes de tumeurs exogènes.	92
Figure 22 : La surexpression des antigènes OVA-Myc-ATG8 ou 242OVA-Myc-ATG8 dans les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (DC) n'active pas la prolifération des lymphocytes T CD4 ⁺ (OT-II) mais active la prolifération des lymphocytes T CD8 ⁺ (OT-I).....	169
Figure 23 : La transfection des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse par le kit JetPEI-Macrophage entraîne leur maturation.	171

Figure 24 : Les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (DC) peuvent être électroporées.....	172
Figure 25 : Le pourcentage et l'expression des protéines de costimulation ont été recherchés par cytométrie en flux sur les cellules dendritiques (DC) différenciées <i>in vitro</i> pendant 9 jours.	174
Figure 26 : La surexpression des antigènes OVA ou OVA-Myc-ATG8 dans les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (DC) permet l'activation de la prolifération des lymphocytes T CD8 ⁺ (OT-I).	175
Figure 27 : La surexpression des antigènes OVA, OVA-Myc-ATG8 dans les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (DC) active la prolifération des lymphocytes T CD4 ⁺ (OT-II).....	177
Figure 28 : Le pourcentage et l'expression des protéines de costimulation ont été recherchés par cytométrie en flux sur les cellules dendritiques (DC) différenciées <i>in vitro</i> pendant 6 jours.	178
Figure 29 : La surexpression des antigènes OVA, OVA-Myc-ATG8 dans les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (DC) active la prolifération des lymphocytes T CD4 ⁺ (OT-II).....	179
Figure 30 : La surexpression des antigènes OVA, OVA-Myc-ATG8 dans les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (DC) active la prolifération des lymphocytes T CD8 ⁺ (OT-I)..	181
Figure 31 : L'expression de GABARAPL1 a été invalidée dans les lignées de mélanome murin B16-OVA surexprimant l'antigène OVALBUMINE (B16-OVA).....	187
Figure 32 : Le flux autophagique basal ou induit est diminué dans les 3 clones invalidés pour <i>Gabarapl1</i>	189
Figure 33 : Les cellules B16-OVA, B16-OVA Ctrl et B16-OVA GABARAPL1 ^{-/-} (GL1 ^{-/-}) C4 and C10 prolifèrent de la même façon <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> dans des souris SCID immunodéficientes..	191
Figure 34 : La croissance tumorale des cellules B16-OVA GABARAPL1 ^{-/-} clones C4 et C10 est plus élevée dans les souris C57BL/6N que dans les cellules B16-OVA Ctrl.....	194
Figure 35 : Les lymphocytes T CD4 ⁺ et CD8 ⁺ infiltrants les tumeurs (TILs) ne présentent pas de différence de fonctionnalité entre ceux extraits des tumeurs B16-OVA Ctrl et ceux extraits des tumeurs B16-OVA GABARAPL1 ^{-/-}	196
Figure 36 : Les MDSC et les MDSC granulocytaires (Gr-MDSC) infiltrant les tumeurs ne diffèrent pas entre les groupes de tumeurs exprimant ou n'exprimant pas GABARAPL1.....	198
Figure 37 : Le pourcentage et l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) ne montrent pas de de différence d'expression des molécules du CMH-I, du CMH-II et du marqueur PD-L1 entre les différentes tumeurs B16-OVA.	199
Figure 38 : Les cellules B16-OVA Ctrl et B16-OVA GABARAPL1 ^{-/-} (GL1- C2, C4 et C10) activent de la même façon la prolifération des LT CD8 ⁺ OT-I et leur sécrétion d'IFN- γ	202

Acronymes et abréviations

3-MA	3-Méthyladénine	EDTA	acide éthylène diamine tétraacétique
ADN	acide désoxyribonucléique	EGF	epithelial growth factor
AIM	ATG8-interacting motif	ERAD	ER-associated degradation
AMBRA1	Activating molecule in BECN1-regulated autophagy protein 1	ERGIC	endoplasmic reticulum/Golgi intermediate compartment
AMP	adénosine monophosphate	ERK	extracellular signal-regulated kinase
AMPK	adénosine monophosphate associated protein kinase	ESCRT	endosomal sorting complexe required for transport
ARN	acide ribonucléique	FIP200	focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa
ATG	autophagy related	FUNDC1	FUN14-domain containing protein 1
ATP	adénosine triphosphate	FYCO	FYVE and coiled-coil domain-containing protein
B16-F10	<i>Mus musculus</i> melanoma cell lines	GABA_A	γ -aminobutyric acid type A
Baf-A1	Bafylomycine-A1	GABARAP	GABA _A receptor-associated protein
Bcl-2	B cell lymphomas 2	GABARAPL1	GABARAP like 1
BNIP3	Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3	GABARAPL2	GABARAP like 2
BRCA1	breast cancer 1	GATE16	Golgi associated ATPase enhancer of 16 kDa
BSA	bovin serum albumin	GEC1	glandular epithelial cells 1
CaMKKβ	calcium/calmodulin kinase kinase- β	GFP	green fluorescent protein
Cas9	caspase 9	GIM	GABARAP interaction motif
CD	cluster of differentiation	HCC	Hépatocarcinome cellulaire
CMA	chaperonne-mediated autophagy	HCQ	hydroxychloroquine
CMH	complexe majeur d'histocompatibilité	HDAC	histone deacetylase
CQ	chloroquine	HEK	Human epithelial kidney
CTL	lymphocyte T cytotoxique	HGF	hepatocyte growth factor
CXCL-12	C-X-C Motif Chemokine Ligand 12	HIF-1a	hypoxia-inducible factor 1
DAMP	damage-associated molecular pattern	HLA	human leucocyte antigen
DC	Dendritic cells, cellules dendritiques	HOPS	homotypic fusion and protein sorting
DFCP1	double FYVE-containing protein 1	HSC-70	heat shock cognate 70
DMSO	diméthyl sulfoxyde	IFN-γ	interféron gamma
dNTP	désoxyribonucléoside triphosphate	IL	interleukine
DRiP	Defective ribosomal product		
EBSS	Earl's balanced salt		

JIP1	JNK-interacting protein group 1	PBS	phosphate buffered saline
JNK	jun n-terminal kinase	PCR	polymerase chain reaction
LAMP-2A	lysosomal-associated membrane protein 2A	PE/PS	phosphatidyléthanolamine / phosphatidylsérine
LAP	LC3-associated phagocytosis	PERK	PKR-like eIF2 kinase
LC3	light chain 3	PFA	paraformaldéhyde
LIR	LC3 interaction motif	pH	potentiel d'hydrogène
LMC	leucémie myéloïde chronique	PI3K	phosphatidylinositol 3 kinase
LPS	lipolysaccharide	PI3KC3	phosphatidylinositol 3 kinase de classe III
LT	lymphocyte T	PI3KC3-C1	phosphatidylinositol 3 kinase de classe III complexe 1
MAPK	mitogen-activated protein kinase	PI3P	phosphatidylinositol-3 phosphate
MCF-7	michigan cancer foundation-7		phosphatidylinositol 4-kinase II α
MDA-MB436	M.D Anderson-metastatic breast436	PI4KIIα	PTEN-induced putative kinase 1
MEF	murin embryonic fibroblast	PINK1	
MIIC	MHC-II compartment, compartiment contenant des molécules de CMH-II	PKA/B	protein kinase A/B
mLST8	mammalian lethal with SEC13 protein 8	PLEKHM1	pleckstrin homology domain containing protein family member 1
mTOR	mechanistic target of rapamycin	PRAS40	prolin-rich AKT substrate 40 kDa
mTORC1	mechanistic target of rapamycin complex 1	PRR	pattern recognition receptor
MTT	3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5diphényltétrazolium	RabGAP	Rab GTPase-activating protein
NBR1	neighbour of BRCA1	Rag	regulator protein
NDP52	nuclear dot protein of 52 kDa	RAPTOR	regulatory-associated protein of Mtor. Protéine de régulation associé à mTOR
NF-κB	nuclear factor kappa B	RE	réticulum endoplasmique
NIX	nip-like protein X	Rheb	ras homolog enriched in brain
NK	natural killer	RILP	RAB7-interacting lysosomal protein
NLS	nuclear localization-like sequence	ROS	Espèces réactives de l'oxygène, reactive oxygen species
ORP1L	oxysterolbinding protein-related protein 1L	RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
OVA	ovalbumine	RUBICON	RUN domain beclin-1 interacting and cysteine-rich containing protein
PAMP	pathogen associated molecular pattern	SDS	sodium dodécylsulfate
Parkin	parkinsonian protein		
pb	paires de bases		

siRNA	small interfering RNA, petits ARN interférant	TNFα	tumor necrosis factor alpha
SIRT1	sirtuine	TNFR	Récepteur au TNF α
SLiP	short-lived protein, protéine à courte durée de vie	TSC1	tuberous sclerosis complex 1
SNARE	N-ethymmalmeimide-sensitive factors (NSF) attachment protein	TSC2	tuberous sclerosis complex 2
SQSTM1	sequestosome 1/p62	ULK1	Unc-54-like Kinase 1
STX17	syntaxin 17	UPS	Ubiquitin/proteasome system
SVF	Sérum de veau fœtal	UVRAG	ultraviolet irradiation resistance associated gene
TAP	transporter associated with antigen processing	VAMP8	vesicle associated membrane protein 8
TBC1D5	Tre-2/Bub2/Cdc16 domain-containing RabGAP	VEGF	vascular endothelium growth factor
TBCD	Tre-2/Bub2/Cdc16 domain-containing RabGAP	VPS	vacuolar protein sorting
TBS	tris buffered saline	VPS34	vacuolar protein sorting 34
TCR	T cell receptor	WIPI2	WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein 2
TGFβ	transforming growth factor beta	WT	wild-type
TGN	trans-Golgi network	XTT	2,3-bis(2methoxy-4nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide
TILs	tumor infiltrating lymphocytes		
TLR	toll like receptor		

Introduction

1. L'autophagie

1.1. Définition générale : qu'est-ce que l'autophagie ?

Le mot autophagie vient du grec « αὐτός = auto » et « φαγεῖν = phago » signifiant « se manger soi-même » et correspond à un processus catabolique d'autodigestion cellulaire. Au cours de ce processus, très conservé chez les cellules eucaryotes, une vésicule se forme en englobant une partie du contenu cytoplasmique qui est dégradée par le lysosome (compartiment acide de la cellule). Initialement décrit simplement comme un processus permettant la dégradation de protéines mal repliées, à longue durée de vie, d'organites endommagés, mais encore de pathogènes, ce mécanisme est plus complexe. En effet, il permet de donner une réponse adaptative qui pourra fournir de l'énergie à la suite de différents types de stress. De plus, nous savons maintenant qu'il ne s'agit pas d'un simple processus de dégradation aléatoire de substrats mais le phénomène peut être sélectif et faire intervenir des mécanismes spécifiques permettant la dégradation sélective de chargements (cargos) à éliminer. L'autophagie étant impliquée dans la dégradation des protéines mal repliées et l'homéostasie mitochondriale, une perturbation de l'autophagie peut conduire à des maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer (Nixon *et al*, 2005), la maladie de Parkinson (Ryan *et al*, 2015; Zhang *et al*, 2018) ou la maladie de Huntington. L'autophagie joue également un rôle dans le cancer et dans les réponses immunitaires (Fahmy *et al*, 2019)

Ce mécanisme fut observé pour la première fois vers la fin des années 1950. Plusieurs événements majeurs ont permis d'aboutir à la découverte de l'autophagie. Tout commence en **1955**, lorsque le belge Christian de Duve décrit pour la première fois le lysosome (et le peroxyosome) lors de recherches par sérendipité sur la phosphatase acide et le fractionnement subcellulaire (de Duve *et al*, 1955). En **1957**, Clark *et al.*, observèrent des cellules rénales en différenciation chez des jeunes souris par microscopie électronique et mirent en évidence des vésicules denses qui seront plus tard reconnues comme des vésicules autophagiques (Clark, 1957). Deux ans plus tard en **1959**, Novikoff et son équipe découvrirent dans des cellules rénales de rat par microscopie électronique la présence de mitochondries dégénérées dans des compartiments vacuolaires exprimant positivement la phosphatase acide décrits par de Duve comme des lysosomes (Novikoff, 1959). Plus tard en **1962**, Ashford et Porter observèrent par microscopie dans des cellules hépatiques perfusées par du glucagon, des organites cytoplasmiques comme les mitochondries dans les lysosomes (Ashford & Porter, 1962). Au cours de cette même année, Novikoff et Essner confirmèrent cette étude dans les cellules hépatiques de souris en montrant la présence d'enzymes lysosomiales au sein de ces compartiments contenant les mitochondries (Novikoff & Essner, 1962). Ils nommèrent ces

structures « cytolysomes ». L'année suivante, de Duve utilisa le terme « autophagie » pour décrire ce processus de dégradation des constituants cytoplasmiques par les lysosomes/vacuoles, et « vacuole autophagique » pour les vésicules remplaçant le terme « cytolysome ». Ce fut lors d'un symposium sur les lysosomes organisé par la fondation Ciba à Londres que ce terme « autophagie » a été proposé par le cytologiste de Duve (Symposium on Lysosomes *et al*, 1963). En **1964**, lors d'expériences menées sur des cellules hépatiques de rat, Novikoff, découvrit que l'activité autophagique était plus élevée chez les animaux privés de nutriments. En **1965**, l'existence des lysosomes est complètement confirmée en même temps que la découverte par de Duve du peroxysome (de Duve, 2005). En 1976, le processus autophagique fut également observé par microscopie électronique dans des cellules humaines HeLa privées d'acides aminés ou de sérum, faisant de ces cellules un bon modèle d'étude cellulaire possible pour l'autophagie (Mitchener *et al*, 1976). En **1977**, Mortimore et Schworer mirent en évidence qu'une déprivation en acides aminés induit l'autophagie sur du foie de rat perfusé par un milieu appauvri en acides aminés. L'induction de l'autophagie augmente la protéolyse dans les cellules hépatiques transfusées diminuant le taux total de protéines hépatiques expliquant la protéolyse observée en période post-absorptive (Mortimore & Schworer, 1977). En 1979, ces mêmes auteurs découvrirent que le glucagon induit l'autophagie et la protéolyse dans le foie de rat aboutissant à une production d'acides aminés (Schworer & Mortimore, 1979). Jusqu'à la fin des années 90, les études sur l'autophagie concernaient uniquement des analyses faites en microscopie électronique montrant des autophagosomes et leur fusion avec des lysosomes. Il fallut attendre 1992 pour que les premiers acteurs moléculaires de ce mécanisme soient découverts chez la levure.

En **1992**, les travaux de l'équipe du Pr. Ohsumi, effectués sur des levures *Saccharomyces cerevisiae* carencées en nutriments ont permis de mettre en évidence l'autophagie chez la levure en utilisant des levures déficientes pour les protéinases A et B par observation au microscope électronique de la protéolyse des vacuoles. Ils observèrent ainsi des vésicules autophagiques qu'ils nommèrent « autophagic bodies ». Ces vésicules autophagiques étaient capables d'enchâsser des portions de réticulum endoplasmique (RE) rugueux, des mitochondries et des ribosomes cytoplasmiques (Takeshige *et al*, 1992). Dès lors que l'autophagie avait été montrée dans le modèle de levure, l'utilisation de celle-ci pour des études moléculaires devenait alors possible.

Ainsi, entre **1993** et **1994**, grâce à des observations en microscopie électronique, plusieurs mutants ont pu être isolés chez la levure par criblage génétique permettant la découverte de 15 gènes impliqués dans le processus autophagique (Thumm *et al*, 1994; Tsukada & Ohsumi, 1993). Ainsi, la découverte des gènes autophagiques, d'abord appelés *APG*

pour autophagie chez la levure, a permis la découverte du mécanisme moléculaire de l'autophagie chez les mammifères et d'autres organismes comme les plantes. En effet, la plupart des gènes de l'autophagie sont conservés chez les mammifères et chez l'Homme. Une révision de la nomenclature concernant l'appellation des gènes de l'autophagie a fait évoluer l'appellation *APG* en *ATG* pour autophagy related (Klionsky *et al*, 2003). En **1998**, le système de conjugaison ATG12 est découvert par Mizushima, suivi en **2000** par la découverte du deuxième système de conjugaison ATG8 impliqué dans l'une des étapes clés de formation de ces vésicules par Ichimura ; tous deux appartenaient à l'équipe du Pr Ohsumi (Ichimura *et al*, 2000; Mizushima *et al*, 1998). Ces deux systèmes de conjugaison sont importants pour la formation et l'élongation de la vésicule autophagique qui permettra de séquestrer le contenu cytoplasmique à dégrader. Ces travaux sur l'autophagie ont ainsi été récompensés en 2016 par un prix Nobel de médecine décerné au Pr. Yoshinori Ohsumi pour ses travaux sur la découverte des mécanismes de l'autophagie chez la levure.

1.2. Les différents types d'autophagie

Il existe 3 types d'autophagie appelé microautophagie, autophagie dépendante des protéines chaperonnes et macroautophagie qui seront décrites ci-dessous.

1.2.1. La microautophagie

La microautophagie est un processus autophagique qui permet la dégradation de portions du cytoplasme de manière spécifique ou non *via* un englobement direct par le compartiment lytique comme le lysosome ou l'endosome chez les mammifères ou la vacuole chez la levure et les plantes (Figure 1 A). Une classification récente proposée par Oku et Sakai, permet de classer la microautophagie en 3 types en suivant la déformation de la membrane du lysosome et de l'endosome (Oku and Sakai, 2018).

Le premier type de microautophagie se définit par un mécanisme de protrusion du lysosome faisant intervenir entre autres la protéine ATG5 (chez la plante) et Atg18 (chez la levure *Pichia pastoris*) (Oku & Sakai, 2018).

Le deuxième type de microautophagie se caractérise par une invagination lysosomale (vacuolaire chez la levure) et a été largement décrit chez *Saccharomyces cerevisiae*. La membrane vacuolaire impliquée dans cette invagination a la particularité de posséder un faible niveau de protéines transmembranaires pour former un tube de 200 à 300 nm. Il fait intervenir

plusieurs protéines Atg chez *Saccharomyces cerevisiae* pour garantir un apport suffisant en membranes nécessaire à l'invagination de la vacuole.

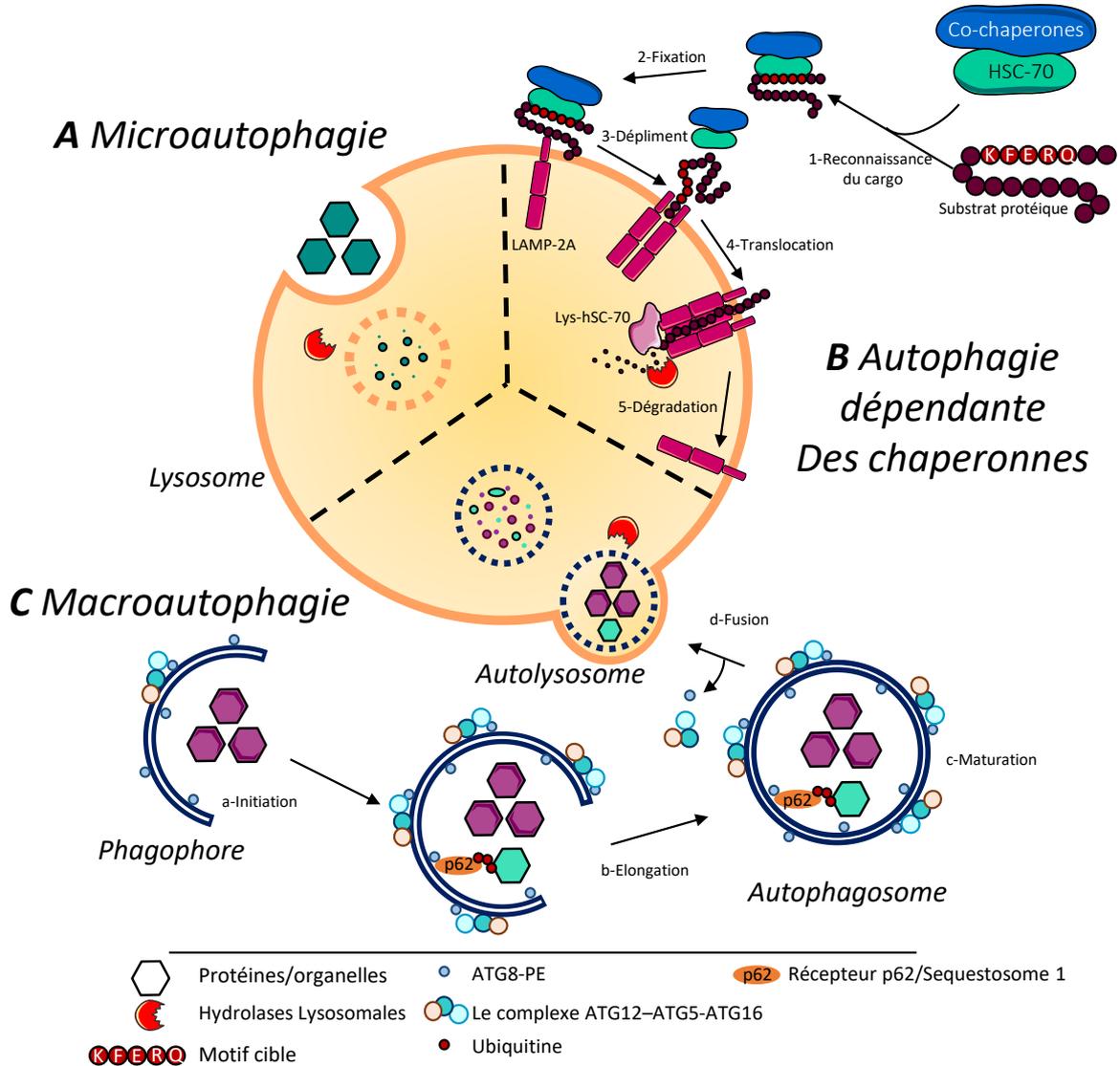


Figure 1 : Représentation schématique des 3 types d'autophagies. D'après Fonderflick et al, (2020). **(A)** La microautophagie se caractérise par une invagination de la membrane du lysosome entraînant la dégradation des protéines cytosoliques de façon aléatoire par les enzymes lysosomales. **(B)** L'autophagie médiée par les chaperonnes se caractérise par une dégradation sélective de protéines cytosoliques possédant le motif de KFERQ-like de reconnaissance. Ces protéines sont reconnues par la protéine chaperonne HSC-70 associée à ses co-chaperonnes (1). Ce cargo protéique s'associe ensuite à la protéine membranaire lysosomale LAMP2 (2-3) permettant la translocation de la protéine substrat dans le lysosome (4). La protéine avec le motif KFERQ est dégradée par les hydrolases lysosomales (5). **(C)** Le dernier type d'autophagie est la macroautophagie. Ce type d'autophagie se caractérise par la séquestration du contenu cytoplasmique dans une vésicule autophagique appelée autophagosome pour sa dégradation. La première étape est appelée initiation (a). Au cours de cette étape, une structure à double membrane appelée phagophore s'allonge progressivement (b) jusqu'à se fermer pour former une vésicule à double membrane appelée autophagosome (maturation-fermeture -c). Au cours de cette étape d'élongation et de maturation, les protéines de la famille ATG8 sont conjuguées à une phosphatidyléthanolamine (PE) par le complexe ATG12-ATG5-ATG16 permettant de former les protéines ATG8-II capables de s'ancrer à la membrane autophagique. L'autophagosome fusionne ensuite avec un lysosome pour former un autolysosome (d). Le contenu vésiculaire est dégradé par les hydrolases lysosomales. Le cargo protéique peut être dégradé aléatoirement ou de façon sélective en faisant intervenir des protéines réceptrices comme p62 pour les protéines ubiquitinylées. P62 s'associe à la fois au cargo à dégrader et aux protéines liées à un lipide ATG8/LC3B-II.

De plus, le complexe protéique ESCRT (*endosomal sorting complexes required for transport*) intervient également de façon indirecte et directe. Tout d'abord, il intervient indirectement dans ce mécanisme pour permettre la capture des gouttelettes lipidiques produites par induction de l'autophagie en réponse à une privation en nutriments chez la levure. D'autre part, il intervient directement pour la dégradation des protéines de la membrane vacuolaire chez la même espèce (Oku & Sakai, 2018). Ce processus chez la levure permet la dégradation de substrats protéiques soit de façon non sélective – avec la dégradation de portions du cytoplasme, mais également des organelles – soit de façon sélective. Ce processus sélectif est impliqué par exemple dans la dégradation de mitochondries (micromitophagie) ou de portions nucléaires (micronucléophagie ou PMN (piecemeal microautophagy of the nucleus)) (Farré *et al*, 2009; Kissová *et al*, 2007). La micromitophagie se définit par la dégradation sélective de mitochondries et est observée chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* lorsque l'autophagie est induite par une privation en azote. En effet, des études menées par microscopie électronique chez cette levure ont montré que les mitochondries étaient englouties par la vacuole de manière dépendante de la protéine Uth1p. Ainsi, dans les levures mutantes *Auth1p*, la dégradation sélective des mitochondries n'est plus mise en évidence. Par ailleurs, en parallèle de ce processus sélectif de dégradation, des mitochondries sont dégradées de façon non sélective en même temps que l'engloutissement de portions du cytoplasme par la vacuole de façon Uth1p-indépendante (Kissová *et al*, 2007).

Toujours, chez *Saccharomyces cerevisiae*, la micronucléophagie se caractérise par la dégradation sélective et le recyclage de portions non-essentiels du noyau lorsque l'autophagie est induite par privation en azote ou en carbone. Elle se réalise grâce à la jonction protéique entre la vacuole et le noyau assurée par la protéine vacuolaire Vac8 et la protéine nucléaire Nvj1 présente sur la partie externe de la membrane nucléaire (Roberts *et al*, 2003). Lors de l'induction de l'autophagie activée par une carence en nutriments ou par un traitement à la rapamycine, une portion nucléaire s'invagine au niveau de cette jonction pour former une vésicule à l'intérieur de la vacuole qui sera dégradée par les hydrolases locales (Kvam & Goldfarb, 2007). Une carence en nutriments entraîne le recrutement et la séquestration par la protéine Nvj1 de deux protéines impliquées dans le métabolisme des lipides : *i*) la protéine Tsc13, une enoyl-CoA réductase, qui est nécessaire à la biogénèse des vésicules pour la PMN (Kvam *et al*, 2005) et *ii*) la protéine Osh1, homologue chez les mammifères de l'OSP (oxyesterol-binding protein) (Kvam & Goldfarb, 2004) qui régule négativement le trafic des lipides non vésiculaires (Kvam & Goldfarb, 2007, 2004). Les protéines codées par les gènes *ATG* (*ATG1* à *ATG18*) interviennent également lors de la nucléomicroautophagie (Krick *et al*, 2008).

Le dernier type de microautophagie a pu être mis en évidence dans des lignées murines de cellules dendritiques (DC) ainsi que chez *Drosophila Melanogaster* (Mukherjee *et al*, 2016; Oku & Sakai, 2018; Sahu *et al*, 2011). Aussi appelée microautophagie endosomale, il s'agit d'une invagination de la membrane endosomale qui permet la dégradation de protéines cytosoliques. Elle fait intervenir le complexe protéique ESCRT. Ce complexe permet de former des vésicules par invagination dans la lumière de l'endosome tardif connues sous le nom de corps multi-vésiculaires. Ce mécanisme fait également intervenir des acteurs moléculaires de l'autophagie tels que les récepteurs autophagiques : Nbr1 (neighbour of BRCA1), mais aussi la protéine HSC-70 (heat shock cognate of 70 kDa) (Oku & Sakai, 2018). Ces récepteurs protéiques sont des protéines adaptatrices qui servent de lien entre l'endosome et le substrat protéique à dégrader, appelé cargo. La microautophagie endosomale peut ainsi permettre la dégradation sélective de protéines cytosoliques. Dans ce cas, il y a reconnaissance d'un motif protéique KFERQ-like sur la protéine à dégrader par HSC-70 comme dans l'autophagie dépendante des chaperonnes qui sera décrite par la suite. HSC-70 se lie à la membrane de l'endosome tardif par une interaction électrostatique impliquant une phosphatidylsérine présente sur la membrane de l'endosome (Mukherjee *et al*, 2016; Sahu *et al*, 2011). La microautophagie semble donc partager des acteurs communs avec l'autophagie médiée par les chaperonnes et la macroautophagie.

1.2.2. L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes

Contrairement à la microautophagie, l'autophagie dépendante des protéines chaperonnes (ou CMA : chaperone-mediated autophagy) implique une dégradation sélective des composés intracellulaires directement par le lysosome. Elle est responsable de la dégradation de 30 % des protéines cytosoliques dans des conditions pour lesquelles la privation en nutriments est prolongée dans le temps. Les substrats protéiques solubles possèdent un motif KFERQ-like permettant leur reconnaissance et leur adressage à la membrane lysosomale en direction de la lumière du lysosome pour une dégradation (Figure 1B) (Dice, 2007). Cette séquence penta-peptidique peut varier entre les protéines mais on retrouve les combinaisons d'acides aminés avec des charges positives [arginine (R) or lysine (K)], 1 seul acide aminé négatif [glutamate (E) ou aspartate (D)], et des acides aminés hydrophobes [isoleucine (I), phénylalanine (F), leucine (L) ou valine (V)] et un résidu glutamyl (Q) à l'une des extrémité N- ou C-terminale (Dice, 1990; Jackson & Hewitt, 2016). La protéine qui contient le motif peptidique est tout d'abord reconnue par la protéine chaperonne cytosolique HSC-70 (Chiang *et al*, 1989) associée à plusieurs protéines co-chaperonnes incluant HIP, HOP, HSP 40, HSP 90 et BAG-1 (Dice, 2007). Le complexe protéique est alors acheminé vers la membrane du lysosome où il s'associe à la partie cytosolique de la protéine membranaire

lysosomale de type I LAMP-2A (Lysosomal associated membrane protein type 2A) et les protéines cibles sont ensuite dépliées/dénaturées pour pouvoir être transloquées dans la lumière du lysosome (Cuervo & Dice, 1996). Finalement, les protéines transloquées sont prises en charge dans le lumen du lysosome par la protéine chaperonne lysosomale lys-HSC-70 et sont dégradées par les hydrolases lysosomales (Agarraberes *et al*, 1997).

1.2.3. La macroautophagie

La macroautophagie est un processus catabolique de dégradation des protéines à longue durée de vie et des organelles (Figure 1C). Il est hautement conservé des mammifères jusqu'aux levures (Yang & Klionsky, 2009). Ce processus multi-étapes débute par une étape d'initiation (Figure 2 étape 1) suivie de l'étape de nucléation avec la formation d'une structure à double membrane appelée phagophore (Figure 2 étape 2). Ce dernier s'allonge progressivement lors de l'étape d'élongation pour former une vésicule autophagique close à double membrane appelée autophagosome qui enchâsse une partie du cytoplasme cellulaire (Figure 2, étape 3). La maturation de cet autophagosome (Figure 2 étape 4) permet sa fusion avec le lysosome formant un autolysosome. La dernière étape permet alors la dégradation des produits séquestrés par les hydrolases lysosomales formant des molécules qui seront recyclées pour fournir de l'énergie à la cellule (Figure 2, étape 5). Les molécules produites sont exportées dans le cytoplasme par des perméases du lysosome. L'autophagosome peut aussi fusionner avec les endosomes pour former un amphisome qui pourra ensuite fusionner avec un lysosome.

Dans ce manuscrit, la macroautophagie sera particulièrement développée car ce mécanisme a été majoritairement étudié dans ces travaux de thèse.

La macroautophagie est un processus dynamique au cours duquel les autophagosomes sont produits puis dégradés après leur fusion avec les lysosomes. Ce phénomène dynamique est appelé flux autophagique. Ainsi le nombre d'autophagosomes dans une cellule à un instant donné ne reflète pas directement le flux autophagique. Une augmentation importante du nombre d'autophagosomes reflète, soit une augmentation de la formation, soit une diminution de la dégradation des autophagosomes par le lysosome. Afin d'étudier le flux autophagique, différents inhibiteurs de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome peuvent être utilisés comme la Bafylomycine-A1, la chloroquine ou le chlorure d'ammonium (NH₄Cl).

1.3. Les mécanismes moléculaires de la macroautophagie

D'un point de vue moléculaire, l'autophagie requiert l'intervention de plus d'une trentaine de protéines appelées ATG (Yang & Klionsky, 2010). Comme mentionné précédemment, ces protéines ont été initialement découvertes chez la levure mais de nombreux homologues ont également été décrits chez les mammifères. Au cours de ce processus, de nombreux complexes moléculaires vont intervenir chez les mammifères :

(1) le complexe **ULK1** (unc51-like autophagy activating kinase 1) intervenant lors de l'étape d'initiation ;

(2) le complexe **PI3KC3** (Phosphatidylinositol 3-phosphate kinase de classe III) contenant les protéines VPS34, VPS15 et BECLIN1 intervenant dans l'étape d'initiation ;

(3) le complexe PI3P lié au complexe **WIPI** ;

(4) la protéine transmembranaire **ATG9** intervenant dans l'étape de nucléation du phagophore et permettant l'induction de l'élongation du phagophore ;

(5) le premier système de conjugaison « ubiquitin-like » **ATG5-ATG12** ;

(6) le deuxième système de conjugaison « ubiquitin-like » **ATG8-PE**, tous deux intervenant dans les étapes d'initiation, d'élongation et de fermeture de l'autophagosome. Ces 6 complexes majeurs régulent différentes étapes de l'autophagie et seront ainsi décrits ci-dessous au cours des différentes étapes de l'autophagie.

1.3.1. Phase d'induction/Initiation de l'autophagie

L'autophagie joue un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Il existe ainsi un flux autophagique basal qui permet de maintenir cette homéostasie cellulaire en permettant la dégradation et le recyclage de protéines à longue durée de vie ou d'organites endommagés. Mais ce mécanisme peut être activé lorsque les cellules sont soumises à un stress comme un stress oxydant, une carence en nutriments ou un déficit en glucose. L'autophagie induite pourra permettre de fournir de l'énergie à la cellule et lui permettre ainsi de résister à ces différents stress cellulaires.

Chez les mammifères, en condition de stress cellulaire, deux senseurs énergétiques permettent de réguler l'induction de l'autophagie *via* l'activation de deux complexes de l'étape d'initiation à savoir ULK1 et PI3KC3. Il s'agit de la sérine/thréonine kinase mTOR (mechanistic target of rapamycin aussi connu sous le nom de mammalian Target of Rapamycin) et de la

protéine kinase AMPK (AMP-activated kinase), une sérine thréonine/kinase. Ainsi, une carence en acides aminés - particulièrement en leucine (Gao *et al*, 2002) - ou en différents facteurs comme l'IL-3 (Lum *et al*, 2005), l'insuline (Yoon, 2017), l'EGF/ β BFGF (epidermal growth factor/basic fibroblast growth factor) (Chen *et al*, 2013) ou encore un traitement à la rapamycine permettra d'induire l'autophagie *via* l'inhibition de mTOR présent au sein du complexe mTORC1. La kinase AMPK permettra d'activer l'autophagie soit à la suite d'une augmentation du rapport AMP/ATP dans la cellule, l'AMP se lie à l'AMPK et entraîne son activation allostérique (Hardie, 2007), soit suite à un déficit en glucose par phosphorylation direct de ULK1 (Kim *et al*, 2011; Egan *et al*, 2011), ou encore suite à un déficit en oxygène (hypoxie) qui entraîne la production de ROS (espèces réactives de l'oxygène) (Mungai *et al*, 2011). Dans ce dernier cas, le stress oxydant entraîne la relocalisation de la protéine sensible du niveau de Ca^{2+} STIM1 (stromal interaction molecule 1) du réticulum endoplasmique vers la membrane plasmique. La libération de calcium intracellulaire par les canaux à calcium entraîne l'activation de la kinase CaMKK β (calcium/calmodulin kinase kinase- β) qui phosphoryle l'AMPK (Mungai *et al*, 2011). L'activation de l'AMPK permet d'induire l'autophagie alors que l'activation de mTOR inhibe ce processus *via* le complexe ULK1 (Singh & Cuervo, 2011).

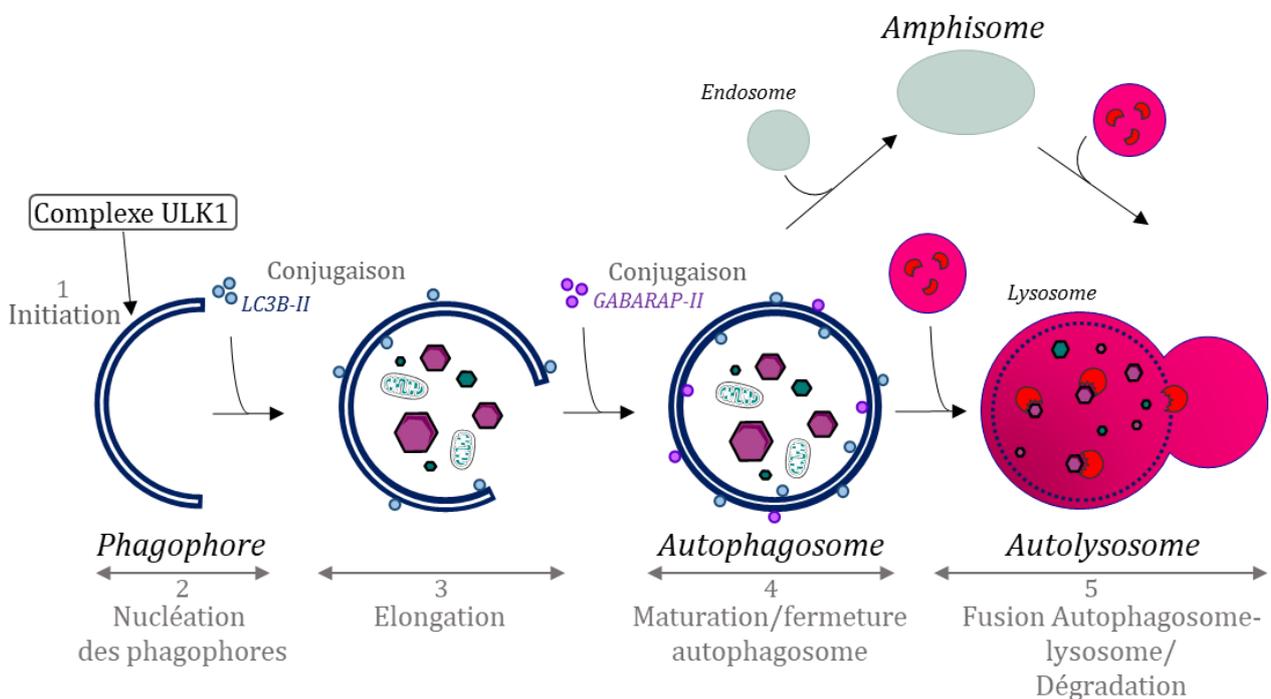


Figure 2 : Différentes étapes de la macroautophagie. L'autophagie est un processus en multi-étapes qui débute par l'initiation (1) et la nucléation (2) d'une structure à double membrane appelée phagophore. Ce dernier s'allonge pour englober une partie du contenu cytoplasmique pour former une vacuole autophagique à double membrane, aussi nommée autophagosome (3). L'autophagosome mature (4) fusionne ensuite avec un lysosome (5) pour permettre la dégradation et le recyclage du contenu vésiculaire et ainsi former un autolysosome.

1.3.1.1. Le complexe ULK1

Le complexe ULK1 est composé de la sérine/thréonine kinase ULK1, de FIP200 (focal adhesion kinase family intercatating protein of 200 kDa), de ATG13 et de ATG101. Cette dernière sous-unité est capable d'interagir indirectement avec ULK1 grâce à sa fixation à la protéine ATG13 et est essentielle à la macroautophagie (Yang & Klionsky, 2010). L'activité de ce complexe est régulée par les deux senseurs énergétiques : mTOR et AMPK.

La sérine/thréonine kinase mTOR agit au sein du complexe mTORC1 qui est composé de mTOR, de RAPTOR (regulatory associated protein of mTOR) et de mLST8 (mammalian lethal with sec13 protein 8). La sous-unité catalytique mTOR peut aussi s'associer à la protéine PRAS40 (prolin-rich AKT substrate 40 kDA) (Robert, 2013).

Dans des conditions riches en nutriments, le complexe mTORC1 est localisé au niveau de la membrane lysosomale et de l'endosome tardif sous sa forme active inhibant l'autophagie *via* une interaction avec Rheb (ras homolog enriched in brain) (Carroll *et al*, 2016). Dans cette configuration, mTORC1 est lié avec le complexe ULK1 par l'intermédiaire de RAPTOR (Hosokawa *et al*, 2009) (Figure 3). Sous la forme active de mTORC1, ULK1 est phosphorylée au niveau de la sérine S757 et ATG13 est phosphorylée au niveau de la sérine S258 (Puente *et al*, 2016), inhibant le complexe ULK1 (Ganley *et al*, 2009). De plus, dans des conditions riches en nutriments, l'AMPK est inhibée car le ratio AMP/ATP est faible.

En réponse à une carence en nutriments, l'activation de l'AMPK par l'AMP va provoquer l'inhibition du complexe mTORC1. En effet, l'AMPK phosphoryle, au sein du complexe, la sous-unité RAPTOR au niveau des sérines S722 et S792 (Figure 3) (Gwinn *et al*, 2008). De plus, AMPK phosphoryle aussi le suppresseur de tumeur TSC2 (tuberous sclerosis complex 2) provoquant l'inhibition de Rheb qui interagit avec mTORC1 (Figure 3) (Inoki *et al*, 2003b; Carroll *et al*, 2016, 2; Inoki *et al*, 2003a, 2). RAPTOR étant phosphorylée et Rheb inactivée, ULK1 se dissocie du complexe mTORC1. Ainsi, le complexe ULK1 n'est plus sujet à la phosphorylation inhibitrice de la sérine S757 (Hosokawa *et al*, 2009). Enfin, le complexe ULK1 est régulé par l'AMPK qui active la kinase ULK1 par phosphorylation notamment au niveau des sérines S317 et S777 (Kim *et al*, 2011), et les sérines S467 et S555, qui semblent également importantes pour le rôle de ULK1 dans l'autophagie (Egan *et al*, 2011) et ATG13 par phosphorylation au niveau de la sérine S224 (Puente *et al*, 2016). ULK1 s'autophosphoryle ensuite au niveau de la thréonine T180 (Lazarus *et al*, 2015). ULK1 ainsi activée phosphoryle ATG13 sur la sérine S318 (Joo *et al*, 2011) et FIP200 sur les sérines S943, S986, et S1323 (Egan *et al*, 2011) (Figure 3).

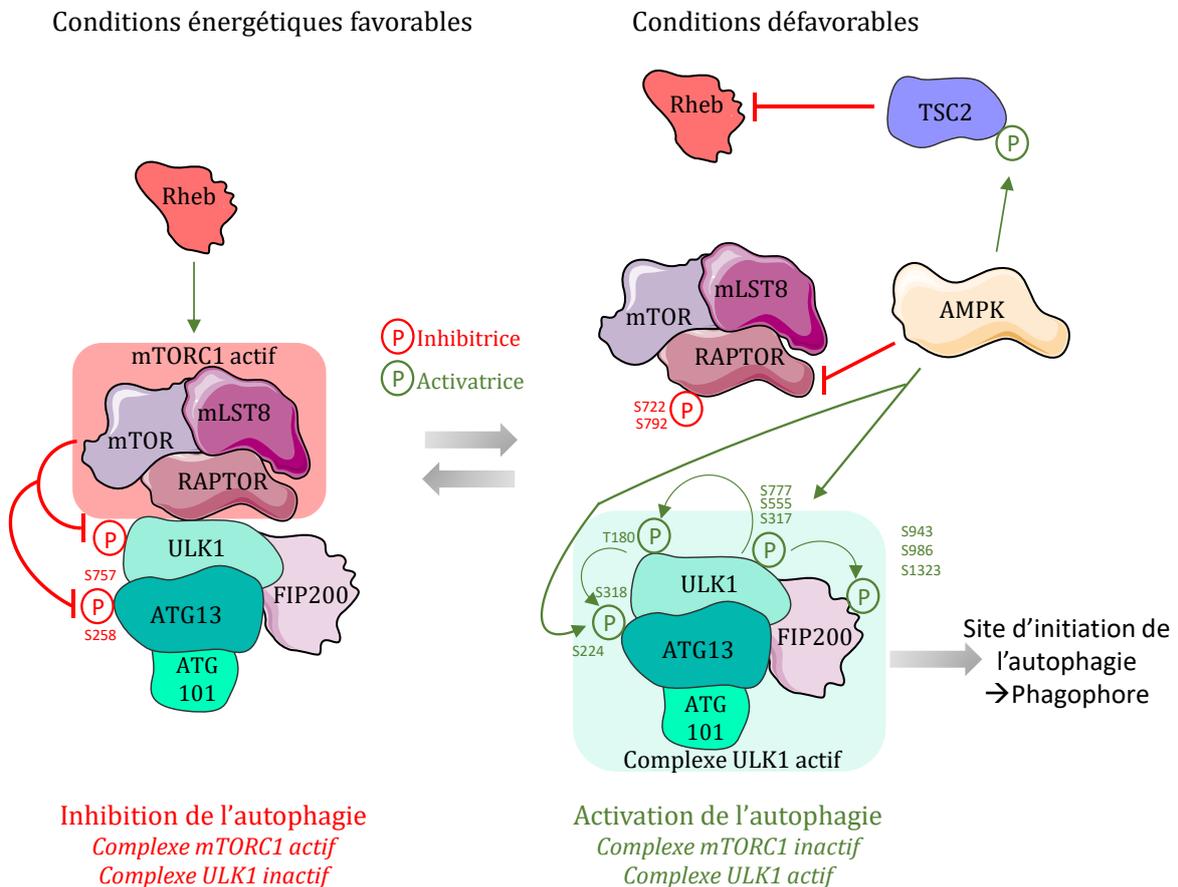


Figure 3 : Régulation du complexe ULK1 par les senseurs énergétiques mTOR et AMPK. Dans des conditions physiologiques normales, le complexe ULK1 est inhibé par la phosphorylation des protéines ULK1 et ATG13 sur les sérines S757 et S258 respectivement par le complexe mTORC1. Au contraire lors d'un déficit nutritionnel, l'AMPK lève l'inhibition du complexe mTORC1 en phosphorylant d'une part, la protéine RAPTOR sur les sérines S722 et S792 et d'autre part, par une phosphorylation activatrice de TSC2 qui inhibe la protéine Rheb provoquant sa libération du complexe mTORC1. L'AMPK phosphoryle ULK1 afin de stimuler son activité et phosphoryle directement ATG13 sur la sérine S224. ULK1 activée s'autophosphoryle sur la thréonine T180 et phosphoryle à son tour ATG13 sur la sérine S318. ULK1 activée s'autophosphoryle sur la thréonine T180 et phosphoryle à son tour ATG13 sur la sérine S318 et FIP200 sur les sérines S943, S986 et S1323. Le complexe ULK1 peut alors rejoindre le site d'initiation du phagophore.

1.3.1.2. Le complexe Phosphatidylinositol 3-phosphate kinase de classe III (PI3KC3)

L'activation du complexe PI3KC3 intervient ensuite lors de l'étape d'initiation de l'autophagie après l'activation du complexe ULK1. Il permet de produire du phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) à partir de phosphatidylinositol (Itakura *et al*, 2008). Il existe deux complexes PI3KC3, le complexe I (PI3KC3-C1) et le complexe II PI3KC3-C2 (Itakura *et al*, 2008). Ces deux complexes sont composés d'une lipide-kinase VPS34 (sous-unité catalytique), de la protéine kinase p150/VPS15 et de BECLIN1. Le complexe I PI3KC3-C1 contient en plus ATG14L (ATG14-like) qui se lie à BECLIN1 et qui est nécessaire à la localisation du complexe au niveau du réticulum endoplasmique, le site d'initiation du phagophore (Itakura *et al*, 2008; Matsunaga *et al*, 2010) (Figure 4). Le complexe II est constitué par la protéine UVRAG (UV radiation resistance associated gene), protéine qui est capable de se lier à BECLIN1 et qui intervient dans la maturation des endosomes et des autophagosomes (Itakura *et al*, 2008). Ainsi, malgré les similarités de composition protéique entre les deux complexes PI3KC3 de classe I et II, il n'en demeure pas moins que chacun joue un rôle différent dans l'autophagie. Au niveau du complexe PI3KC3-C1, la protéine BECLIN1 est essentielle à son activation (Kim *et al*, 2013; Russell *et al*, 2013), mais cette protéine a d'abord été identifiée comme interagissant avec la protéine anti-apoptotique Bcl2 (Xh *et al*, 1998). Des travaux plus récents ont montré que l'interaction entre ces deux protéines régule négativement l'autophagie (Patingre *et al*, 2005). BECLIN1 est également capable d'interagir avec AMBRA1 (activating molecule in BECLIN1-related autophagy 1). La protéine AMBRA1 interagit avec BECLIN1 par sa région centrale et BECLIN1 interagit avec AMBRA1 par un domaine situé à proximité de son domaine BH3. Ce domaine BH3 correspond au domaine d'interaction de BECLIN avec Bcl2 (Fimia *et al*, 2013). AMBRA1 régule positivement l'induction de l'autophagie par son interaction avec BECLIN1 (Sun, 2016; Fimia *et al*, 2007). En effet, lors d'une privation en nutriments l'interaction de AMBRA1 avec BECLIN1 stabilise l'interaction entre BECLIN1 et VPS34 et potentialiserait l'activité kinase de VPS34 (Fimia *et al*, 2007).

Plusieurs paramètres permettent l'activation du complexe PI3KC3-C1. L'activation du complexe ULK1 permet la phosphorylation de la protéine AMBRA1 au niveau de la sérine S14 en association avec BECLIN1 (Russell et al, 2013), permettant ainsi la localisation du complexe PI3KC3-C1 au niveau du site d'initiation de l'autophagie avec l'aide du complexe moteur de dynéines (Di Bartolomeo et al, 2010). De plus, ULK1 phosphoryle également BECLIN1 au niveau de la sérine S15 et de la sérine S30 lorsque celle-ci interagit avec ATG14L (Park et al, 2018; Russell et al, 2013). Aussi, BECLIN1 peut être phosphorylée par AMPK au niveau des sérine S91 et S94 (Kim et al, 2013) (Figure 4 et 5). L'ensemble de ces modifications post-traductionnelles favorise l'induction et la localisation du complexe PI3KC3 au niveau du site d'initiation du phagophore. Cette localisation entraîne la production de PI3P à la membrane du site d'initiation du phagophore par VPS34, permettant le déroulement de l'étape suivante de l'autophagie, la nucléation (Figure 5). En effet, la présence de PI3P au niveau de la membrane du phagophore permet la nucléation du phagophore et le recrutement des protéines WIPI 1/2 qui sont indispensables au recrutement des protéines ATG8/LC3-PE à la membrane du phagophore lors de l'étape d'élongation du phagophore que nous allons voir par la suite.

Conditions pauvres en nutriment



Conditions pauvres en nutriments

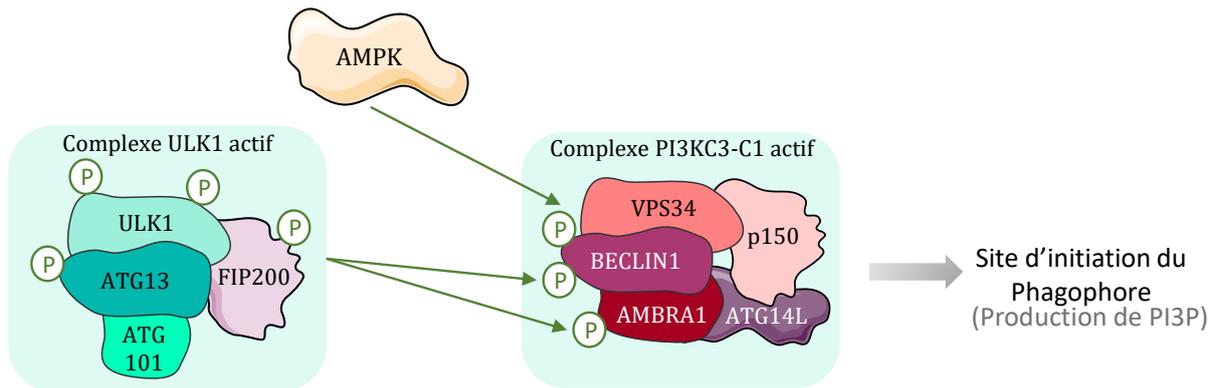


Figure 4 : Régulation du complexe PI3KC3-C1 par le senseur énergétique AMPK et le complexe ULK1. Dans des conditions énergétiques favorables, les complexes ULK1 et AMPK sont inactifs. BECLIN1 est majoritairement associée à Bcl2 plutôt qu'à VPS34. Dans des conditions énergétiques défavorables, BECLIN1 se dissocie de Bcl2 et les complexes ULK1 et AMPK sont actifs. La kinase AMPK et le complexe ULK1 actif phosphorylent BECLIN1. De plus, le complexe ULK1 actif phosphoryle également AMBRA1 au sein du complexe PI3KC3-C1. L'ensemble de ces phosphorylations entraîne l'activation du complexe PI3KC3-C1 qui se relocalise au niveau du site d'initiation du phagophore, le réticulum endoplasmique. Le complexe PI3KC3-C1 actif a une activité de kinase à lipide qui catalyse la production de phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) à la membrane du réticulum endoplasmique.

1.3.2. Nucléation du phagophore

Après leur activation, les complexes ULK1 et PI3KC3-C1 sont recrutés au niveau du site d'initiation du phagophore présent dans une région particulière du réticulum endoplasmique (Figure 5). Ainsi, le complexe PI3KC3-C1 activé permet une production localisée de PI3P grâce à l'activité kinase de VPS34. PI3P s'accumule au niveau de la membrane du RE permettant d'induire l'étape de nucléation (Figure 5). Cette phase de nucléation est importante pour initier la formation d'une structure membranaire riche en PI3P ayant la forme de la lettre grecque Oméga (Ω) et appelée omégasome (Figure 5). L'omégasome se détache ensuite pour former le phagophore et permettre son élongation (Carlsson & Simonsen, 2015; Hurley & Young, 2017). L'accumulation de PI3P au niveau de la membrane permet d'induire la nucléation du phagophore par le recrutement d'effecteurs capables de se lier au PI3P, telles que la protéine DFPC1 (double FYVE-containing protein 1) et les protéines WIPI (WD repeat domain phosphoiniside-interacting). La réunion de l'ensemble de ces acteurs constitue une plateforme protéique propice à l'élongation de la membrane du phagophore qui aboutit à la formation de l'autophagosome (Polson *et al*, 2010) (Figure 6). Parmi l'ensemble des protéines WIPI (WIPI 1 à 4) qui existent, WIPI 1 et 2 sont décrites comme participant à la nucléation, tandis que la protéine WIPI 4 semble intervenir dans la maturation des autophagosomes et le recrutement de ATG2 à la membrane de l'autophagosome (Lu *et al*, 2011). La protéine WIPI 1 se fixe au PI3P au niveau de la membrane. Cette fixation est nécessaire à la liaison de LC3 à une phosphatidyléthanolamine (PE) qui est importante pour l'étape d'élongation du phagophore (Mauthe *et al*, 2011). La protéine WIPI 2 joue également un rôle dans l'extension du phagophore par lipidation de LC3 *via* le recrutement de ATG16L du complexe ATG5-ATG12-ATG16L (Dooley *et al*, 2014; Müller & Proikas-Cezanne, 2015) (Figures 5 et 6). Effectivement, l'absence d'expression de WIPI 2 dans les cellules HEK293 a conduit à l'inhibition de la formation d'autophagosomes (Polson *et al*, 2010). Au contraire, l'absence d'expression de la protéine WIPI 4 dans les cellules NRK (normal rat kidney) entraîne une accumulation d'autophagosomes (Lu *et al*, 2011). Ainsi, la protéine WIPI 4 a un rôle différent de WIPI 1/2 dans l'autophagie. Les protéines WIPI 1/2 sont nécessaires en particulier lors de l'induction de l'autophagie par une carence en acides aminés (EBSS) (Mauthe *et al*, 2011).

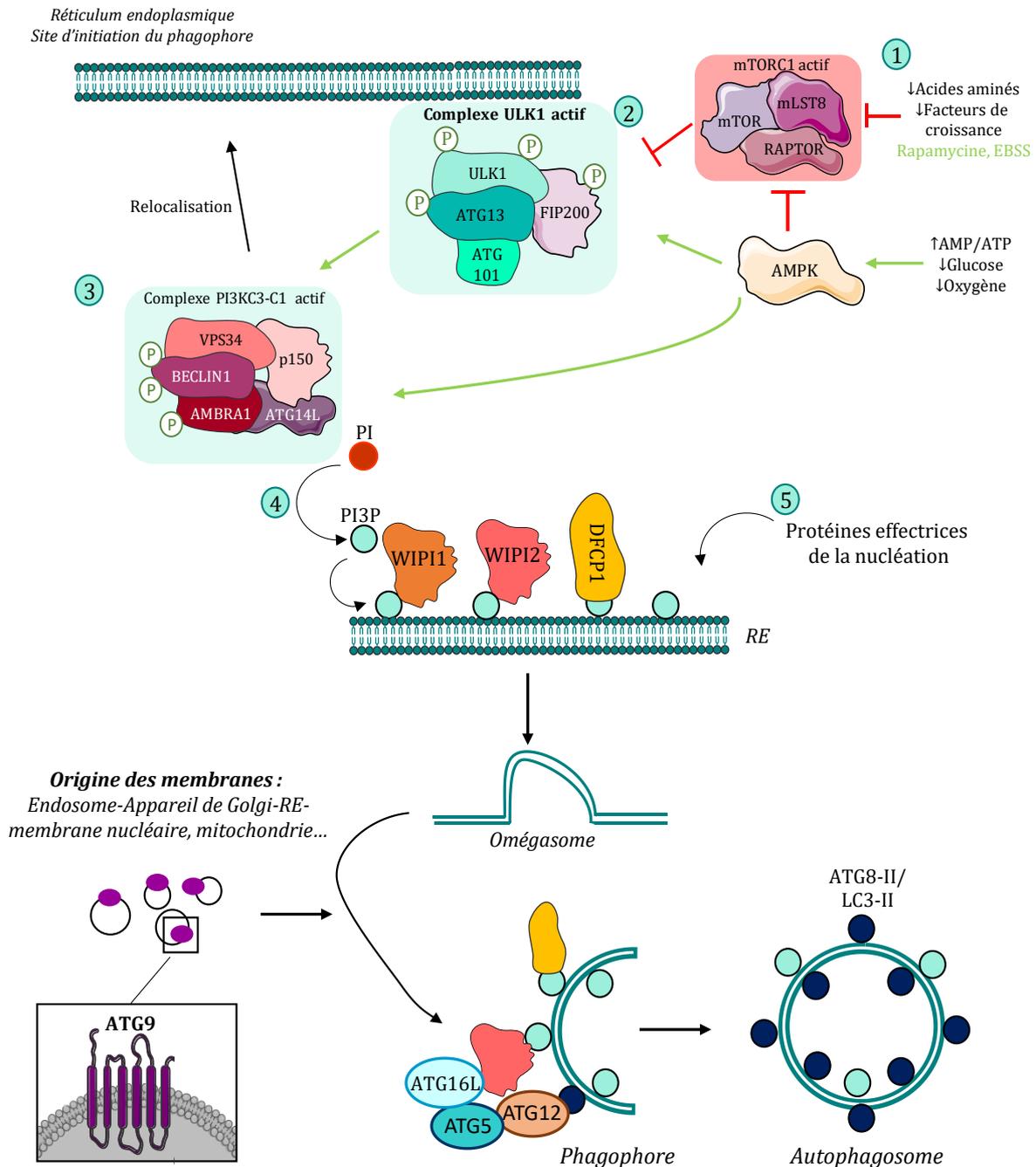


Figure 5 : Les étapes moléculaires de l'initiation de l'autophagie et rôle des protéines WIPI pour l'élongation. 1. Dans des conditions de carence en nutriments, le complexe mTORC1 est inactif et l'AMPK est activée ce qui contribue à l'activation du complexe ULK1. 2. Une fois que le complexe ULK1 est activé, il est recruté à la membrane du réticulum endoplasmique (RE). 3. Le complexe PI3KC3-C1 est ensuite activé et recruté lui aussi à la membrane du RE. 4. L'activation de ce complexe par phosphorylation permet l'activation de la kinase VPS34, la production de PI3P à partir de PI qui s'accumule au niveau de la membrane du RE. 5. La présence PI3P va initier la formation de l'oméga-some et le recrutement des acteurs protéiques de la nucléation tels que DFCP1, WIPI 1 et 2. 6. Après formation de l'oméga-some, il se détache du RE pour former une structure à double membrane appelée phagophore. La protéine WIPI 2 recrute ensuite ATG16L dans le complexe de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L qui permettra la lipodation de LC3 par la PE nécessaire à l'expansion du phagophore. Lors de cette étape, un deuxième complexe de conjugaison intervient, il s'agit du complexe ATG8/LC3-PE(II). Un apport de lipides est nécessaire au cours de cette phase. Les lipides proviendraient de membranes issues de différents compartiments cellulaires transportés via des vésicules lipidiques. Dans ces vésicules lipidiques, la protéine transmembranaire ATG9A est retrouvée et participe à cet apport de lipides dans le phagophore. Le phagophore s'allonge progressivement pour former un autophagosome qui fusionnera ensuite avec un lysosome pour former un autolysosome permettant de recycler le contenu de la vésicule autophagique. (D'après Müller and Proikas-Cezanne, 2015).

1.3.1. Phase d'élongation du phagophore

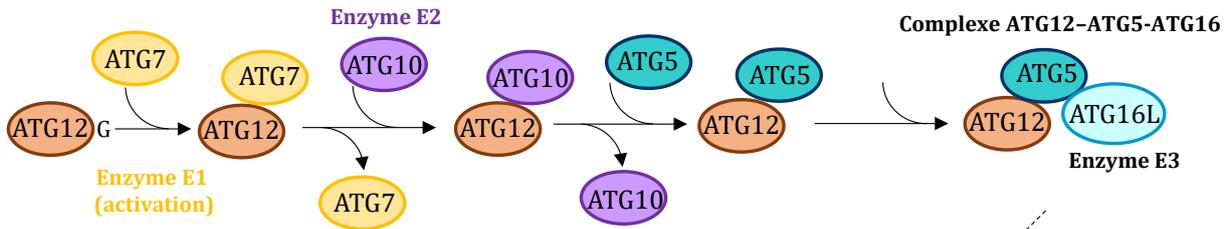
L'étape de nucléation est suivie de l'étape d'élongation. Cette dernière consiste en un allongement du phagophore, une structure à double membrane pour former une vésicule autophagique à double membrane, l'autophagosome. Elle fait intervenir plusieurs complexes protéiques dont le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1 et le système de conjugaison ATG8. Ces deux complexes vont permettre d'allonger la membrane du phagophore par l'apport de lipides *via* la protéine autophagique transmembranaire ATG9A (Figures 6 et 7). Ces systèmes de conjugaison sont semblables au système d'ubiquitylation et vont être décrits ci-dessous.

1.3.1.1. Le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L1

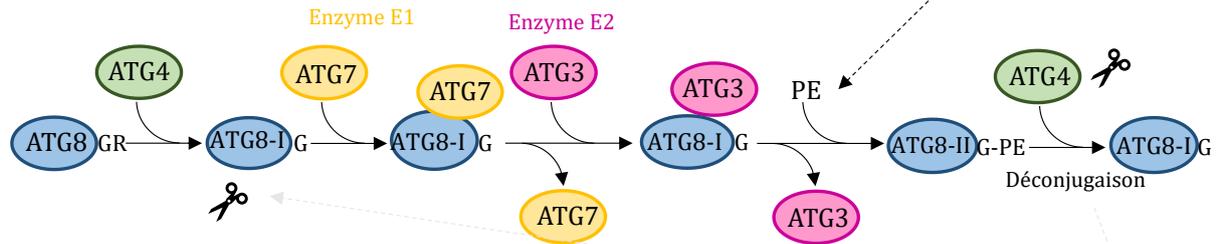
Le premier système de conjugaison est le système ATG12-ATG5-ATG16L1. Dans un premier temps, le groupement carboxylique de la glycine en C-terminale de la protéine ATG12 est activé par l'enzyme E1 ATG7 en consommant un ATP. L'activation aboutit à la formation d'une liaison thioester entre l'extrémité carboxyle de ATG12 et la cystéine de ATG7 présente au niveau de son site catalytique. Puis, ATG12 activée est transférée à l'enzyme E2 ATG10 au niveau d'une cystéine. ATG10 fixe ensuite ATG12 sur la protéine ATG5 sur une lysine. Le complexe covalent ATG12-ATG5 ainsi formé se fixe par la suite à la protéine ATG16L1 pour former le complexe trimérique ATG12-ATG5-ATG16L1 (Figure 6A). Ce dernier agit comme l'enzyme ligase E3 qui permet la conjugaison de la protéine ATG8 à un phospholipide (Nakatogawa, 2013).

Ce complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 se localise au niveau de la membrane de l'autophagosome (Figures 5 et 6C) (Fujita *et al*, 2008; Mizushima *et al*, 2003, 2001). Comme nous l'avons vu précédemment, la protéine ATG16L1 est capable d'interagir avec la protéine WIPI 2 de la plateforme de nucléation pour permettre la lipitation des protéines ATG8 (Dooley *et al*, 2014; Polson *et al*, 2010). Ce complexe est retrouvé majoritairement au niveau de la surface externe de cette membrane, où il restera accroché jusqu'à la fermeture de l'autophagosome (Figures 5 et 6C) (Mizushima *et al*, 2001).

A Le système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16



B Le système de conjugaison ATG8-II (ATG8-PE)



C

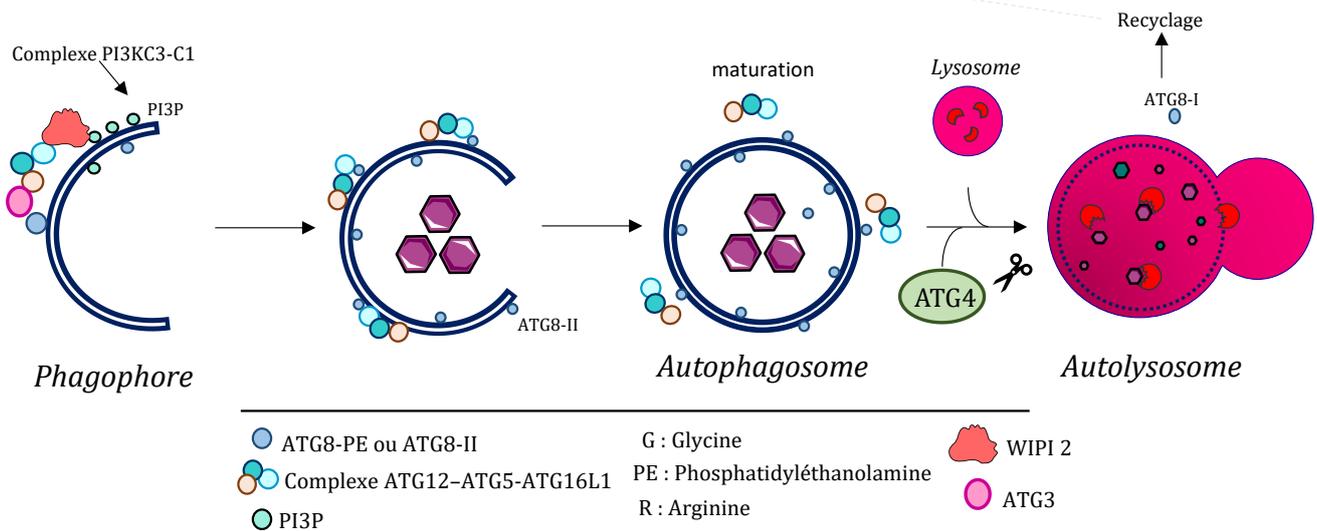


Figure 6 : les systèmes de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16L et ATG8. **A)** ATG12 présente un résidu glycyll en position C-terminale. Ce résidu lui permet d'être prise en charge et activée par ATG7 (enzyme E1), puis transférée à ATG10 (enzyme E2) pour être finalement conjuguée à ATG5 par liaison covalente. Ce complexe interagit ensuite avec ATG16L1 (ATG16L) formant ainsi le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 (enzyme E3). **B)** Le système de conjugaison par ATG8 fait intervenir plusieurs étapes. Les protéines ATG8 sont clivées en aval d'un résidu glycyll sur la partie C-terminale par ATG4. Cette forme cytosolique d'ATG8 est appelée ATG8-I. ATG8-I est alors activée par ATG7 (enzyme E1), puis transférée sur ATG3 (enzyme E2). Enfin, ATG8-I est conjuguée à un phospholipide, la phosphatidyléthanolamine (PE) par intervention du complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 (enzyme E3) et ainsi former ATG8-II liée aux autophagosomes. La liaison de ATG8-II aux autophagosomes via la PE est covalente et réversible. ATG4 peut aussi enlever la PE de l'ATG8. **C)** Le complexe ATG3-ATG8-I est recruté au niveau de l'autophagosome par le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1. ATG8-I se retrouve à proximité de la PE présente sur la membrane autophagique pour y être conjuguée donnant la forme ATG8-II liée aux autophagosomes. Le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 est stabilisé par la protéine WIPI 2 et probablement WIPI 1 recrutées à la membrane de l'autophagosome par le phosphatidylinositol 3-phosphate (PIP3) au moment de la nucléation du phagophore. C'est le complexe PI3KC3-C1 qui permet la production de PIP3. La double membrane du phagophore s'allonge ensuite progressivement grâce à l'apport de matériel lipidique. Ce matériel lipidique proviendrait de membranes issues de plusieurs compartiments cellulaires impliquant un mécanisme de transport de vésicules lipidiques via ATG9. A la fermeture de l'autophagosome, les complexes ATG12-ATG5-ATG16L1 se détachent de la membrane externe de l'autophagosome lors d'une phase nommée « la maturation des autophagosomes ».

1.3.1.2. Le système de conjugaison ATG8

Chez les mammifères, il existe plusieurs homologues de la protéine Atg8 de la levure qui forment la famille ATG8. La famille ATG8 est divisée en 2 sous-familles : la sous-famille MAP1LC3 (microtubule-associated protein 1Light chain 3) aussi appelée LC3, incluant les protéines LC3A, LC3B et LC3C et la sous-famille GABARAP (GABA_A receptor-associated protein) incluant les protéines GABARAP, GABARAPL1/GEC1 (GABARAP-like 1/glandular endothelial cells 1), GABARAPL2/GATE-16 (GABARAP-Like 2/Golgi-associated ATPase enhancer of 16 kDa) et le pseudogène *GABARAPL3P* (GABARAP-like 3, pseudogene) (Pellerin *et al*, 1993; Vernier-Magnin *et al*, 2001). Ces protéines interviennent dans plusieurs étapes de l'autophagie comme l'élongation du phagophore, la fusion de l'autophagosome avec le lysosome et lors de l'autophagie sélective. Leurs fonctions seront précisées dans les paragraphes suivants portant sur l'élongation, la fusion autophagosome-lysosome et sur l'autophagie sélective.

Les différentes protéines ATG8 partagent des similarités de séquences. Ainsi chez l'Homme, la protéine GABARAPL1 présente 87 % d'identité avec la protéine GABARAP et 61 % avec la protéine GABARAPL2. *GABARAPL3* étant un pseudogène, la protéine n'est pas exprimée, mais elle partagerait 96 % d'identité avec GABARAPL1. Cependant, la similarité est plus faible avec la sous-famille LC3. Ainsi, GABARAPL1 partage 30,8 % d'identité avec LC3A, 29 % avec LC3B et 35,8 % avec LC3C (Le Grand *et al*, 2011) (Figure 7).

GABARAPL1	MKFQYKEDHPPFEYRKKEGKIRKYPDRVPIVEK-APKARVPDLDRKYLVPSDLTVGQF-60
GABARAP	MKFFVYKEEHPFEKRRSEGEKIRKYPDRVPIVEK-APKARIGDLDDKKYLVPSDLTVGQF-60
GABARAPL2	MKWMFKEDHSLHRCVESAKIRAKYPDRVPIVEK-VSGSQIVDIDKRKYLVPSDITVAQF-60
LC3A	MKMRFFSSPCGKAAVDPADRCKEVQQIRDQHPSPKIPVIIERYKGEKQLPVLDTKFLVDPDHVNMSEL-66
LC3B	MPSEKTFKQRRTFEQRVEDVRLIREQHPTKIPVIIERYKGEKQLPVLDTKFLVDPDHVNMSEL-62
LC3C	MPPPQKIPSVRPFKQRKSLAIRQEEVAGIRAKFPNKIPVVVERYPRETFLPPLDTKFLVLPQELTMTQF-70
Atg8	MKSTFKSEYPFEKRRKAESERIADRFKNRIPVIC EK-AEKSDIPEIDKRKYLVPADLTVGQF-60
GABARAPL1	YFLIRKRIHLRPEDALFFFVN-NTIPPTSATMGQLYEDNHEEDYFLYVAYSDESVMYGLK-117
GABARAP	YFLIRKRIHLRAEDALFFFVN-NVIPPTSATMGQLYQEHHEEDFFLYIAYSDESVMYGL-117
GABARAPL2	MWIIIRKRIQLPSEKAIFFLVFD-KTVPQSSLTMGQLYEKEKDEDGFLYVAYSSENTFFGF-117
LC3A	VKIIRRRQLNPTQAFLLVNVQHSMVSVSTPIADIYEQEKDEDGFLYVMVYASQETFFGF-125
LC3B	IKIIRRRQLNANQAFLLVNVGHSMVSVSTPISEVYESEKDEDGFLYVMVYASQETFFGMKLSV-125
LC3C	LSIIRSRMVLRAFEAFYLLVNVNKSLVMSATMAEIRYRDKDEDGFVYMTYASQETFFGCLESAAPRDGSSLEDRPCNPL-147
Atg8	VYVIRKRIMLPPEKAIFFVFN-DTLPPTAALMSAIYQEHKDKDGFYVITYSENTFFGR-117

Figure 7 : Alignement des protéines des familles GABARAP et LC3 chez l'Homme et d'Atg8 chez la levure. Tiré de Le Grand *et al*, (2011). Les séquences en acides aminés ont été obtenues à partir de NCBI ou de GeneBank pour les protéines GABARAPL1 (NP_113600), GABARAP (CAG47031), GABARAPL2 (NP_009216), LC3A (NP_852610), LC3B (NP_03729), LC3C (NP_001004343) et Atg8 (NP_009475). Les protéines ont été alignées en utilisant « NCBI BLAST Tool ». Les acides aminés qui diffèrent de ceux de GABARAPL1 apparaissent en rouge. Les résidus glycylys en position terminale (position 116 pour GABARAPL1/GABARAP/GABARAPL2/Atg8, 120 pour LC3B et 124 pour LC3-A/LC3-C), importants pour la conjugaison des protéines au phospholipide, sont colorés en bleu.

Les protéines ATG8 présentent toutes pour point commun une glycine en C-terminale conservée et clivable qui joue un rôle important dans la lipidation de ces protéines. Cet acide aminé est localisé en position 116 pour la sous-famille GABARAP et en position 120 pour la sous-famille LC3 (Chakrama *et al*, 2010; Ichimura *et al*, 2000; Kabeya *et al*, 2004; Tanida *et al*, 2004) (Figure 7). Les protéines ATG8 sont synthétisées sous une pro-forme inactive, puis sont clivées en aval de cette glycine par la protéase à cystéine ATG4 pour donner une forme d'ATG8 mature cytosolique appelée ATG8-I (Skytte *et al*, 2017) (Figure 6B). La protéase ATG4B est responsable de la coupure de plusieurs membres des sous-familles LC3 et GABARAP. Cette protéase présente un motif LIR (LC3 interaction motif) qui est un motif protéique permettant la reconnaissance et l'interaction avec les membres ATG8. Cette interaction entre ATG4 et ATG8 est nécessaire au clivage des ATG8. La protéine ATG4B, en plus de sa fonction de protéase, est importante pour le maintien de la stabilité des protéines GABARAP et GABARAPL1. En effet, l'extinction de l'expression d'ATG4B dans des cellules MEF (murin embryonic fibroblast) entraîne une instabilité des protéines GABARAP et GABARAPL1 qui sont alors dégradées par le protéasome. Ainsi, les protéines ATG4B protègent certains membres ATG8 de la dégradation par le système du protéasome (Skytte *et al*, 2017). Le système de conjugaison va alors permettre de lier les protéines ATG8 à un phospholipide : la PE présente sur la membrane de l'autophagosome. Grâce à cette lipidation, les protéines ATG8 vont pouvoir s'ancrer à la membrane de l'autophagosome (Kabeya *et al*, 2004; Tanida *et al*, 2004). Ainsi, les protéines ATG8-I cytosoliques clivées par ATG4 sont activées par ATG7 (enzyme E1), puis transférées sur ATG3 (enzyme E2). Le complexe ATG8-I-ATG3 est transféré sur la membrane de l'autophagosome à proximité d'une PE. Enfin, la conjugaison des ATG8-I à la PE est activée par le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 (enzyme E3) pour former ATG8-II, une forme lipidée membranaire associée aux autophagosomes (Ichimura *et al*, 2000; Nakatogawa, 2013). Les protéines ATG8 associées à ATG3 seraient recrutées au niveau de l'autophagosome par le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 (Figures 6B et 6C) (Fujita *et al*, 2008; Hanada *et al*, 2007). Les protéines ATG8-II sont localisées sur les faces interne et externe des autophagosomes. La protéine ATG4B peut aussi enlever les protéines ATG8-II ancrées à la membrane externe des autophagosomes par la phosphatidyléthanolamine, libérant les protéines ATG8-I dans le cytosol. Les protéines ATG8-I libérées permettent de maintenir un stock de ATG8-I et peuvent ainsi être recyclées pour l'élongation d'un nouveau phagophore sous leur forme conjuguée aux PE (Figures 6 B et C). Cette dé-lipidation des protéines ATG8 interviendrait au moment de la fusion avec le lysosome (Yu *et al*, 2012). Le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 associé aux phagophores se dissocierait lorsque les autophagosomes seraient formés.

Bien que toutes les protéines ATG8 puissent participer à l'élongation du phagophore, il est décrit dans la littérature que les protéines de la sous-famille LC3 interviendraient plus

particulièrement dans le processus d'élongation du phagophore, alors que les protéines de la sous-famille GABARAP seraient plus impliquées dans la fermeture et la maturation de l'autophagosome (Weidberg *et al*, 2010) (Figure 2).

Néanmoins, une étude de 2016 menée par Nguyen remet en cause la participation de tous les membres ATG8 dans l'élongation du phagophore. Les auteurs ont d'abord créé différentes lignées HeLa invalidées pour chacun des 6 gènes *ATG8* (*LC3 A, B* ou *C* et *GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2*) ou invalidées par sous-famille individuellement (*LC3* ou *GABARAP*) (Nguyen *et al*, 2016). Ces travaux ont permis de mettre en évidence que toutes les protéines ATG8 n'étaient pas essentielles pour initier la formation des autophagosomes mais qu'elles étaient, en revanche, très importantes lors des étapes plus tardives au moment de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome. Ces protéines jouent également un rôle important dans le processus autophagique lors de la dégradation sélective des mitochondries et lors de l'autophagie induite par une carence en nutriments (Nguyen *et al*, 2016). Les protéines ATG8 ne semblent pas essentielles à la biogénèse des autophagosomes. En effet, la perte de chacune des protéines ATG8 (dans la lignée HeLa) conduit à la formation d'autophagosomes de plus petites tailles et entraîne une diminution du nombre d'autophagosomes. De plus, l'autophagie basale dans ces cellules invalidées pour chacun des gènes *ATG8* est diminuée, visible par une plus forte accumulation de la protéine p62 normalement dégradée par la voie autophagique (Nguyen *et al*, 2016). En plus de leur rôle dans l'élongation du phagophore, les différentes protéines ATG8 possèdent aussi d'autres fonctions essentielles dans la maturation, la fermeture des autophagosomes et dans la dégradation sélective d'organelles et de substrats protéiques développés dans la suite de ce chapitre.

1.3.1.3. La protéine transmembranaire ATG9 et la régulation de la phase d'élongation du phagophore

Au cours de la formation d'un autophagosome mature, nous avons vu que les systèmes de conjugaison impliquant le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 et le système ATG8 sont nécessaires à l'étape d'élongation de la membrane du phagophore. Un apport continu de lipides est nécessaire pour permettre l'expansion du phagophore lors de cette phase d'élongation. La protéine ATG9, la seule protéine ATG transmembranaire, régule cette phase d'élongation en délivrant des phospholipides membranaires à l'autophagosome grâce au trafic vésiculaire, mais l'origine de ces membranes semble diverse. En effet, différentes études ont permis de montrer que ces vésicules lipidiques pourraient provenir du réticulum endoplasmique (Orsi *et al*, 2012; Ylä-Anttila *et al*, 2009), de l'appareil de Golgi (Guo *et al*, 2012; Takahashi *et al*, 2011), du compartiment intermédiaire ERGIC (endoplasmic reticulum/Golgi intermediate compartment)

(Ge *et al*, 2013), de la membrane plasmique (Ravikumar *et al*, 2010), des endosomes recyclés (Orsi *et al*, 2012) ou encore de la membrane mitochondriale (Hailey *et al*, 2010).

La protéine autophagique transmembranaire ATG9 chez les mammifères

Chez les mammifères, la protéine ATG9 est aussi appelée mATG9 (mammalian ATG9), ATG9A ou ATG9L1. Elle régule l'étape d'élongation du phagophore après l'étape de nucléation. Elle possède six segments transmembranaires conservés chez la levure et les mammifères avec des extrémités N- et C-terminale localisées dans le cytosol (Young *et al*, 2006) (Figures 5 et 8). La protéine Apg9 chez la levure possède deux homologues chez les mammifères : ATG9A et ATG9B. Chez l'Homme, ces deux protéines sont codées par 2 gènes localisés sur des chromosomes différents : le chromosome 2 (2q35) pour *ATG9A* et le chromosome 7 (7q36) pour *ATG9B* (Robb *et al*, 2004). *ATG9A* et B semblent avoir des fonctions similaires dans l'autophagie mais *ATG9B* est beaucoup moins étudiée ; peut-être du fait de son expression, limitée au placenta et aux glandes pituitaires. Au contraire, *ATG9A* a une expression ubiquitaire et est plus documentée (Yamada *et al*, 2005). Nous nous limiterons donc à l'étude d'*ATG9A* dans l'autophagie.

Régulation de l'élongation du phagophore par ATG9A chez les mammifères

Lors de conditions riches en nutriments, *ATG9A* est localisée au niveau de l'environnement du Golgi-*Trans* (TGN = *Trans* Golgi-network) ou des endosomes tardifs. Mais, elle est également retrouvée dans les endosomes de recyclage et précoces (Orsi *et al*, 2012; Young *et al*, 2006). En effet, des études par immunofluorescence ont montré que la protéine *ATG9A* colocalise avec *RAB6*, une protéine présente dans le Golgi, mais également avec les protéines *RAB7* et *RAB9* présentes au niveau des endosomes tardifs. *ATG9A* colocalise également avec la protéine *TGN46* que l'on retrouve au niveau du Golgi *trans* (Young *et al*, 2006). Lors d'une induction de l'autophagie par privation en nutriments, *ATG9A* est relocalisée du Golgi *trans* vers la périphérie au niveau des endosomes. L'ajout d'acides aminés dans ce milieu provoque la relocalisation d'*ATG9A* qui retourne dans le Golgi *trans*. *ATG9A* oscillerait ainsi entre le Golgi *trans* et la région endosomale en fonction du niveau d'autophagie dans la cellule *via* le système vésiculaire (Young *et al*, 2006). Lors de l'induction de l'autophagie, une partie des protéines *ATG9A* est également redistribuée au niveau du site de formation du phagophore (Young *et al*, 2006; Orsi *et al*, 2012; Popovic & Dikic, 2014). La relocalisation de la protéine *ATG9A* est donc importante pour les phases précoces de l'autophagie lors de la formation du phagophore. Néanmoins, la protéine *ATG9A* présente dans les vésicules interagirait avec le phagophore de façon transitoire. En effet, *ATG9A* joue un rôle dans le transport des lipides vers le phagophore mais ne serait pas incorporée à sa membrane.

Effectivement, la protéine WIPI 2 du complexe de nucléation est impliquée dans le recyclage d'ATG9A vers les endosomes de recyclage. En l'absence de cette protéine, ATG9A ne serait plus recyclée et s'accumulerait au niveau du phagophore, empêchant la formation de l'autophagosome (Orsi *et al*, 2012).

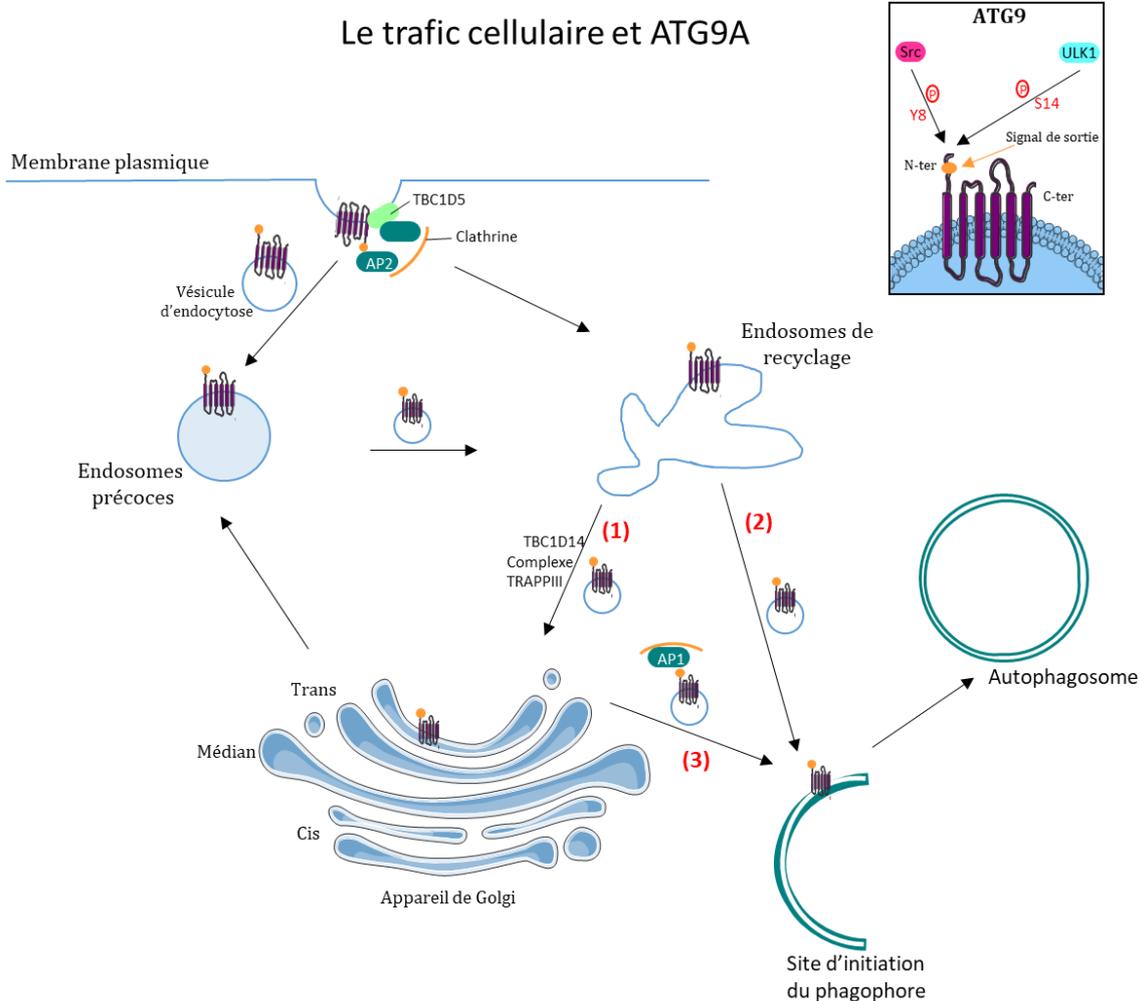


Figure 8 : Proposition de modèle pour la localisation d'ATG9A et la formation des autophagosomes (D'après Imai *et al*, 2016). ATG9 possède au niveau de son extrémité N-terminale deux motifs peptidiques pouvant être reconnus par les protéines adaptatrices à clathrine AP1/AP2. Ces protéines sont impliquées dans la régulation du trafic d'ATG9A de la membrane plasmique au Golgi trans et vers le site d'initiation du phagophore via des vésicules à clathrine qui sont recrutées par le complexe AP1/AP2. Dans des conditions riches en nutriments, la kinase Src phosphoryle ATG9A sur la tyrosine 8 pour maintenir son transport endosomal. En réponse à une privation en nutriments, ATG9A est à la fois phosphorylée par Src sur la tyrosine 8 et par la kinase ULK1 sur la sérine 14. Cette double phosphorylation provoque l'interaction d'ATG9A avec le complexe AP1/AP2 au niveau de son extrémité N-terminale. L'adaptateur protéique AP2 est capable d'interagir directement avec le motif signal de sortie d'ATG9A pour guider le transport de ATG9A. AP2 est également capable d'interagir avec la protéine RabGAP, TBC1D5, en interaction avec la clathrine et qui est capable d'interagir avec LC3 par un domaine LIR1 régulant ainsi le transport endomembranaire. L'ensemble de ces interactions entraîne la redistribution d'ATG9A de la membrane plasmique à la région juxtanucléaire à proximité de l'appareil de Golgi et du RE, où se trouve le site d'initiation de l'autophagie. Dans un premier temps, ATG9A circulerait entre la membrane plasmique, le réseau trans-Golgi et le système endolysosomal par un système de trafic vésiculaire. Le transport entre les endosomes de recyclage et le trans-Golgi dépend du complexe TRAPPIII et de TBC1D14 (1) et il permettrait de maintenir un pool d'ATG9A rapidement disponible. Lors de l'induction de l'autophagie, ATG9A circule en direction du site d'initiation du phagophore pour s'y localiser transitoirement en provenance des endosomes de recyclage (2) et/ou du Golgi (3).

La relocalisation d'ATG9A vers la périphérie au niveau des endosomes ou au site d'initiation du phagophore est importante pour son rôle dans l'autophagie. Ces deux étapes sont régulées et dépendent de ULK1 (Young *et al*, 2006) et de p38 α MAPK (mitogen-activated protein kinase) (Webber & Tooze, 2010). En effet, l'inhibition de l'expression de ULK1 par siRNA dans des cellules HEK293 empêche la relocalisation d'ATG9A qui reste au niveau de l'appareil de Golgi lors d'une induction de l'autophagie par privation en nutriments (Young *et al*, 2006).

Une étude plus récente a permis de montrer que l'extrémité N-terminale cytosolique de la protéine ATG9A permet aussi la régulation de sa localisation par ULK1 et la kinase Src (Zhou *et al*, 2017). Au niveau de son extrémité N-ter, ATG9A possède deux séquences pouvant être reconnues par deux protéines adaptatrices à clathrine, le complexe AP1 et AP2. Ces protéines sont impliquées dans la régulation du trafic d'ATG9A de la membrane plasmique au Golgi *trans* et vers le site d'initiation du phagophore *via* des vésicules à clathrine (Guo *et al*, 2012; Popovic & Dikic, 2014; Zhou *et al*, 2017). Dans des conditions riches en nutriments, la kinase Src phosphoryle ATG9A sur la tyrosine 8 pour maintenir son transport endosomal. En réponse à une privation en nutriments, ATG9A est à la fois phosphorylée par Src sur la tyrosine 8 et par la kinase ULK1 sur la sérine 14. Cette double phosphorylation provoque l'interaction d'ATG9A avec le complexe AP1/2 au niveau de son extrémité N-terminale. Ces interactions entraînent la redistribution de ATG9A de la membrane plasmique à la région périnucléaire à proximité de l'appareil de Golgi et du RE, où se trouve le site d'initiation de l'autophagie (Zhou *et al*, 2017) (Figure 8).

Après cette phosphorylation, ATG9A se fixe à une protéine RabGAP (Rab GTPase-activating protein), TBC1D5 (Tre-2/Bub2/Cdc16 domain-containing RabGAP), régulant ainsi les processus de trafic endomembranaire. En effet, TBC1D5 est capable d'interagir directement avec LC3 *via* son domaine LIR1 (LC3 interaction region 1), mais aussi avec ATG9A et le complexe ULK1 activé pendant l'autophagie. De plus, cette protéine TBC1D5 interagit avec la clathrine et le complexe AP2. L'ensemble de ces interactions permet à TBC1D5 de jouer le rôle d'adaptateur protéique dans le recrutement de vésicules contenant ATG9A sur le site de formation de l'autophagosome (Figure 8) (Popovic *et al*, 2012; Popovic & Dikic, 2014). TBCD14, une autre RabGAP est décrite comme jouant un rôle dans les phases précoces de l'autophagie (Longatti *et al*, 2012). Cette protéine initialement décrite comme inhibitrice de l'élongation du phagophore lorsqu'elle est surexprimée, régule en fait le transport de vésicules contenant ATG9A des endosomes de recyclage vers le Golgi *trans* en association avec RAB11, RAB1 et le complexe TRAPPIII (Figure 8). Ce transport permettrait de maintenir un stock de la protéine

ATG9A au niveau du Golgi *trans* nécessaire à l'initiation de l'autophagie et régulerait également le trafic de sécrétion (Longatti *et al*, 2012; Lamb *et al*, 2016).

L'ensemble de ces études souligne le rôle important de la protéine ATG9A dans la phase précoce de formation du phagophore et dans la phase plus tardive de l'élongation des vésicules autophagiques.

1.3.2. Fermeture et maturation de l'autophagosome

1.3.2.1. Fermeture de l'autophagosome

L'élongation de l'autophagosome permet d'enclâsser le contenu cellulaire pour permettre sa dégradation par le lysosome. L'élongation progressive de la membrane aboutit à une structure vésiculaire avec un pore étroit résiduel qui doit se fermer pour aboutir à la formation d'un autophagosome. En effet, afin que le transport et la fusion de l'autophagosome avec le lysosome soient efficaces, il est primordial que l'autophagosome soit fermé. Le mécanisme exact de fermeture n'est pas encore totalement connu chez les mammifères. La fermeture consiste à réunir une étroite ouverture, semblable à l'ouverture d'un pore nucléaire. Le mécanisme moléculaire de fermeture de l'autophagosome s'apparenterait plus à une fermeture dite par scission membranaire plutôt qu'à une fermeture par fusion membranaire comme c'est le cas entre la membrane de l'autophagosome et celle du lysosome (Knorr *et al*, 2015) (Figure 9). Ainsi, la fermeture de l'autophagosome ressemblerait au processus moléculaire responsable de la formation des vésicules internes des corps multi-vésiculaires. Effectivement, ces vésicules internes sont formées par invagination de la membrane limitante du corps multi-vésiculaire, puis par scission de celle-ci (Noda *et al*, 2009; Knorr *et al*, 2015).

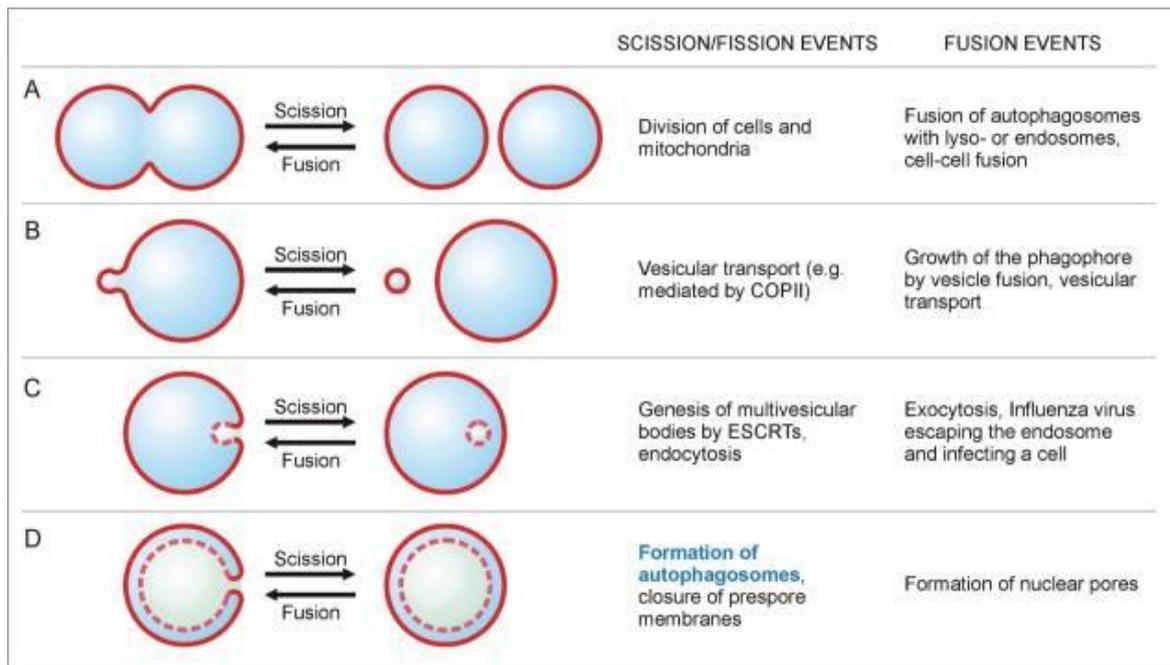


Figure 9 : Différence entre une scission et une fusion membranaire. Tirée de Knorr *et al.*, 2015. **(A)** La scission (ou fission) de la membrane est illustrée dans le cas où 2 bicouches de taille égale sont formées à partir d'une bicouche. La fusion est le processus topologiquement inverse, où 2 bicouches ou vésicules fusionnent en une seule. **(B, C)** La taille et l'emplacement des 2 vésicules l'une par rapport à l'autre ne sont pas pertinents pour identifier un processus comme scission ou fusion. **(D)** Scission membranaire et fusion de 2 vésicules de taille presque égale, empilées l'une dans l'autre. La formation de l'autophagosome à partir du phagophore en forme de coupe fournit un exemple de processus de scission. Chaque bicouche est représentée comme une seule ligne, les lignes pleines représentent les bicouches directement visibles et les lignes en pointillés correspondent aux bicouches évidentes uniquement dans les coupes transversales.

D'un point de vue moléculaire, chez les mammifères, la fermeture du pore de l'autophagosome impliquerait des complexes de la voie endolysosomale, localisés à la membrane du phagophore : les complexes ESCRT pour « endosomal sorting complexes required for transport » (Zhen *et al.*, 2020; Takahashi *et al.*, 2018, 2019). Ainsi, au cours de l'autophagie induite par privation de nutriments, CHMP2A appartenant au complexe ESCRT III est transloquée sur le phagophore pour réguler la séparation entre la membrane interne et externe de l'autophagosome pour créer une vésicule à double membrane. En effet, la déplétion de CHMP2A entraîne l'accumulation de phagophores non clos dans les cellules HeLa (Takahashi *et al.*, 2018). De plus, l'activité de la protéine VPS4, une AAA-ATPase (ATPase associated with diverse cellular activities) hydrolysant de l'ATP pour désassembler le complexe ESCRT-III est également importante pour la fermeture de l'autophagosome par scission membranaire (Figure 10) (Takahashi *et al.*, 2018). Le système de régulation de ESCRT n'est pas encore élucidé et tous les acteurs protéiques indispensables ne sont pas encore connus. Toutefois, il semblerait que la sous-unité VPS37A du complexe ESCRT-I localisée au niveau du phagophore soit nécessaire au recrutement de CHMP2A (Figure 10) (Takahashi *et al.*, 2019).

Nous pouvons ajouter que la famille ATG8, et particulièrement la sous-famille GABARAP intervient également lors de cette phase avec un rôle plus important dans les phases tardives de l'autophagie. En effet, l'utilisation du dominant négatif ATG4A, une protéase spécifique de la sous-famille GABARAP et impliquée dans la conjugaison des protéines ATG8 aux phospholipides, aboutit à la séquestration des membres GABARAP par cette protéase et l'accumulation d'autophagosomes non clos (Weidberg *et al*, 2010; Kabeya *et al*, 2004; Scherz-Shouval *et al*, 2003). D'autre part, l'utilisation d'un autre dominant négatif ATG4B, ciblant l'ensemble des protéines ATG8, conduit à l'inhibition de l'autophagie et à l'accumulation de phagophores suggérant l'importance des membres ATG8 dans la biogénèse des autophagosomes (Fujita *et al*, 2008; Hemelaar *et al*, 2003). De plus, une étude de 2019 menée par Bozic *et al.*, rapporte que l'interaction de GABARAP avec la protéine ATG2A est requise pour la fermeture des autophagosomes et que cette interaction se fait *via* son domaine LIR (Bozic *et al*, 2019). En effet, la mutation du domaine LIR dans la séquence d'ATG2A conduit à une maturation incomplète du phagophore et donc à une inhibition de la fermeture des autophagosomes (Bozic *et al*, 2019) (Figure 10).

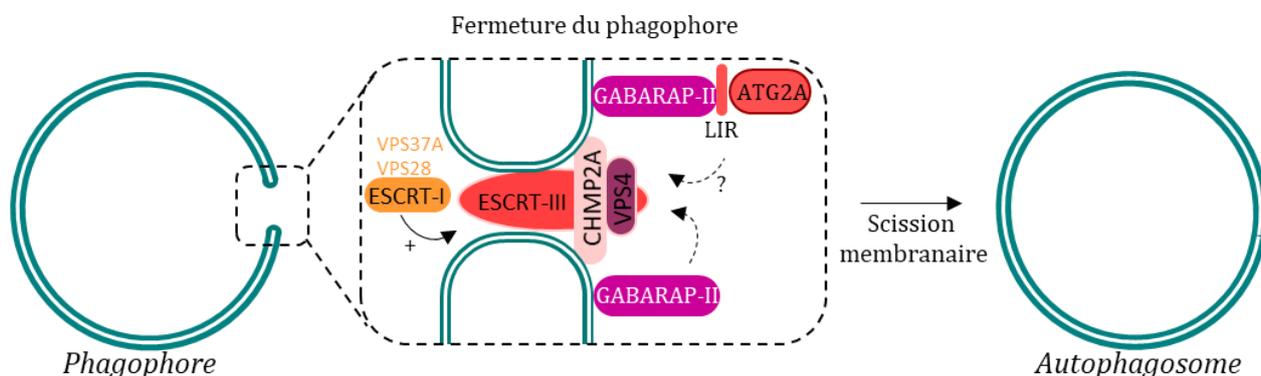


Figure 10 : Mécanisme possible de fermeture du phagophore pour donner un autophagosome. D'après Takahashi *et al*, (2019). Le mécanisme de fermeture du phagophore s'apparente à la scission membranaire observable dans les corps multivésiculaires (non visibles sur le schéma). Ce mécanisme de scission membranaire fait intervenir le complexe ESCRT (endosomal sorting complexes required for transport). Tout d'abord, l'induction de l'autophagie par privation en nutriments entraîne la translocation de la sous-unité CHMP2A du complexe ESCRT III au niveau du site de fermeture du phagophore pour réguler la fermeture des membranes interne et externe du phagophore. CHMP2A recrute ensuite la AAA-ATPase VPS4 qui est requise pour cette fermeture. La fermeture serait régulée par le complexe ESCRT I, avec les sous unités VPS37A et VPS28 situées au niveau du phagophore qui recruteraient CHMP2A. D'autre part, GABARAP-II sous sa forme associée à la membrane du phagophore interviendrait dans le mécanisme de fermeture du phagophore. Elle serait associée à la protéine ATG2 par interaction avec le motif LIR. Cependant le mécanisme exact d'intervention des protéines de la sous-famille GABARAP dans la fermeture de l'autophagosome n'est pas encore élucidé (?).

1.3.2.2. Maturation de l'autophagosome

La maturation de l'autophagosome est une étape qui fait suite à la fermeture de l'autophagosome, caractérisée par la libération de l'ensemble des protéines ATG de la surface externe de l'autophagosome. Cela permet de recycler le PI3P sous l'action de la PI3P phosphatase et les protéines ATG8/LC3 par l'intermédiaire des protéases ATG4 notamment. De nombreux autres complexes se détachent également lors de cette phase comme le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 (Figure 6C). La libération de ces différentes protéines ATG intervient en parallèle de la mise en place du mécanisme de fusion. Parmi toutes les ATG, les protéines ATG8 restent associées à la membrane interne de l'autophagosome mature et ces différentes protéines, dont principalement LC3, sont donc utilisées comme un marqueur de la présence des autophagosomes (Kabeya *et al*, 2000; Tanida *et al*, 2004).

Le recrutement et la libération des ATG8 au niveau de l'autophagosome peuvent être régulés par des modifications post-traductionnelles. En effet, LC3 peut être modifiée par phosphorylation et par acétylation. Ces modifications pourraient jouer un rôle sur l'induction, l'élongation ou la maturation des autophagosomes. En particulier, l'acétylation de LC3 intervient dans l'induction de l'élongation du phagophore. Effectivement LC3 peut être acétylée par l'acétyltransférase p300, ce qui régule négativement son activité (Lee & Finkel, 2009). Lorsque LC3 est acétylée, elle est localisée dans le noyau. L'induction de l'autophagie par privation en nutriments entraîne sa désacétylation par la sirtuine 1 (SIRT1) sur les lysines 49 et 51. Cette désacétylation permet l'interaction de LC3 avec les protéines nucléaires DOR (diabetes and obesity-regulated gene) provoquant le passage de LC3 dans le cytoplasme vers les autophagosomes afin qu'elle puisse participer à l'initiation de l'autophagie (Huang *et al*, 2015). LC3B-II peut également être désacétylée au niveau cytoplasmique par HDAC6 (histone desacetylase 6) (Liu *et al*, 2013b). La régulation des protéines ATG8 peut également se faire par phosphorylation. La kinase TBK1 régule aussi l'autophagie en phosphorylant les sérines des protéines LC3C (S93 et S96) et GABARAP-L2 (S87 et S88). Ainsi, LC3C et GABARAP-L2 phosphorylées ne peuvent plus être clivées et retirées des liposomes par ATG4, ces deux protéines seraient donc protégées de leur élimination prématurée induite par ATG4 au niveau des autophagosomes naissants. Ces modifications post-traductionnelles garantissent la formation d'une couche régulière de LC3C et GABARAP-L2 à la surface de l'autophagosome lors des premières étapes de sa formation et aident à maintenir le transport des autophagosomes vers les lysosomes (Herhaus *et al*, 2020). Une autre kinase, la PKA (protéine kinase A) a également été décrite comme pouvant modifier LC3 par phosphorylation. En effet, l'induction de l'autophagie dans les cellules neuronales entraîne la déphosphorylation de LC3 qui peut alors être associée aux autophagosomes (Cherra *et al*, 2010).

1.3.3. Transport des autophagosomes

Une fois les phases de fermeture et de maturation réalisées, l'autophagosome doit fusionner avec un lysosome. La fermeture de l'autophagosome est nécessaire pour sa fusion avec le lysosome (Takahashi *et al*, 2018). Mais les autophagosomes et les lysosomes ont une distribution cellulaire différente et doivent donc se retrouver pour permettre la formation d'un autolysosome qui dégradera le contenu vésiculaire. Ainsi, lorsque l'autophagie est induite, le lysosome est localisé principalement dans la région périnucléaire à côté du centre organisateur des microtubules alors que les autophagosomes sont eux localisés en périphérie cellulaire (Figure 11A) (Kawabata & Yoshimori, 2016). L'induction de l'autophagie par privation en nutriments entraîne la diminution du pH intra-lysosomal et la relocalisation des lysosomes dans la zone périnucléaire (Heuser, 1989; Korolchuk *et al*, 2011). Ainsi, après leur fermeture et leur maturation, les autophagosomes doivent migrer vers la région périnucléaire pour que la fusion avec les lysosomes soit efficace (Korolchuk *et al*, 2011; Poüs & Codogno, 2011). Effectivement, des études en temps réel effectuées par microscopie confocale ont permis d'observer la migration des autophagosomes matures vers des lysosomes (Kimura *et al*, 2008). Le transport des autophagosomes vers le centrosome/zone périnucléaire depuis la périphérie cellulaire est qualifié de transport cellulaire rétrograde. La relocalisation des autophagosomes se ferait grâce aux moteurs moléculaires le long des microtubules vers leurs extrémités négatives. Ainsi, le transport en direction de l'extrémité (-) des microtubules vers le noyau est assuré par un moteur moléculaire composé de dynéine et de dynactine, tandis que le transport en direction de l'extrémité (+) des microtubules vers la périphérie cellulaire est assuré par la kinésine (Gross *et al*, 2007).

1.3.3.1. Transport des autophagosomes vers la périphérie nucléaire

Les autophagosomes matures sont reliés aux microtubules par un complexe protéique, lui-même relié aux moteurs moléculaires. Les autophagosomes matures présentent à leur surface la petite protéine à GTPase RAB7 qui sert d'intermédiaire protéique entre l'autophagosome et les moteurs moléculaires associés aux microtubules (Gutierrez *et al*, 2004b). RAB7 est capable d'interagir et de former un complexe avec les protéines RILP (Rab-interacting lysosomal protein), ORP1L (oxysterol-binding protein-related protein 1L) et la dynéine afin de permettre le transport rétrograde des autophagosomes matures vers les lysosomes (Figure 11B) (Wijdeven *et al*, 2016; Nakamura & Yoshimori, 2017). RAB7 recruterait dans un premier temps les effecteurs RILP et ORP1L pour former un complexe RAB7-RILP-ORP1L. RILP interagirait directement avec la plus grosse des sous-unités de la dynactine

(p150Glued) pour pouvoir recruter la dynéine (Johansson *et al*, 2007). Ce transport rétrograde des autophagosomes est régulé dans la cellule par le niveau de cholestérol. Quand le niveau de cholestérol est bas, ORP1L interagit avec la protéine VAP-A, localisée à la membrane du réticulum endoplasmique (Figure 11B). Cette interaction empêche la formation du complexe RAB7-ORP1L-RILP-dynéine et diminue le transport des autophagosomes vers l'extrémité (-) des microtubules (Wijdeven *et al*, 2016).

Par ailleurs, la protéine ATG8 pourrait participer au transport rétrograde des autophagosomes vers les lysosomes pour leur fusion. En effet, la déplétion des protéines LC3 par micro-injection d'anticorps dirigés contre LC3 inhibe le transport efficace des autophagosomes par la dynéine (Kimura *et al*, 2008). Une autre étude a démontré que LC3 pouvait interagir directement avec JIP1 (mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1) *via* le domaine LIR (Figure 11B) (Fu *et al*, 2014). La protéine JIP1 est une protéine d'échafaudage aussi impliquée dans la transduction de signal cellulaire par la voie JNK en plus de son rôle dans le transport rétrograde des autophagosomes dans les cellules neuronales (Fu & Holzbaur, 2014; Fu *et al*, 2014).

1.3.3.2. Transport des autophagosomes vers la périphérie

Il existe également un mouvement inverse des autophagosomes vers la périphérie de la cellule. Effectivement, l'induction de l'autophagie par privation en nutriments entraîne la redistribution de l'autophagosome vers la périphérie (Pankiv *et al*, 2010). Ce transport fait intervenir la protéine FYCO1 (FYVE and coiled-coil domain-containing 1). En effet, FYCO1 est localisée sur les vésicules autophagiques périnucléaires et la déplétion de FYCO1 dans les cellules conduit à l'accumulation d'autophagosomes dans la région périnucléaire (Pankiv *et al*, 2010). Cette protéine intervient comme un adaptateur qui se lie indirectement aux autophagosomes et aux microtubules. FYCO1 interagit avec l'autophagosome en se liant à la protéine LC3 par son domaine LIR, au PI3P par son domaine FYVE et à la protéine RAB7 par sa région CC (coiled-coil) (Pankiv *et al*, 2010; Gutierrez *et al*, 2004b). La fixation de FYCO1 aux protéines LC3 par le domaine LIR se fait préférentiellement avec LC3A et B (Olsvik *et al*, 2015). (Figure 11B). D'un autre côté, FYCO1 se lie également aux microtubules par l'intermédiaire de la kinésine qui transporte l'autophagosome vers la périphérie cellulaire (Pankiv *et al*, 2010).

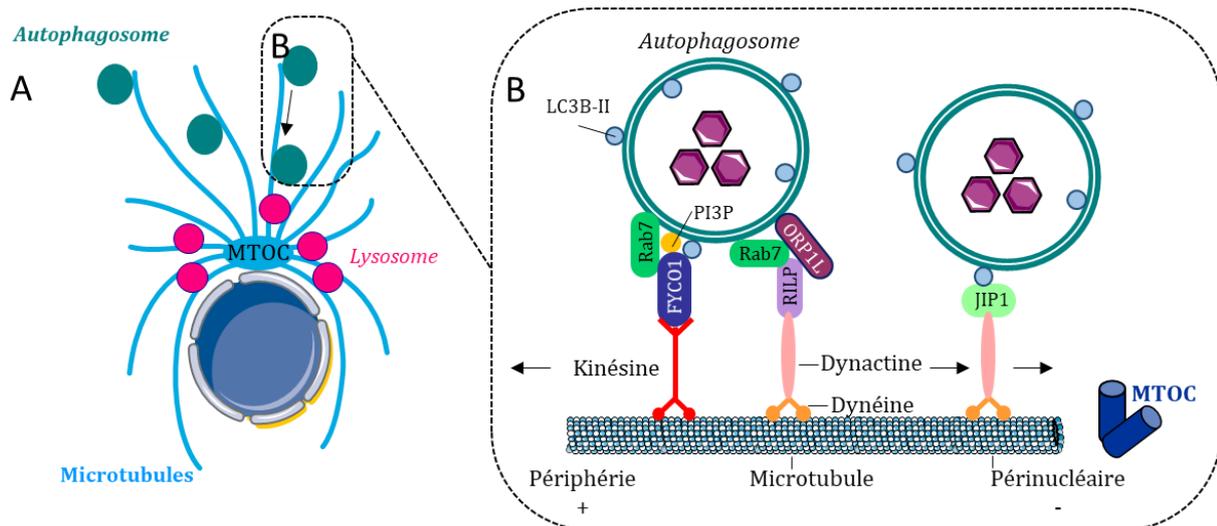


Figure 11 : Transport des autophagosomes matures. D'après Nakamura & Yoshimori (2017). **(A)** L'induction de l'autophagie entraîne une relocalisation des lysosomes dans la zone périnucléaire alors que les autophagosomes sont produits dans la périphérie cellulaire. Pour qu'il y ait fusion entre l'autophagosome et le lysosome au niveau de la zone périnucléaire, les autophagosomes doivent migrer vers la zone périnucléaire grâce aux microtubules. **(B)** La GTPase RAB7 permet le lien entre l'autophagosome et les microtubules associés aux moteurs moléculaires. RAB7 assure le transport de l'autophagosome vers l'extrémité (+) des microtubules en s'associant à FYCO1. FYCO1 est également reliée au PI3P et à LC3-II au niveau de la membrane de l'autophagosome et est reliée aux microtubules par son association à la kinésine. Le transport rétrograde des autophagosomes est assuré par un autre moteur moléculaire, celui de la dynactine/dynéine associé aux microtubules. En effet, dans des conditions riches en cholestérol, RAB7 est aussi capable de se lier à la protéine RILP et ORP1L pour médier le transport le long des microtubules vers l'extrémité (-) des microtubules correspondant à la périphérie nucléaire où est situé le centre organisateur des microtubules (MTOC = microtubule organizing center). Enfin, il semblerait que la protéine LC3B puisse interagir directement avec JIP1. JIP1 interagit avec la dynéine pour permettre le transport rétrograde des autophagosomes matures.

1.3.4. Fusion autophagosome-lysosome

Avant que les autophagosomes ne fusionnent avec les lysosomes, ils peuvent aussi fusionner avec des endosomes tardifs pour former des amphisomes qui fusionneront ensuite avec des lysosomes (Figure 2). La fusion de l'autophagosome avec le lysosome interviendra uniquement si l'autophagosome est fermé. Cette fusion autophagosome-lysosome fait intervenir plusieurs protéines impliquées notamment dans les transports vésiculaires de la voie endolysosomale.

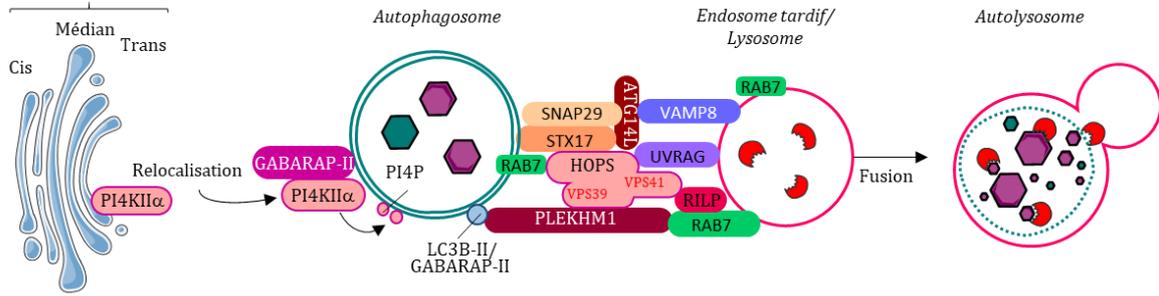
Parmi les protéines du complexe d'induction PI3KC3, les protéines UVRAG (UV radiation resistance-associated) et RUBICON (RUN domain and cysteine-rich domain containing, Beclin 1-interacting protein) participent également aux événements de fusion entre l'autophagosome et le lysosome. Ces deux protéines qui peuvent interagir avec BECLIN1 sont impliquées à la fois dans le transport endolysosomal, la maturation des autophagosomes et leur fusion *via* la GTPase RAB7 (Liang *et al*, 2008; Matsunaga *et al*, 2010; Zhong *et al*, 2009). Cependant, ces deux protéines réguleraient différemment la fusion. La protéine UVRAG serait favorable à cette fusion, alors que la protéine RUBICON l'inhiberait (Matsunaga *et al*, 2009;

Tabata *et al*, 2010). Lorsque UVRAG est localisée à la membrane du RE et des endosomes, elle peut se lier à une des 6 sous-unités du complexe HOPS : la protéine VPS16 (Liang *et al*, 2008). Cette interaction permet l'activation de RAB7 et la fusion de l'autophagosome avec l'endosome tardif et/ou le lysosome (Liang *et al*, 2008). Au contraire, RUBICON est capable de séquestrer la protéine UVRAG limitant ainsi son interaction avec le complexe HOPS entraînant la diminution de la maturation des endosomes et la diminution de la fusion (Sun *et al*, 2010). RUBICON interagit aussi directement avec la protéine hVPS34 (human VPS34) au niveau de son domaine RUN. La fixation de RUBICON à hVPS34 régule négativement l'activité kinase du complexe PIK3C3 et la maturation de l'autophagosome (Sun *et al*, 2011).

L'activité des protéines UVRAG et RUBICON est régulée par le niveau de nutriments disponibles pour la cellule. Ainsi, dans des conditions riches en nutriments, mTORC1 se fixe et phosphoryle la protéine UVRAG (Kim *et al*, 2015). Cette phosphorylation renforce l'interaction entre RUBICON et UVRAG limitant l'interaction de UVRAG avec le complexe HOPS et donc la maturation des autophagosomes (Matsunaga *et al*, 2009; Sun *et al*, 2010). Cette interaction limite également l'activité kinase de VPS34 et inhibe donc les phases précoces d'activation de l'autophagie (Sun *et al*, 2011). Dans des conditions pauvres en nutriments, l'inhibition de mTORC1 entraîne la libération de UVRAG non phosphorylée par RUBICON. UVRAG peut ensuite se lier au complexe HOPS et faciliter la fusion autophagosome-lysosome (Figure 12A). Néanmoins, une étude contradictoire de 2014 montre que ce serait plutôt l'interaction du complexe HOPS avec la protéine SNARE Syntaxin 17 (STX17) qui serait directement impliquée dans la fusion autophagosome-lysosome (Jiang *et al*, 2014). Dans cette étude, l'interaction décrite précédemment entre UVRAG et le complexe HOPS n'est pas retrouvée dans le complexe HOPS-STX17 (Jiang *et al*, 2014). De plus, l'invalidation par interférence ARN de l'expression des sous-unités VPS33A, VPS16 et VPS39 du complexe HOPS diminue fortement le flux autophagique et entraîne l'accumulation d'autophagosomes contenant la protéine STX17 et la protéine LC3 (Jiang *et al*, 2014). De façon similaire, chez la drosophile, une étude a montré que les six sous-unités du complexe HOPS (VPS11, VPS18, VPS16A, VPS33, VPS39 et VPS41) étaient nécessaires à la fusion de l'autophagosome-lysosome et que la STX17 colocalisait avec le complexe HOPS au niveau des autophagosomes (Takáts *et al*, 2014). Dans cette étude, l'extinction de l'un des 6 gènes codant les sous-unités du complexe HOPS entraîne de la même manière le blocage du flux autophagique basal et induit (Takáts *et al*, 2014).

A Quantité normal en cholestérol

Appareil de Golgi



B Taux faible en cholestérol

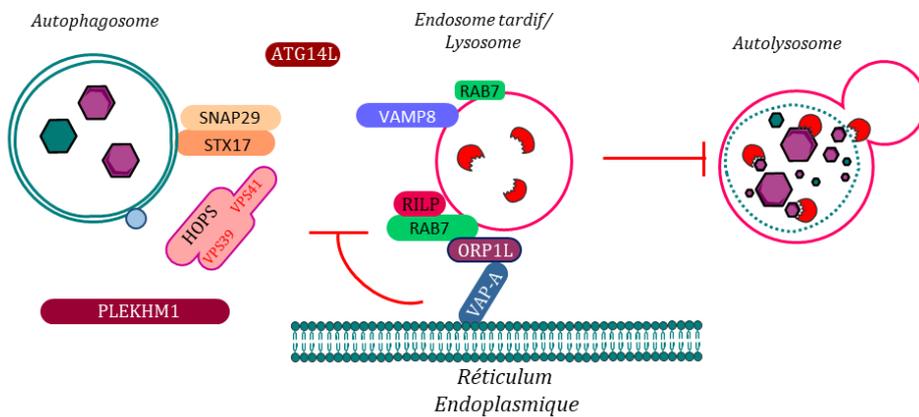


Figure 12 : Fusion de l'autophagosome avec les endosomes tardifs/lysosomes et formation de l'autolysosome. D'après Wijdeven et al, (2016). L'autophagosome peut fusionner avec un endosome tardif pour former un amphisome qui fusionnera ensuite avec un lysosome ou directement avec le lysosome pour former un autolysosome. (A) La fusion entre l'autophagosome et le lysosome requiert le complexe trans-SNARE qui est composé d'une part, de la Synthaxine 17 (STX17) et de la protéine SNARE SNAP29 présentes au niveau de l'autophagosome, et d'autre part, de VAMP8 présente au niveau de la membrane du lysosome. La STX17 est également en interaction avec le complexe HOPS. HOPS permet le recrutement de la protéine effectrice PLEKHM1 par sa sous-unité VPS39 et la protéine RILP par sa sous-unité VPS41. De plus, PLEKHM1 est en interaction indirecte avec l'autophagosome en se fixant aux protéines ATG8-II (LC3-II/GABARAP/II) et en interaction indirecte avec le lysosome par la protéine RAB7 facilitant la fusion. Par ailleurs, le complexe HOPS peut être régulé par l'intermédiaire de son interaction avec UVRAG. Le complexe HOPS-UVRAG stimule alors la protéine RAB7 et la fusion autophagosome-lysosome. Enfin, l'induction de l'autophagie par privation en nutriments entraîne la relocalisation de la kinase à lipides PI4KIIa (phosphatidylinositol 4-kinase IIa) de l'appareil de Golgi vers la membrane de l'autophagosome par l'intermédiaire de la forme II de GABARAP. Cette lipide-kinase est impliquée dans la production de PI4P (phosphatidylinositol 4-phosphate) nécessaire à la fusion de l'autophagosome avec le lysosome mais par un mécanisme qui n'est pas encore élucidé. (B) Quand le niveau de cholestérol est bas ORP1L associé à l'autophagosome forme un site de contact avec le réticulum endoplasmique par l'intermédiaire de la protéine VAP-A. Ce site de contact avec le réticulum endoplasmique empêche le recrutement du complexe HOPS et de PLEKHM1 limitant la fusion entre l'autophagosome et le lysosome/endosome tardif.

Ainsi, la protéine SNARE STX17 se situe au niveau de la membrane de l'autophagosome clos et est en interaction avec le complexe HOPS (Itakura *et al*, 2012b; Jiang *et al*, 2014). Cette protéine interagit également avec d'autres protéines en interaction avec le lysosome pour faciliter la fusion autophagosome-lysosome. En effet, la protéine STX17 interagit avec la protéine SNAP29 au niveau de l'autophagosome qui interagit elle-même avec la protéine

SNARE VAMP8 associée à la membrane lysosomale. La protéine ATG14L interagirait elle aussi avec la STX17 et SNAP29 afin de faciliter l'interaction avec VAMP8. Ces interactions forment un véritable pont protéique permettant ainsi la fusion autophagosome-lysosome (Itakura *et al*, 2012b; Diao *et al*, 2015).

D'autre part, le complexe HOPS décrit précédemment comme permettant de relier les endosomes tardifs/lysosomes aux autophagosomes *via* STX17 (Jiang *et al*, 2014), le ferait aussi *via* d'autres protéines. En effet, les sous-unités VPS39 et VPS41 du complexe HOPS interagissent respectivement avec la protéine effectrice PLEKHM1 (pleckstrin homology domain-containing protein family member 1) et la protéine effectrice RILP (Lin *et al*, 2014; Wijdeven *et al*, 2016; McEwan *et al*, 2015). Les protéines PLEKHM1 et RILP sont recrutées par la protéine RAB7 présente au niveau des endosomes tardifs/lysosomes et recrutent conjointement le complexe HOPS pour permettre la fusion (Figure 12A) (Wijdeven *et al*, 2016; McEwan *et al*, 2015). En plus de cette protéine effectrice PLEKHM1, RAB7 est également capable de recruter l'effecteur ORP1L, un senseur du cholestérol important pour le transport des autophagosomes décrit précédemment (Johansson *et al*, 2007; Wijdeven *et al*, 2016). ORP1L régulerait aussi la fusion de l'autophagosome avec le lysosome en fonction du taux de cholestérol. Ainsi, dans des conditions pauvres en cholestérol, ORP1L est localisée sur les endosomes tardifs et forme un site de contact avec la protéine VAP-A du réticulum endoplasmique. Le site de contact entre l'endosome tardif et le réticulum endoplasmique *via* la protéine ORP1L d'un côté et de VAP-A de l'autre, inhibe aussi l'interaction de RAB7 avec PLEKHM1 et donc le recrutement de HOPS qui est important pour la fusion autophagosome-lysosome (Figure 12B) (Wijdeven *et al*, 2016; McEwan *et al*, 2015). Ces données suggèrent que le niveau de cholestérol régulerait le transport des autophagosomes ainsi que leur fusion avec les endosomes tardifs et les lysosomes.

Ainsi, la protéine PLEKHM1 joue également un rôle dans la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. Nous avons vu que PLEKHM1 était recrutée par la protéine lysosomale RAB7 et qu'elle interagissait également avec le complexe HOPS au niveau de sa sous-unité VPS39. Une approche par spectrophotométrie de masse (SILAC) dans des cellules HeLa exprimant une protéine de fusion GFP-PLEKHM1 a permis de montrer que la protéine PLEKHM1 interagissait au niveau de son domaine RUN avec le complexe HOPS (McEwan *et al*, 2015). De plus, la délétion du gène *PLEKHM1* dans des cellules MEF immortalisées entraîne une diminution du flux autophagique et de la formation des autolysosomes, démontrant l'importance de cette protéine dans la fusion autophagosome-lysosome (McEwan *et al*, 2015). D'autres expériences de co-immunoprécipitation dans des cellules HeLa ont permis de montrer que la protéine PLEKHM1 peut interagir avec les différentes protéines des familles LC3 et GABARAP associées à la membrane de l'autophagosome *via* un domaine LIR (McEwan *et al*, 2015) (Figure 12A).

Néanmoins, il a été décrit que ce sont les protéines de la sous-famille GABARAP qui devraient davantage participer aux événements de maturation et de fusion des autophagosomes (Weidberg *et al*, 2010). Or, dans l'étude de McEwan les sous-familles GABARAP et LC3 peuvent toutes les deux être en interaction avec PLEKHM1 pour permettre la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (McEwan *et al*, 2015). Les deux sous-familles LC3 et GABARAP possèdent les mêmes extrémités C-terminales clivables qui leur confèrent la capacité d'ancrage à la membrane de l'autophagosome grâce à la conjugaison à un phospholipide (Kabeya *et al*, 2004). Mais, elles diffèrent surtout par leur extrémité N-terminale qui forme des structures secondaires en hélices α (Rogov *et al*, 2014). Or, il a été montré que c'était cette extrémité N-ter des protéines ATG8 – permettant une interaction avec d'autres acteurs moléculaires – qui semblait être impliquée dans les événements de fusion et que les membres GABARAP auraient ainsi une activité différente par rapport aux membres LC3 (Wu *et al*, 2015a; Weidberg *et al*, 2010; Landajuela *et al*, 2016). Dès lors, les protéines LC3 et GABARAP ne possèderaient pas exactement les mêmes fonctions concernant la fusion autophagosome-lysosome. L'absence de différence entre les membres LC3 et GABARAP, dans l'étude de McEwan pour leur interaction avec PLEKHM1 est peut-être due au fait que l'interaction a été montrée par des études d'interaction *in vitro* et par co-immunoprécipitation. Toutefois, une étude de 2016 menée par Nguyen *et al*, dans des cellules HeLa invalidées – soit pour les 6 membres ATG8 (hexa Knock-out (KO)) ou soit pour chacun des membres de la sous-famille LC3 ou GABARAP (tri KO) – a permis de montrer un rôle préférentiel de la sous-famille GABARAP dans le recrutement de PLEKHM1 pour la fusion autophagosome-lysosome complétant ainsi l'étude de McEwan. Ce recrutement a lieu lorsque l'autophagie sélective PINK1/Parkin (PTEN-induced putative kinase 1/Parkinsonian protein) des mitochondries endommagées est activée à la suite d'un traitement de 24 h avec de l'oligomycine/antimycine A et aussi lors de l'autophagie non sélective induite par une restriction en nutriments (EBSS) (Nguyen *et al*, 2016). Cette étude semble donc clarifier le rôle essentiel des protéines ATG8 et identifie la sous-famille GABARAP comme étant le principal contributeur pour l'autophagie sélective permettant la dégradation des mitochondries (Nguyen *et al*, 2016). Une étude complémentaire récente montre que le complexe GABARAP-PLEKHM1 est stable et que l'interaction entre ces deux protéines présente un nombre de contacts plus élevé comparativement à celles avec LC3. Cinq résidus de la famille GABARAP contribueraient particulièrement à la spécificité de cette interaction : il s'agit de G18, K20, R/K47, D54, F/W62 (Jatana *et al*, 2020).

De plus, une étude de 2015 menée par Wang *et al.*, a permis de montrer que GABARAP est aussi importante pour le recrutement de la phosphatidylinositol 4-kinase II α (PI4KII α) dont la cible est un lipide présent à la membrane de l'autophagosome. Cette kinase dans des conditions normales est retrouvée dans le Golgi *trans* et colocalise avec la protéine TGN46 (Wang *et al*,

2015). Lors de l'induction de l'autophagie par une privation en nutriments, l'expression de PI4KII α est augmentée et cette protéine se relocalise du Golgi *trans* aux autophagosomes. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation ont permis de montrer que GABARAP se lie directement à la kinase PI4KII α . GABARAP interviendrait ainsi dans le transport de PI4KII α à la membrane de l'autophagosome, probablement par un trafic vésiculaire (Wang *et al*, 2015). Aussi, la diminution de l'expression de GABARAP ou de PI4KII α conduit à la production d'autophagosomes de large diamètre et non fonctionnels. Cette kinase PI4KII α est impliquée dans la production de phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P). L'induction de l'autophagie conduit ainsi à la production de PI4P à la membrane de l'autophagosome. Dans des lignées cellulaires dont l'expression de GABARAP et PI4KII α a été invalidée, l'ajout de PI4P permet de restaurer le phénotype normal et conduit à la production d'autophagosomes de tailles normales et fonctionnels. La production de PI4P joue donc un rôle important dans la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (Wang *et al*, 2015) (Figure 12A).

D'autre part et de façon plus générale, il semblerait que l'ensemble des membres de la famille ATG8 puissent réguler la fusion entre l'autophagosome et le lysosome. En effet, les protéines ATG8 associées à la membrane de l'autophagosome peuvent également recruter la protéine GAP ornithine aminotransferase-like 1 (OATL1, aussi connue sous le nom de TBC1D25). En effet, des travaux ont montré que la surexpression de cette protéine inhibe la fusion autophagosome-lysosome en diminuant la maturation des autophagosomes (Itoh *et al*, 2011).

Cependant, malgré l'intervention de tous les membres ATG8 dans la régulation de la fusion autophagosome-lysosome, l'ensemble des études suggère que les protéines GABARAP participent de façon beaucoup plus importante aux processus de maturation et de fermeture de l'autophagosome que les protéines LC3.

1.3.5. Dégradation du contenu de l'autolysosome

Après la fusion de la membrane externe de l'autophagosome avec le lysosome, les hydrolases acides lysosomales dégradent la membrane interne de l'autophagosome ainsi que le contenu vésiculaire. Cet autolysosome pourra ensuite être réutilisé pour former un nouveau lysosome (Kawabata & Yoshimori, 2016). Les macromolécules présentes dans l'autolysosome qui proviennent de cette dégradation sont transportées de l'intérieur de l'autolysosome vers le cytosol par des perméases présentes à la membrane (Yang & Klionsky, 2010).

Par ailleurs, les protéines ATG8 ont aussi été décrites comme participant aux événements de dégradation. En effet, elles participeraient à la dégradation de la membrane interne de l'autophagosome (Tsuboyama *et al*, 2016).

1.4. Autophagie sélective

1.4.1. Généralités

Le processus autophagique a été initialement décrit comme un processus permettant la dégradation aléatoire de composés cytoplasmiques induit par différents facteurs incluant la privation en nutriments (Schworer & Mortimore, 1979; Mortimore & Schworer, 1977). Cette autophagie permet ainsi de palier à une carence en nutriments dans la cellule. Il est maintenant établi que l'autophagie peut également être sélective et réguler l'homéostasie cellulaire en dégradant sélectivement différents substrats protéiques appelés cargos. Ces cargos peuvent ainsi être des agrégats protéiques ou des organites cellulaires (Figure 13 et Figure 14B). L'autophagie sélective se nomme différemment en fonction du type de substrat. Par exemple, pour la dégradation sélective des mitochondries, on parle de mitophagie, ou encore d'agrèphagie pour la dégradation d'agrégats (Voir la figure 14B).

Autophagie sélective

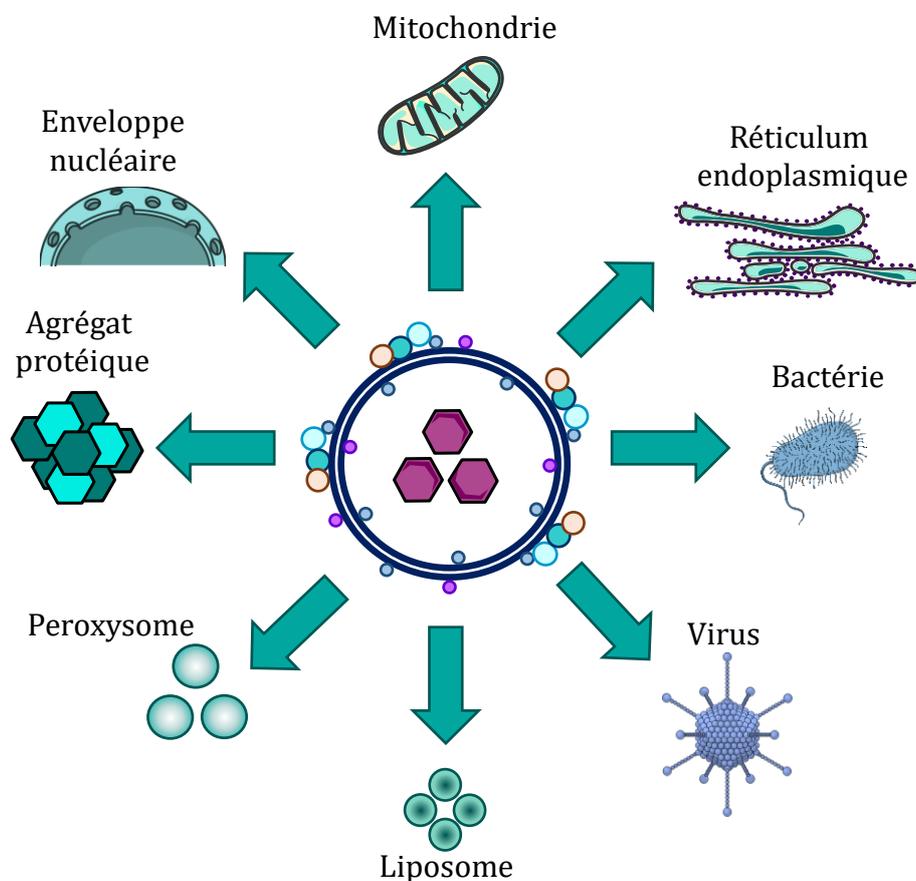


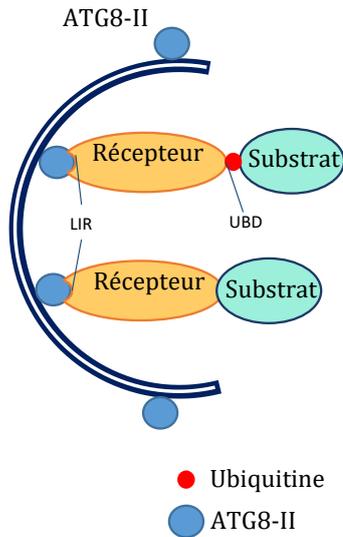
Figure 13 : Schéma récapitulant les différents cargos à dégrader de l'autophagie sélective.

1.4.2. Mécanisme de l'autophagie sélective

Ce mécanisme d'autophagie sélective doit permettre une reconnaissance spécifique du cargo, ainsi que sa séquestration dans le phagophore et l'autophagosome pour être dégradé. Les cargos sont ciblés dans l'autophagosome par l'intermédiaire de protéines adaptatrices appelées récepteurs cargos autophagiques. Les récepteurs cargos liés à leur cargo sont capables de se fixer à la membrane de l'autophagosome par l'intermédiaire des protéines ATG8 lipidées (LC3/GABARAP). La reconnaissance des récepteurs cargos par les protéines ATG8 se fait par l'intermédiaire du petit motif protéique appelé LIR ou aussi appelé AIM pour « ATG8 interaction motif » (Rogov *et al*, 2014). Les protéines de la sous-famille GABARAP peuvent également interagir avec les récepteurs cargos par la reconnaissance du motif GIM (GABARAP interaction motif) (Rogov *et al*, 2017). Le motif LIR est une séquence consensus (W/F/Y)-X₁-X₂-(L/I/V) composée d'un acide aromatique (W/F/Y) et d'un acide aminé hydrophobe (L/I/V) (Birgisdottir *et al*, 2013; Rogov *et al*, 2014; Pankiv *et al*, 2007). Ce motif se fixe aux acides aminés présents au niveau de deux poches hydrophobes des protéines ATG8 (HP1 et HP2) (Rogov *et al*, 2014). Pour les protéines GABARAP, la séquence de reconnaissance est (W/F)-(V/I)-X-V (Rogov *et al*, 2017).

Les types de cargos reconnus par les récepteurs peuvent être classés en deux groupes : les cargos ubiquitinylés qui sont reconnus *via* un motif UBD (ubiquitin-binding domain) ou les cargos non-ubiquitinylés qui sont reconnus directement (Figure 14A). Ces adaptateurs vont alors permettre le recrutement de différents cargos à la membrane des phagophores *via* les protéines ATG8.

A



B

Nom	Substrat	Récepteur
Mitophagie	Mitophagie Ub dépendante	p62, NBR1, OPTN
	Mitophagie médiée par les récepteurs	NIX, BNIP3, FUNDC1, AMBRA1
Agréphagie	Agrégats protéiques	p62, NBR1, OPTN
Péxophagie	Péroxisomes	NBR1, p62
Xénophagie	Pathogène	p62, NDP52, OPTN
Ferritinophagie	Ferritine	NCOA4
Glycophagie	Glycogène	Stbd1
Réticulophagie	Réticulum endoplasmique	FAM134B
Lipophagie	Goutelettes lipidiques	?
Ribophagie	Ribosomes	Ubp3 (levure)
Lysophagie	Lysosomes	p62

Figure 14 : Mécanisme de l'autophagie sélective. Les récepteurs autophagiques (protéines adaptatrices) permettent la sélectivité de l'autophagie. A. Le cargo à dégrader est reconnu par des récepteurs autophagiques spécifiques. Les protéines réceptrices possèdent, d'une part, des domaines de liaison aux cargos soit i) dépendant de l'ubiquitine appelé alors UBD (ubiquitin binding domain) reconnaissant l'ubiquitine sur le cargo ou soit ii) indépendant de l'ubiquitine reconnaissant directement le cargo et, d'autre part, un domaine d'interaction avec les protéines ATG8 (domaine AIM/LIR (ATG8-interacting motif/LC3 interaction motif)) qui sont ancrées à la membrane des autophagosomes par une phosphatidyléthanolamine. La double interaction des récepteurs cargo permet le recrutement de la machinerie autophagique sur le cargo à dégrader par le phagophore. B. Tableau listant les principaux récepteurs pour chaque type d'autophagie sélective.

1.4.3. La mitophagie

La mitophagie permet la dégradation sélective des mitochondries et est un processus essentiel pour permettre l'élimination des mitochondries endommagées ou en trop grande quantité dans la cellule. Ce phénomène présente également un rôle physiologique en permettant l'élimination des mitochondries, des érythrocytes matures et des mitochondries présentes dans les spermatozoïdes après la fécondation (Ashrafi & Schwarz, 2013).

1.4.3.1. La mitophagie dépendante de la voie PINK1/Parkin

La voie PINK1/Parkin de la mitophagie est la voie la plus caractérisée chez les mammifères permettant la dégradation des mitochondries. PINK1 est une protéine kinase à activité Sérine/thréonine kinase. Cette protéine est régulée par autophosphorylation au niveau

des sérines S228 et S402 (Aerts *et al*, 2015). La protéine Parkin est aussi impliquée dans cette voie par l'intermédiaire de son activité E3-ubiquitine ligase (Riley *et al*, 2013). Lorsque la mitochondrie est endommagée, cela provoque une perte du potentiel membranaire entre la membrane interne et externe (Kondapalli *et al*, 2012; Narendra *et al*, 2010b). Lorsque les mitochondries sont saines, PINK1 est normalement transloquée de la membrane externe de la mitochondrie à la matrice mitochondriale. Lors de la perte du potentiel membranaire mitochondrial, PINK1 va s'accumuler au niveau de la membrane externe et va s'activer par autophosphorylation (Kondapalli *et al*, 2012; Narendra *et al*, 2010b). La protéine PINK1 va ensuite phosphoryler différents substrats tels que l'ubiquitine (Résidu S65) ou la Parkin (Résidu S65) qu'elle recrute (Kondapalli *et al*, 2012; Kane *et al*, 2014). La phosphorylation de Parkin entraîne son activation (Kondapalli *et al*, 2012). La protéine PINK1 peut également phosphoryler des résidus ubiquitines (serine S65) de protéines associées à la membrane externe de la mitochondrie (Kane *et al*, 2014). L'ubiquitine phosphorylée sert de substrat à la protéine Parkin activée (Trempe *et al*, 2013). La protéine Parkin agit alors comme un amplificateur en ajoutant des ubiquitines aux protéines de la membrane externe. Ces substrats ubiquitinylés sont ensuite reconnus par des récepteurs cargos comme le NDP52 ((Nucler Dot protein 52), l'Optineurine (OPTN) ou le p62 (Figure 15) (Sekine & Youle, 2018; Lazarou *et al*, 2015; Wong & Holzbaur, 2014; Narendra *et al*, 2010a). Ces récepteurs sont aussi en interaction directe avec toutes les protéines ATG8-II permettant leur ancrage aux phagophores par l'intermédiaire du motif LIR (Johansen & Lamark, 2019). Cependant, seul le récepteur NDP52 interagit uniquement avec LC3C au cours de la dégradation des pathogènes par xénophagie (von Muhlinen *et al*, 2012). De plus, parmi toutes les protéines ATG8, la sous-famille GABARAP semble jouer un rôle prédominant dans la mitophagie dépendante de PINK1/Parkin (Nguyen *et al*, 2016). Par ailleurs, le récepteur NBR1 semble pouvoir aussi intervenir dans la dégradation des mitochondries exposant des résidus ubiquitinylés. Toutefois, il interviendrait indépendamment de la voie PINK1/Parkin (Shi *et al*, 2015; Kirkin *et al*, 2009a).

Les récepteurs cargos peuvent subir des modifications post-traductionnelles. Ils peuvent interagir avec TBK1 et être phosphorylés par cette kinase qui est activée à la suite de dommages mitochondriaux. Cette phosphorylation augmenterait l'affinité des récepteurs cargos pour des substrats ubiquitinylés. dans la cellule (Richter *et al*, 2016; Matsumoto *et al*, 2015).

D'autres études semblent remettre en question le fonctionnement de la mitophagie PINK1/Parkin dépendante. Dans ce mécanisme, la biogénèse des autophagosomes débiterait à la surface des mitochondries plutôt que par le recrutement de membranes isolées préformées *via* la protéine ATG9A (voir chapitre 1/1.3.3.3. *La protéine transmembranaire ATG9A et*

régulation de la phase d'élongation du phagophore) (Itakura *et al*, 2012a; Lazarou *et al*, 2015). En effet, dans ce modèle, les vésicules contenant ATG9A seraient recrutées directement au niveau des mitochondries endommagées au début de la mitophagie, après l'étape d'ubiquitinylation des protéines de la membrane externe des mitochondries (Itakura *et al*, 2012a). L'autophagosome se formerait alors directement autour des mitochondries endommagées et non au site d'initiation du phagophore. De plus, les récepteurs OPTN et NDP52 interviendraient aussi dans le mécanisme initiant la biogénèse des autophagosomes en favorisant le recrutement du complexe ULK1 au niveau des mitochondries endommagées (Lazarou *et al*, 2015; Wong & Holzbaur, 2014). Toutefois, le recrutement de ATG9A semble indépendant du recrutement du complexe ULK1 à la mitochondrie mais, par contre, ces deux protéines doivent être recrutées pour permettre la dégradation des mitochondries endommagées (Itakura *et al*, 2012a).

Mitophagie dépendante de l'ubiquitine : la voie PINK1/Parkin

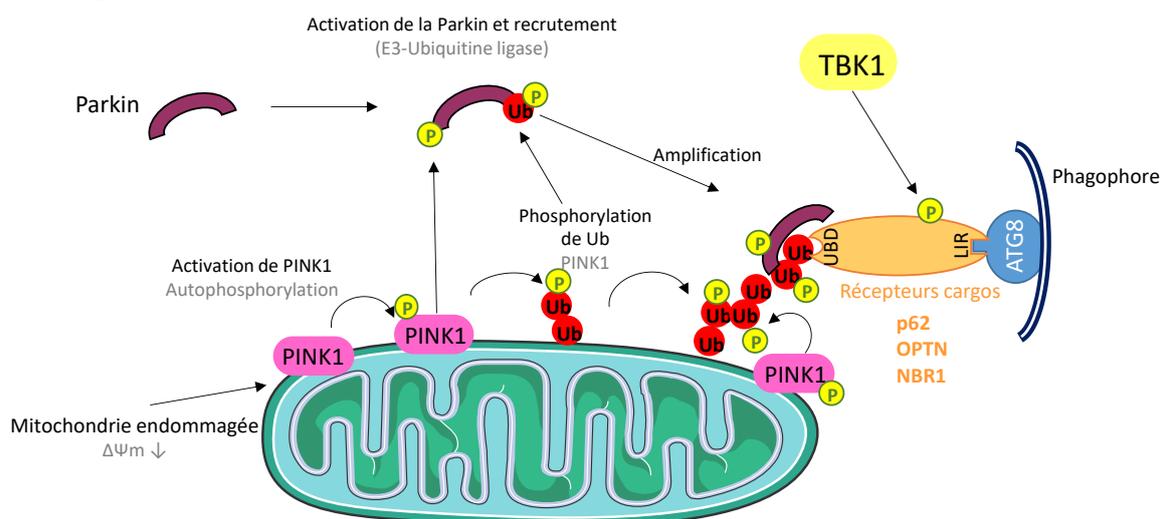


Figure 15 : Mitophagie dépendante de l'ubiquitine, la voie PINK1/Parkin. Lorsque les mitochondries sont endommagées, cela peut s'accompagner d'une dépoliarisation mitochondriale avec un changement de potentiel membranaire mitochondriale ($\Delta\Psi_m$). Cette dépoliarisation mitochondriale entraîne l'accumulation de PINK1 au niveau de la membrane externe de la mitochondrie coté cytosolique. La protéine PINK1 s'active alors par autophosphorylation. PINK1 phosphorylée phosphoryle ensuite d'autres substrats tels que la protéine Parkin ou des résidus ubiquitinylés de protéines. Parkin phosphorylée s'active et utilise les ubiquitines phosphorylées comme substrat pour les déplacer sur d'autres résidus ubiquitinylés sur des protéines mitochondriales afin d'amplifier le signal d'ubiquitinylation. Ces protéines poly-ubiquitinylées sont reconnues par les récepteurs cargos. En effet, c'est grâce à leur domaine UBD (ubiquitin-binding domain) qu'ils reconnaissent les motifs ubiquitines des protéines mitochondriales. Les récepteurs cargos possèdent aussi un motif LIR qui leur permet d'être en interaction directe avec les protéines ATG8 permettant leur ancrage à la membrane du phagophore pour être dégradé. De plus, les récepteurs cargos p62, OPTN (OPTINEURINE) et NBR1 (neighbour of BRCA1) impliqués dans la mitophagie peuvent aussi être phosphorylés par la kinase TBK1 qui est activée lors de dommages mitochondriaux. La phosphorylation de ces récepteurs pourrait augmenter leur affinité pour l'ubiquitine ce qui augmenterait la dégradation sélective des mitochondries.

1.4.3.2. La mitophagie indépendante de PINK1/Parkin : les récepteurs spécifiques

La mitophagie peut également se produire indépendamment de PINK1/Parkin. Les mitochondries sont reconnues directement par des récepteurs autophagiques qui sont recrutés par les protéines ATG8 (Figure 14A). Les récepteurs cargos décrits dans la littérature sont les protéines NIX (BNIP3-Like) (Novak *et al*, 2010), BNIP3 (Bcl2/E1B 19 kDa-interacting protein 3-like protein) (Zhu *et al*, 2013) et FUNDC1 (FUN14-domain containing protein 1) (Liu *et al*, 2012). Ces récepteurs, possèdent un domaine LIR permettant leur interaction avec les protéines ATG8. Le récepteur NIX joue un rôle dans la maturation des érythrocytes en permettant l'élimination des mitochondries (Schweers *et al*, 2007; Sandoval *et al*, 2008). BNIP3 et FUNDC1, à la suite de modifications post-traductionnelles, interviendraient dans l'induction de la mitophagie. En effet, FUNDC1 est déphosphorylée et BNIP3 est phosphorylée lors d'une diminution du potentiel membranaire ou d'une hypoxie (Liu *et al*, 2012; Zhu *et al*, 2013). Concernant l'interaction de ces récepteurs cargos avec les protéines ATG8 (Figure 16), NIX interagirait avec toutes les protéines LC3/GABARAP mais plus faiblement avec LC3B (Novak *et al*, 2010) ; tandis que FUNDC1 et BNIP3 interagiraient préférentiellement avec LC3B (Lv *et al*, 2017; Hanna *et al*, 2012). Enfin, une autre protéine AMBRA1 pourrait se localiser à la membrane externe de la mitochondrie et interagir avec LC3 ce qui lui permettrait d'intervenir dans la mitophagie de façon indépendante de la voie PINK1/Parkin ou bien de façon dépendante de la voie PINK1/Parkin (Strappazzon *et al*, 2015).

Mitophagie médiée par des récepteurs

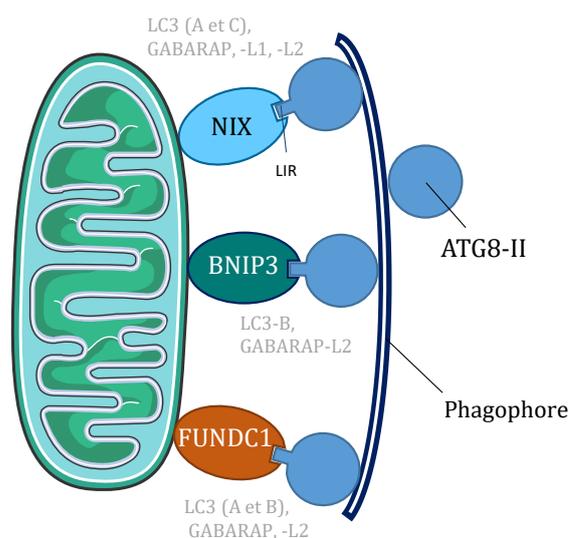


Figure 16 : Mitophagie médiée par des récepteurs indépendants de l'ubiquitine. La mitophagie est la dégradation sélective des mitochondries. Les mitochondries endommagées sont reconnues par des récepteurs autophagiques cargos incluant Nix, BNIP3 et FUNDC1 (FUN14-domain containing protein 1). Les récepteurs cargos possèdent aussi un motif LIR qui leur permettent d'interagir avec les protéines ATG8 sous leur forme lipidée permettant leur ancrage à la membrane du phagophore pour être dégradés. Les motifs LIR peuvent être reconnus par différentes protéines ATG8 et les interactions préférentielles sont annotées en gris.

1.4.4. L'agréphagie

L'agréphagie est la dégradation sélective de substrats protéiques sous forme d'agrégats protéiques. Il s'agit d'un processus continu dans les cellules. L'accumulation de ces agrégats protéiques, aussi nommés corps d'inclusion, est particulièrement observée dans les maladies neurodégénératives. En effet, différentes protéines telles que les protéines β -amyloïdes (Pickford *et al*, 2008), la protéine huntingtin (HTT) (Ravikumar *et al*, 2004) et l' α -synucléine (Winslow *et al*, 2010) sont capables de former des agrégats protéiques et semblent être des substrats de l'agréphagie. Ainsi, dans la maladie d'Alzheimer, l'accumulation de plaques β -amyloïde est la cause de la démence et cette accumulation semble due à un défaut de dégradation de ces protéines, notamment par la voie autophagique (Pickford *et al*, 2008; Malampati *et al*, 2020). De la même façon, la maladie de Huntington est due à une répétition du trinuécléotide CAG causant une expansion anormale de la chaîne de poly-glutamine de la protéine HTT, provoquant l'agrégation de cette protéine au niveau des corps d'inclusion (Finkbeiner, 2011). En effet, des études *in vitro* menées dans une lignée de mammifères surexprimant la protéine HTT103Q montre que cette protéine est présente sous forme de corps d'inclusion au niveau des autophagosomes (Filimonenko *et al*, 2010).

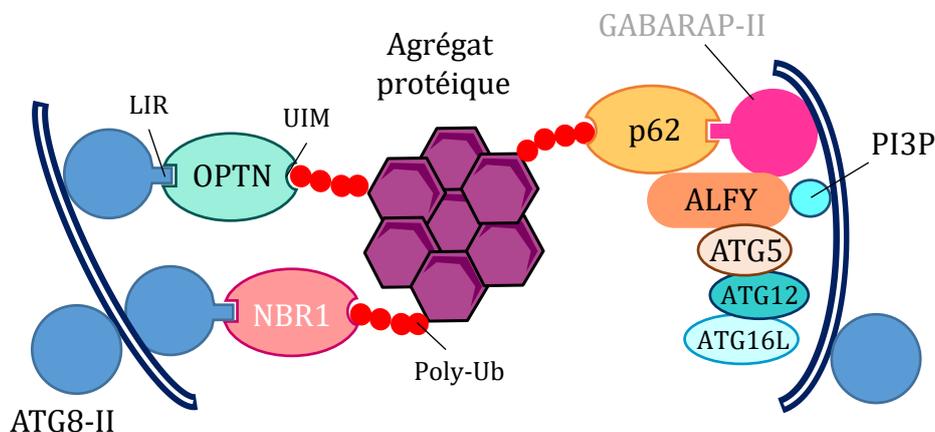


Figure 17 : Mécanisme de l'agréphagie. L'agréphagie est la dégradation sélective des agrégats protéiques. Les agrégats protéiques ubiquitinylés peuvent être reconnus par les récepteurs autophagiques p62, OPTN (OPTINEURINE) et NBR1 (neighbour of BRCA1) grâce à leur domaine de reconnaissance de l'ubiquitine (UBD). Les récepteurs cargos possèdent un motif LIR (LC3 interaction motif) permettant la reconnaissance des protéines par les protéines ATG8-II. Lorsque p62 est recrutée par GABARAP-II, la protéine ALFY permet d'augmenter l'ancrage des agrégats protéiques à la membrane des autophagosomes. En effet, la protéine ALFY est capable d'interagir à la fois avec les protéines p62, les membres de la sous-famille GABARAP, le PI3P et la protéine ATG5. Le recrutement de ATG5 permettrait le recrutement du complexe ATG5-ATG12-ATG16L1 à la membrane du phagophore. Le recrutement de ces différents acteurs autour du cargo protéique à dégrader faciliterait la lipidation des ATG8 à la membrane des autophagosomes et donc la dégradation de ses agrégats protéiques par autophagie.

Les substrats protéiques à dégrader doivent être poly-ubiquitylés pour pouvoir être reconnus de façon spécifique par les récepteurs autophagiques (Kirkin *et al*, 2009b). Les trois principaux récepteurs qui sont impliqués dans la dégradation sélective des agrégats protéiques poly-ubiquitylés sont les mêmes récepteurs autophagiques qui interviennent dans la mitophagie : p62 (Pankiv *et al*, 2007), OPTN (Shen *et al*, 2015) et NBR1 (Kirkin *et al*, 2009a). Par exemple, le récepteur cargo p62 est capable de se lier aux protéines ubiquitylées, et pourrait former de plus gros agrégats protéiques grâce à son domaine PB1 (Phox and Bem1p) (Pankiv *et al*, 2007). En effet, le domaine PB1 de p62 lui permet de se polymériser pour former des agrégats protéiques (Sumimoto *et al*, 2007). En plus du récepteur autophagique p62, une autre protéine, la protéine ALFY (WDFY3), sert d'échafaudage dans l'agrégation (Filimonenko *et al*, 2010). Elle serait recrutée grâce à son interaction avec la protéine p62 (Clausen *et al*, 2010) et interagirait avec *i*) la protéine ATG5 qui recruterait elle-même les protéines ATG12 et ATG16L pour former le complexe ATG5-ATG12-ATG16L (Filimonenko *et al*, 2010), *ii*) avec les membres de la sous-famille GABARAP (Lystad *et al*, 2014) et aussi *iii*) avec le PI3P (Simonsen *et al*, 2004). Le recrutement de ces différentes protéines autour de l'agrégat protéique à dégrader faciliterait la lipidation des ATG8 à la membrane des autophagosomes et donc la dégradation de ces agrégats protéiques par autophagie (Figure 17) (Clausen *et al*, 2010; Filimonenko *et al*, 2010).

1.4.5. La xénophagie

La xénophagie regroupe la dégradation sélective de différents pathogènes intracellulaires incluant les bactéries (Jo *et al*, 2013), les virus (Jackson, 2015), les champignons (Pinan-Lucarré *et al*, 2005) ou les parasites (Andrade *et al*, 2006). Ce type d'autophagie joue un rôle important dans le processus d'immunité innée contre les pathogènes. En effet, les pathogènes séquestrés par les autophagosomes peuvent être efficacement dégradés après la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Deretic, 2011; Gatica *et al*, 2018). Ainsi, certains pathogènes ont développé des mécanismes de défense pour limiter leur dégradation par xénophagie, incluant l'échappement aux autophagosomes/lysosomes et la production de protéines inhibitrices de l'autophagie (Deretic, 2011). Au niveau du mécanisme, l'ubiquitylation de protéines bactériennes/virales et leur reconnaissance par les récepteurs cargos jouent, comme dans l'agrégation, un rôle essentiel. Les récepteurs autophagiques impliqués dans la xénophagie : p62, NDP52, OPTN (Wild *et al*, 2011) et TAX1BP1 (Tax1 Binding Protein 1). Ils interagissent avec toutes les protéines LC3/GABARAP par le domaine LIR, sauf pour le récepteur autophagique NDP52 (von Muhlinen *et al*, 2012). En effet, NDP52 possède un motif LIR non-canonique appelé CLIR pour « LC3C interaction motif ». Ce CLIR lui permet

d'interagir avec LC3C spécifiquement (Boyle & Randow, 2013). De plus, NDP52 possède aussi un motif de reconnaissance à la Galectine 8 présente sur certains pathogènes. Cette reconnaissance permet l'activation de la xénophagie indépendamment de la reconnaissance de l'ubiquitine (Thurston *et al*, 2012).

2. Rôle de l'autophagie dans le cancer

L'autophagie est impliquée dans plusieurs processus biologiques et sa dérégulation peut être associée à différentes pathologies telles que des maladies neurodégénératives (Pickford *et al*, 2008; Martinez-Vicente *et al*, 2010; Finkbeiner, 2011) et le cancer. Cependant, le rôle de l'autophagie dans le cancer est complexe car elle peut avoir un rôle pro- ou anti-tumoral dépendant du type cellulaire et/ou du stade de la tumeur. Dans les premiers stades de la tumorigenèse, l'autophagie aurait plutôt un rôle suppresseur de tumeur en maintenant l'intégrité du génome, pour prévenir les dommages de l'ADN, en prévenant l'inflammation pouvant être à l'origine de la carcinogenèse et en jouant un rôle de défense contre les pathogènes carcinogènes. L'autophagie peut également avoir une fonction anti-tumorale en favorisant la mort des cellules cancéreuses par autophagie (mort cellulaire programmée de type II). L'autophagie aurait également un rôle inhibiteur sur la prolifération cellulaire en intervenant dans la dégradation de protéines clés de la division cellulaire. Au contraire, dans les stades plus tardifs de la carcinogenèse, lorsque les tumeurs sont établies, l'autophagie aurait un rôle pro-tumoral en aidant les cellules tumorales à survivre dans un microenvironnement hostile (Bishop & Bradshaw, 2018) (Figure 18). En effet, du fait d'un manque de vascularisation au sein de la tumeur, les cellules tumorales peuvent se retrouver en hypoxie limitant ainsi leur apport en nutriments et en énergie. Dans ces conditions d'hypoxie, l'autophagie peut être induite et permettre aux cellules tumorales de maintenir une activité métabolique nécessaire à leur prolifération (Degenhardt *et al*, 2006).

Nous décrivons les principaux rôles anti- et pro-tumoraux que l'autophagie peut avoir au cours de la tumorigenèse et de la carcinogenèse.

2.1. Rôle antitumoral de l'autophagie

2.1.1. Rôle antitumoral des protéines de l'autophagie

L'autophagie a d'abord été décrite comme un mécanisme suppresseur de tumeur. En effet, certaines études ont montré une diminution de l'expression des gènes de l'autophagie

dans certains cancers suggérant un rôle suppresseur de tumeur. Les premières études ont ainsi montré une perte monoallélique du gène *BECLIN1*, situé sur la région chromosomique 17q21, dans 40 à 75 % des cancers de la prostate, des ovaires ou du sein (Saito *et al*, 1993; Gao *et al*, 1995; Aita *et al*, 1999). De manière similaire, il a été décrit que *BECLIN1* était faiblement exprimée dans des tissus de cancers gastriques (Yu *et al* 2016), de cancers hépatiques (Qiu *et al*, 2014), dans des lignées de cancers colorectaux (Koneri *et al*, 2007), dans des lignées de cancers cervicaux (Wang *et al*, 2007) et dans des glioblastome (Huang *et al*, 2010). De plus, il a été montré qu'une diminution de l'autophagie, liée à une diminution du taux des protéines LC3 et *BECLIN1*, pouvait être impliquée dans le processus de tumorigenèse et le développement de cancers des cellules épithéliales de l'ovaire (Shen *et al*, 2008). D'autre part, des études chez des souris présentant une délétion monoallélique du gène *Beclin1* ont montré que ces souris développaient plus fréquemment des tumeurs spontanées au niveau du foie et du sein (Qu *et al*, 2003; Yue *et al*, 2003). Au contraire, une surexpression de *BECLIN1* dans des lignées de cancer du sein MCF-7 stimule l'autophagie et peut limiter le développement tumoral de cette lignée *in vivo* (Liang *et al*, 1999). Ces données suggèrent que *Beclin1* est un gène suppresseur de tumeur haplo-insuffisant (Yue *et al*, 2003).

Au niveau du mécanisme, il a été montré que *BECLIN1* induit l'autophagie par liaison et activation de la kinase VPS34 dans le complexe PI3KC3 grâce à un domaine ECD (evolutionary conserved domain). En effet, lorsque des souris SCID (severe-combined immunodeficiency) reçoivent une xélogreffe de cellules MCF-7 exprimant la protéine *BECLIN1* sauvage, entre 0 et 10 % des souris développent des tumeurs alors que, dans le cas des xélogreffes de cellules MCF-7 exprimant la protéines *BECLIN1* délétée de son domaine ECD, entre 40 et 80 % des souris développent des tumeurs (Furuya *et al*, 2005).

Un autre mécanisme, faisant intervenir les protéines UVRAG et Bif-1 (Bax-interacting factor 1), a également été décrit et pourrait expliquer le rôle suppresseur de tumeur de la protéine *BECLIN1*. En effet, Bif-1 interagit indirectement avec *BECLIN1* par l'intermédiaire de UVRAG et régule positivement l'autophagie en modulant l'interaction de *BECLIN1* avec VPS34 (Takahashi *et al*, 2007). En effet, les souris *Bif-1*^{-/-} présentent une incidence plus élevée de tumeurs comparativement aux souris sauvages (Takahashi *et al*, 2007). De plus, une mutation ou une délétion monoallélique du gène *UVRAG* et une diminution de l'expression de BIF-1 ont été mises en évidence dans différents types de cancers, comme le cancer du côlon (Ionov *et al*, 2004; Coppola *et al*, 2008a), de l'estomac (Kim *et al*, 2008; Lee *et al*, 2006), du sein (Bekri *et al*, 1997) et de la prostate (Coppola *et al*, 2008b).

Par ailleurs, la mutation du gène *BECLIN1* peut également jouer un rôle dans la sensibilité des cellules tumorales aux chimiothérapies. Par exemple, la diminution de

l'expression de BECLIN1 par interférence à l'ARN dans des cellules d'hépatocarcinomes cellulaires (HCC) augmente la sensibilité de ces cellules aux chimiothérapies. Par contre, l'autophagie était induite dans ces cellules tumorales par hypoxie et entraînait leur résistance aux chimiothérapies (Song *et al*, 2009).

L'implication d'autres acteurs de l'autophagie suggère aussi un rôle suppresseur de tumeur de l'autophagie. En effet, la délétion monoallélique des gènes *Atg5* ou *Atg7* au niveau du foie chez la souris entraîne l'apparition spontanée de tumeurs bénignes hépatiques n'évoluant pas en cancer (Takamura *et al*, 2011; Inami *et al*, 2011). L'apparition de ces tumeurs serait due à une inhibition de l'autophagie qui entraînerait une accumulation de mitochondries endommagées (Takamura *et al*, 2011). Ces données suggèrent que la perte des gènes *Atg5* ou *Atg7* puisse contribuer à l'initiation de la tumorigenèse, sans que cela soit suffisant pour entraîner la progression tumorale.

Enfin, l'accumulation de p62 à cause d'un déficit de la machinerie autophagique est observée dans différents types de cancers (Mathew *et al*, 2009; Su *et al*, 2005; Kitamura *et al*, 2006; Valencia *et al*, 2014; Saito *et al*, 2016). Cette surexpression de p62 sous forme d'agrégats protéiques est impliquée dans la promotion de la tumorigenèse. Plusieurs mécanismes peuvent expliquer cette promotion comme la dérégulation de la voie de signalisation NF- κ B, le stress oxydatif avec l'accumulation de ROS et l'augmentation des dommages à l'ADN (Mathew *et al*, 2009).

L'ensemble de ces données suggère que l'autophagie limite la tumorigenèse et que son inhibition peut donc conduire à l'apparition de cancers.

2.1.2. Maintien de l'intégrité du génome et prévention des stress

Le stress oxydatif dans les cellules provoque la production d'espèces réactives de l'oxygène, les ROS comme les radicaux libres et le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂). Les ROS sont néfastes pour la cellule car ils peuvent entraîner des dommages cellulaires au niveau des organites comme les mitochondries et au niveau de l'ADN. Le stress oxydant peut aussi induire l'autophagie soit par la voie PERK-eIF2 α -ATF4-CHOP ou soit par la voie des MAPK *via* la protéine JNK1 (c-Jun N-terminal kinase1) (Wei *et al*, 2008; Son *et al*, 2011). Cette induction de l'autophagie permettrait de lutter contre l'accumulation des ROS dans la cellule et de maintenir ainsi l'intégrité du génome (Filomeni *et al*, 2015). En effet, dans deux modèles différents de cellules immortalisées présentant une délétion monoallélique de *Beclin1*, iMMEC (cellules mammaires de souris immortalisées) (Kongara *et al*, 2010) et iBMK (cellules rénales de souris immortalisées) (Mathew *et al*, 2009), les auteurs de ces études ont mis en évidence une

diminution de l'autophagie et une augmentation du niveau de ROS. L'accumulation des ROS contribue à l'induction de dommages à l'ADN et favorise l'instabilité génomique (Kongara *et al*, 2010; Mathew *et al*, 2009, 2007; Karantza-Wadsworth *et al*, 2007). Ces données suggèrent donc un lien entre une autophagie défectueuse et le potentiel tumorigène des cellules.

D'autres études montrent que l'autophagie pourrait aussi avoir un rôle dans la progression tumorale (Mathew *et al*, 2009; Karantza-Wadsworth *et al*, 2007; Mathew *et al*, 2007) (Figure 18). Ce mécanisme pourrait être lié à la dérégulation de p62 en lien avec le déficit autophagique. En effet, la dérégulation de p62 liée à un déficit d'autophagie est associée à une accumulation de ROS, à l'augmentation des dommages à l'ADN et à la dérégulation de la voie NF- κ B (Mathew *et al*, 2009). L'accumulation intracellulaire de p62 semble empêcher l'activation de la voie NF- κ B qui expliquerait en partie l'augmentation de la production de ROS (Mathew *et al*, 2009). Cette accumulation de p62, par diminution de l'autophagie, entraîne également l'activation de NRF2 (nuclear factor erythroid-2-like 2), une protéine régulatrice de la défense antioxydante (Taguchi *et al*, 2011). En effet, l'accumulation intracellulaire de p62 entraîne un changement conformationnel de la protéine KEAP1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) en se fixant au domaine DC de cette protéine. Cela entraîne la libération, la stabilisation et la translocation de NRF2 dans le noyau (Taguchi *et al*, 2011). Ce facteur va ensuite activer la transcription de gènes codant des protéines impliquées dans la réponse antioxydante (Cytochrome P450 oxydoreductase, glutathione S-trasférase), mais aussi de gènes codant des protéines impliquées dans les dommages à l'ADN (OGG1 (8-oxoguanine glycosylase) et 53BP1 (p53 binding protein 1)) (Kim *et al*, 2012; Singh *et al*, 2013; He *et al*, 2020). De plus, la stabilisation de NRF2 dans le noyau entraîne aussi la transcription de gènes cibles de NRF2, incluant p62, entraînant un rétrocontrôle positif augmentant la synthèse de ROS (Jain *et al*, 2010; Komatsu *et al*, 2010; Lau *et al*, 2010; Mathew *et al*, 2009). Inami et collaborateurs (Inami *et al*, 2011) décrivent également qu'une activation continue de NRF2 due à l'accumulation de p62 entraîne la formation d'adénomes hépatiques chez des souris déficientes pour ATG7. Cependant, la perte combinée de *Atg7* et *p62* limite l'activation de la voie NRF2 (Inami *et al*, 2011; Komatsu *et al*, 2007). Ces données suggèrent un rôle important de l'accumulation de p62 dans l'activation de la voie NRF2 et dans la tumorigenèse hépatocellulaire. En effet, la délétion du gène *p62* dans une lignée de carcinome hépatocellulaire humaine diminue la capacité de ces cellules à former des colonies indépendamment de l'ancrage. Ces cellules sont aussi incapables d'activer la voie NRF2 (Inami *et al*, 2011).

L'autophagie a donc un rôle suppresseur de tumeur en maintenant un niveau physiologique de ROS intracellulaires et en prévenant l'accumulation de p62.

2.1.3. Inhibition de l'inflammation et de la nécrose

L'inflammation chronique peut entraîner la mise en place d'un microenvironnement inflammatoire, l'activation d'oncogènes et de la néoplasie favorisant ainsi le développement de la tumeur (Mantovani *et al*, 2008; Hanahan & Weinberg, 2011) (Figure 18). Ce microenvironnement inflammatoire favorise l'enrichissement du milieu extracellulaire en facteurs de survie, de croissance, en facteurs pro-angiogéniques, en cytokines et en cellules immunitaires telles que les macrophages associés aux tumeurs (TAM) M2 facilitant la progression tumorale (sécrétion de facteurs pro-angiogéniques par exemple) (Grivennikov *et al*, 2010). La présence d'un environnement inflammatoire active la mise en place de l'inflammasome impliqué dans la réponse immunitaire. L'inflammasome permet la maturation de cytokines pro-inflammatoires comme les interleukines IL-1 β et IL-18, augmentant l'inflammation. L'autophagie pourrait limiter la survenue de tumeurs en inhibant l'inflammation et en régulant l'inflammasome (Zhong *et al*, 2016; Rodgers *et al*, 2014). En effet, l'induction de l'inflammasome à AIM2 (absent in melanoma 2 (Interferon-inducible protein)) ou à NLRP3 (« NOD-like receptor family, pyrin domain containing 3 » ou CIAS1) dans les macrophages par des signaux inflammatoires active l'autophagie et le blocage de l'autophagie potentialise l'activation de l'inflammasome (Shi *et al*, 2012). Ainsi, l'inflammasome peut être ubiquitinyllé et cette ubiquitinylation permet le recrutement du récepteur autophagique p62 au sein du complexe de l'inflammasome permettant sa dégradation et limitant ainsi la production de IL-1 β (Shi *et al*, 2012). L'autophagie peut aussi réguler la sécrétion de IL-1 β indépendamment de l'inflammasome en dégradant directement, par la voie autophagique, la pro-IL-1 β (Harris *et al*, 2011). De façon inverse, l'inactivation de l'autophagie par invalidation d'*Atg16L1* dans des macrophages active l'inflammasome et conduit à la maturation de l'IL-1 β et de l'IL-18 (Saitoh *et al*, 2008).

La mort cellulaire par nécrose est plutôt considérée comme pro-inflammatoire, puisqu'elle entraîne la libération de molécules pro-inflammatoire dans le microenvironnement tumoral. Les tumeurs déficientes en autophagie présentent un taux élevé de nécrose et d'inflammation suggérant que l'autophagie limiterait l'inflammation et le développement tumoral (White *et al*, 2010). En effet, l'inhibition de l'autophagie dans des cellules épithéliales immortalisées déficientes en apoptose entraîne la nécrose de ces cellules, une inflammation chronique visible par une infiltration plus élevée de macrophage, une production de cytokines et une activation de la voie NF- κ B. L'ensemble de ces facteurs conduit alors à la tumorigenèse (Degenhardt *et al*, 2006). Il a aussi été montré, dans des souris mutées pour l' α -1-antitrypsin – une mutation responsable d'une maladie chronique du foie –, que l'autophagie pouvait inhiber

la carcinogénèse au niveau du foie en éliminant les agrégats de cette protéine mutée (Perlmutter, 2009).

2.1.4. Induction de la sénescence par un oncogène

La sénescence induite par un oncogène (oncogene induced senescence, OIS) est un mécanisme potentiellement suppresseur de tumeur puisqu'elle permet un arrêt permanent du cycle cellulaire des cellules exprimant un oncogène (Figure 18, (Zhong *et al*, 2016)). Pour promouvoir la tumorigénèse, ce mécanisme est souvent inhibé pour permettre la transformation cellulaire et la prolifération cellulaire. L'autophagie est activée durant l'OIS et certains gènes liés à l'autophagie se trouvent aussi régulés positivement lors de ce mécanisme (Young *et al*, 2009). De plus, une inhibition de l'autophagie par l'extinction des gènes *ATG5* et *ATG7* par shRNA retarde le phénotype de sénescence induit par l'oncogène RAS. Dans ce cas, les auteurs ont observé un retard de sécrétion des cytokines IL-6, IL-8 et une diminution de SA- β -Gal (senescence-associated β -galactosidase), un marqueur de la nécrose cellulaire (Young *et al*, 2009). De façon similaire, l'inactivation de l'expression du gène d'*ATG5* dans un modèle de tumorigénèse de mélanome cutané (mélanocytes normaux transduits par Braf) contribue au développement tumoral en diminuant la sénescence induite par l'oncogène Braf (Liu *et al*, 2013a). L'ensemble de ces données suggère un rôle de l'autophagie dans la synthèse de protéines impliquées dans la sénescence. L'activation de l'autophagie pourrait ainsi limiter la tumorigénèse en permettant l'OIS.

2.1.5. Induction de la mort cellulaire par autophagie

L'élimination des cellules cancéreuses peut également se faire par mort cellulaire autophagique, qui est une mort cellulaire programmée de type II. Cette mort par autophagie (ACD, autophagic cell death) intervient lors d'un stress cellulaire important qui conduit à des dégradations cellulaires irréversibles et qui induit la mort cellulaire. Certains traitements anti-cancéreux ont pour but de provoquer une mort cellulaire par autophagie. Par exemple, il a été montré que le trioxyde d'arsenic (As_2O_3) pouvait entraîner une ACD dans des lignées cellulaires leucémiques et dans les progéniteurs AML (acute myeloid leukemia) (Goussetis *et al*, 2010; Qian *et al*, 2007). Cette ACD peut être bloquée lorsque l'autophagie est inhibée en supprimant l'expression de BECLIN1 et d'*ATG7* (Goussetis *et al*, 2010). De plus, la surexpression de BECLIN1 en utilisant des adénovirus oncolytiques est capable d'induire une ACD *in vitro* dans des lignées cellulaires leucémiques et *in vivo* dans des xéno greffes sur des souris (Tong *et al*, 2013).

2.1.6. L'autophagie dans l'immunité antitumorale

En plus du rôle dans la prévention de la tumorigenèse, l'autophagie aurait également un rôle important dans l'immunité adaptative antitumorale et dans l'immunosurveillance des cancers. En effet, il semblerait que l'autophagie puisse être associée à une mort immunogène (ICD, immunogenic cell death) des cellules cancéreuses qui est justement recherchée en immunothérapie des cancers pour aider le système immunitaire à détecter et éliminer les cellules cancéreuses. Lors de la mort immunogène des cellules cancéreuses, les cellules vont relarguer des molécules appelées DAMP (Damage-associated molecular pattern) capables de stimuler le système immunitaire (Kroemer *et al*, 2013). Parmi les DAMP observés pendant la mort immunogène, on trouve (1) l'ATP sécrété dans le milieu extracellulaire (Ghiringhelli *et al*, 2009), (2) l'HMGB1 (high-mobility group protein B1), une protéine nucléaire sécrétée dans le milieu extracellulaire (Apetoh *et al*, 2007), (3) la calréticuline exposée à la surface des cellules cancéreuses (Obeid *et al*, 2007), (4) les HSP 70 et 90, des protéines chaperons HSP (Krysko *et al*, 2012) et (5) l'IFN- γ , sécrété dans le milieu extra-cellulaire (Sistigu *et al*, 2014). Ces DAMP sont particulièrement importantes pour recruter des cellules présentatrices d'antigènes (APC, antigen-presenting cell) au niveau de la tumeur (Krysko *et al*, 2012; Kroemer *et al*, 2013) et favoriser leur maturation.

Parmi les différentes DAMP, l'ATP libéré par les cellules cancéreuses permet d'attirer les cellules immunitaires monocytaires et de provoquer leur maturation en macrophages/cellules dendritiques. L'ATP relargué permettrait aussi d'activer l'inflammasome NLRP3 pour obtenir une réponse cytotoxique des lymphocytes T (LT) CD8⁺ (Ghiringhelli *et al*, 2009). La sécrétion d'ATP serait dépendante de l'autophagie dans la cellule. En effet, l'ATP serait redistribué du lysosome à l'autolysosome, puis sécrété à l'extérieur de la cellule par un mécanisme dépendant de LAMP1 (Martins *et al*, 2014). De plus, l'exposition de la calréticuline à la surface des cellules tumorales permettrait la reconnaissance et la capture de ces cellules par les cellules phagocytaires (Basu *et al*, 2001). Enfin, les HSP 70 et 90 favoriseraient la maturation des APC et permettraient la présentation croisée d'antigènes par ces cellules (Krysko *et al*, 2012).

De plus, pendant l'ICD, les antigènes de tumeurs et les DAMP pourraient se retrouver à l'intérieur des autophagosomes qui seraient ensuite libérés par les cellules tumorales dans le milieu extracellulaire. Ces autophagosomes seraient ensuite capturés par les APC, entraînant l'activation et la présentation croisée des antigènes de tumeurs par ces cellules (Ma *et al*, 2013). L'importance de l'autophagie a été montrée par une étude dans laquelle l'inactivation des gènes *Atg5*, *Atg7* et *Beclin1* a inhibé la sécrétion de DAMP par les cellules tumorales en ICD et atténué l'immunité antitumorale (Michaud *et al*, 2011; Martins *et al*, 2012).

L'autophagie peut aussi favoriser l'immunité antitumorale en augmentant la présentation d'antigènes tumoraux par les molécules du CMH de classe I et II (Dengjel *et al*, 2005; English *et al*, 2009). Le rôle de l'autophagie dans la présentation d'antigènes sera détaillé dans le chapitre suivant.

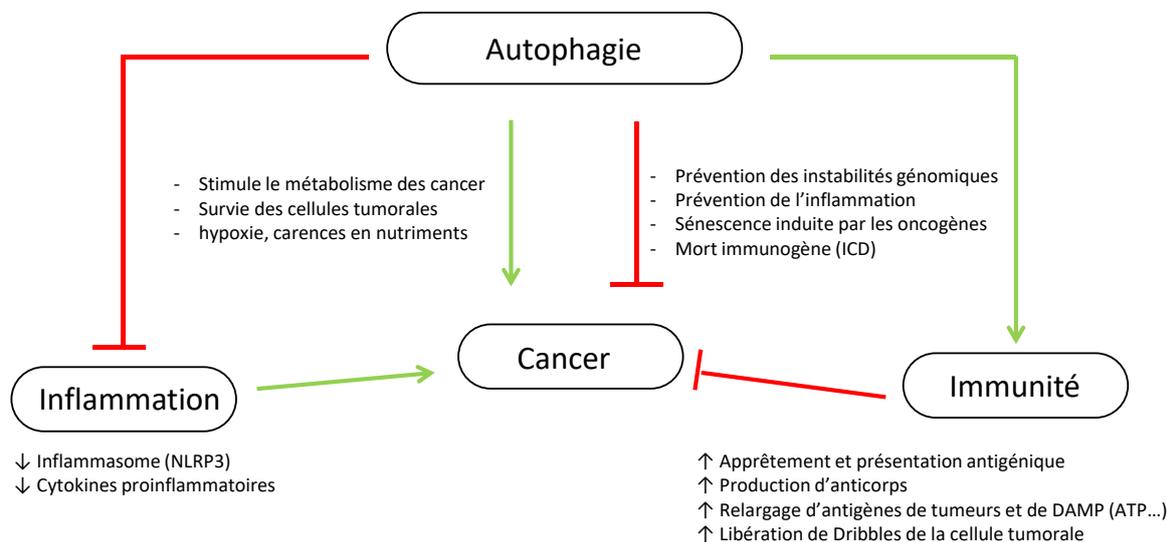


Figure 18 : Rôle de l'autophagie dans le cancer et relation avec l'inflammation et l'immunité. D'après Zhong *et al*, 2016. Les flèches en rouge signifient inhiber et les flèches en verte signifient activer. DAMP : damage-associated molecular pattern, ICD : immunogenic cell death, NLRP3 : nod-like receptor pyrin domain containing protein. 3.

2.2. Rôle pro-tumoral de l'autophagie

Alors qu'une diminution du flux autophagique peut promouvoir la tumorigenèse, l'autophagie semble également nécessaire pour promouvoir la survie et la croissance des cellules tumorales primaires et métastatiques (Barnard *et al*, 2016). Nous avons également décrit précédemment que la perte monoallélique de *BECLIN1* favorisait la tumorigenèse suggérant un rôle antitumoral de la protéine. Mais, *BECLIN1* peut aussi être surexprimée dans des cancers colorectaux, gastriques, du foie, et du sein suggérant cette fois un rôle pro-tumoral de l'autophagie (Koukourakis *et al*, 2010; Ahn *et al*, 2007; Martinez-Vicente *et al*, 2010). L'ensemble de ces données indique donc un rôle double de l'autophagie dans la tumorigenèse et dans la progression tumorale.

2.2.1. Hypoxie et carence nutritive

Les cellules tumorales sont exposées à des conditions stressantes comme l'hypoxie et la carence en nutriments. L'autophagie pourrait avoir un rôle pro-tumoral en luttant contre ce

stress cellulaire. En effet, dans les tumeurs solides, l'autophagie est particulièrement active au centre de la tumeur pour permettre aux cellules de survivre au manque d'oxygène (Degenhardt *et al*, 2006) (Figure 18). Le mécanisme par lequel l'autophagie permettrait la survie des cellules tumorales en hypoxie n'est cependant pas encore déterminé.

De plus, l'autophagie permettrait aussi aux cellules cancéreuses de subvenir à leurs besoins métaboliques et énergétiques pour assurer leur survie et leur prolifération (Rabinowitz & White, 2010). En effet, l'autophagie permet de fournir au cycle de Krebs des acides aminés et de l'acétyl-Coenzyme A par lipophagie (Singh & Cuervo, 2011). Elle favoriserait également le métabolisme du glucose en facilitant la capture du glucose et le flux glycolytique (Lock *et al*, 2011).

2.2.2. Autophagie et maintien des propriétés des cellules souches cancéreuses

Les cellules souches cancéreuses (CSC) lorsqu'elles sont en dormance constituent une petite sous-population cellulaire qui possède des capacités d'auto-renouvellement, de différenciation et d'échappement à la mort cellulaire. Ces CSC participeraient à l'initiation tumorale, à l'hétérogénéité de la tumeur, à la résistance aux traitements et à la formation de métastases (Meacham & Morrison, 2013; Shibue & Weinberg, 2017).

Or l'autophagie semble être importante dans la maintenance et la survie des CSC (García-Prat *et al*, 2016; Cuffi *et al*, 2011; Rausch *et al*, 2012). Par exemple, dans le cancer du sein, des auteurs ont pu mettre en évidence que l'autophagie dans les CSC mammaires permettait leur survie ainsi que le maintien du phénotype mésenchymateux induit par le TGF- β et de l'expression de vimentine (Cuffi *et al*, 2011). Cette étude suggère donc également un rôle de l'autophagie dans l'invasion et la migration des CSC grâce à la transition épithélio-mésenchymateuse. Dans une seconde étude, des auteurs ont pu confirmer l'importance de l'autophagie dans la maintenance des CSC, mais aussi dans leur capacité à former des tumeurs *in vivo*. En effet, dans un modèle *in vitro* de mammosphère contenant des CSC de MCF-7, les auteurs ont pu montrer que le flux autophagique était plus élevé en comparaison à celui des cellules adhérentes. L'absence d'expression de BECLIN1 dans ce modèle de mammosphère diminue leur maintenance et leur capacité à former des tumeurs dans des souris immunodéficientes (Gong *et al*, 2013).

2.2.3. L'autophagie favorise les métastases

Pendant la progression tumorale, il peut y avoir une invasion des cellules tumorales dans l'organisme et la formation de métastases. La formation de métastases à partir de la tumeur primaire fait intervenir plusieurs étapes dont l'invasion des cellules tumorales du site primaire, l'entrée et la survie des cellules tumorales dans la circulation sanguine, l'extravasation, la dissémination et la colonisation des cellules tumorales dans d'autres organes.

L'autophagie pourrait intervenir dans l'agressivité des cancers en facilitant différentes étapes du processus menant à la formation de métastases (Fung *et al*, 2008; Macintosh *et al*, 2012; Peng *et al*, 2013a). Il a notamment été montré que l'autophagie peut promouvoir l'invasion des cellules tumorales. En effet, des études *in vitro* montrent que l'autophagie est induite lors du détachement des cellules tumorales de la matrice extracellulaire ce qui mime le détachement des cellules tumorales de la tumeur primaire (Fung *et al*, 2008). Au contraire, l'inhibition de l'autophagie empêche le détachement de ces cellules de la matrice extracellulaire. De plus, dans un modèle d'étude 3D organotypique, il a également pu être montré que l'inhibition de l'autophagie prévient l'invasion des cellules tumorales (Macintosh *et al*, 2012).

Lors du détachement des cellules tumorales de la matrice extracellulaire (MEC), l'anoikis dans les cellules se déclenche pour empêcher la survie des cellules. Il s'agit d'une mort cellulaire par apoptose qui est déclenchée lorsque la cellule n'a plus de contact avec la MEC. L'autophagie serait également importante lors de cette étape de la formation des métastases pour assurer la survie des cellules dans la circulation sanguine. En effet, dans une étude menée dans un modèle de souris, l'inhibition de l'autophagie limiterait la formation de métastases des cellules HCC (hepatocellular carcinoma) en levant la résistance à l'anoikis et donc en limitant la formation de colonies par ces cellules (Peng *et al*, 2013a).

L'autophagie est également décrite comme facilitant la dissémination des cellules cancéreuses malignes dans la circulation sanguine (Sosa *et al*, 2014) et la colonisation des tissus par les cellules tumorales (Peng *et al*, 2013b). Enfin, l'autophagie interviendrait dans la capacité des cellules métastatiques à entrer en dormance pour survivre dans un nouvel environnement et entraînerait également la résistance de ces cellules aux traitements antitumoraux (Lu *et al*, 2008).

2.2.4. Autophagie et facteur de résistance aux traitements dans les tumeurs

Nous avons montré précédemment que l'autophagie pouvait augmenter la sensibilité des cellules tumorales aux traitements. L'autophagie peut aussi être induite suite aux différents traitements par radiothérapie (Zois & Koukourakis, 2009) et par chimiothérapie (Garbar *et al*, 2017). Dans certaines conditions, cette autophagie induite pourrait également protéger les cellules tumorales contre ces traitements. En effet, lorsque des cellules myéloïdes chroniques exprimant la protéine de fusion BCR-ABL sont traitées par l'imatinib, un inhibiteur de tyrosine kinase, les auteurs observent une augmentation de l'autophagie conduisant à une meilleure survie des cellules (Bellodi *et al*, 2009). En effet, si l'autophagie est inhibée dans ce modèle par un traitement chimique (CQ) ou par interférence à l'ARN (si *Atg7* et *Atg5*), le traitement des cellules par l'imatinib conduit à une augmentation de la mort cellulaire. En fait, l'inhibition de l'autophagie potentialise la sensibilité des cellules tumorales à l'apoptose induite par le traitement. Cette inhibition de l'autophagie empêche la dégradation sélective de médiateurs de l'apoptose comme les mitochondries et les protéines pro-apoptotiques (Bellodi *et al*, 2009). De façon similaire, l'inhibition de l'autophagie par la chloroquine dans des cellules de leucémies myéloïdes aiguës potentialise également l'apoptose induite par l'acide valproïque et le varinostat, des inhibiteurs des histones désacétylases (Torgersen *et al*, 2013).

L'ensemble de ces données suggère que les traitements anticancéreux devraient prendre en compte l'effet de l'autophagie sur la réponse antitumorale en fonction de chaque type de cancer. Ainsi, lorsque l'autophagie a un rôle cytoprotecteur sur les cellules tumorales, il conviendrait de l'inhiber ; et au contraire, il faudrait l'activer si l'autophagie peut avoir une action cytotoxique. Des stratégies visant à combiner l'utilisation des drogues induisant ou inhibant l'autophagie aux traitements anti-cancéreux sont des pistes intéressantes qui font l'objet d'essais cliniques. Cependant, l'identification de biomarqueurs spécifiques reste une limite majeure à ce type de traitements, car ils permettraient de personnaliser le choix du traitement pour chaque patient.

2.3. Rôle des protéines ATG8 dans le cancer

La famille ATG8 est divisée en deux sous-familles : la famille LC3 et la famille GABARAP. Ces protéines participent à l'autophagie et interviennent dans les différentes étapes du mécanisme autophagique comme nous avons pu le préciser dans les chapitres précédents. Différentes études ont montré que l'expression des différents gènes *ATG8* peut être régulée, et en particulier dans des cancers. Dans certains type de tumeurs, l'expression des gènes *ATG8*

comme *GABARAPL1* pourrait être aussi régulée par des modifications épigénétiques (Hervouet *et al*, 2015; Artal-Martinez de Narvajás *et al*, 2013; Klebig *et al*, 2005). Les différentes protéines ATG8 peuvent avoir des rôles anti- ou pro-tumoraux.

Les membres de la sous-famille GABARAP semblent avoir un rôle suppresseur de tumeur et leur surexpression serait un marqueur de bon pronostic. En effet, plusieurs études montrent que la surexpression des ARNm de la sous-famille *gabarap* serait un facteur de bon pronostic dans le cancer du rein, de la prostate, du sein et dans certains HCC (Liu *et al*, 2014a; Hervouet *et al*, 2015; Klebig *et al*, 2005; Roberts *et al*, 2004; Su *et al*, 2016; Berthier *et al*, 2010). Pour *GABARAPL1*, par exemple, il a été montré que l'expression de l'ARNm et de la protéine *GABARAPL1* étaient diminuées dans les HCC par rapport au tissu sein adjacent et cette faible expression de *gabarapl1* est associée à un mauvais pronostic dans ce type de cancer (Liu *et al*, 2014a). *In vitro*, la surexpression de *GABARAPL1* dans des lignées de HCC inhibe la croissance cellulaire et l'inactivation par interférence à l'ARN de *Gabarapl1* favorise la prolifération cellulaire (Liu *et al*, 2014a). De façon similaire, des travaux de notre équipe ont montré que l'expression de *GABARAPL1* est également diminuée dans le cancer du sein et associée à un mauvais pronostic (Berthier *et al*, 2010). Les études *in vitro* dans les lignées de cancer du sein MCF-7 montrent que la surexpression de *GABARAPL1* inhibe la croissance cellulaire (Berthier *et al*, 2010). Toujours dans les cellules MCF-7, une étude récente de notre équipe a permis de montrer que *GABARAPL1* pouvait également diminuer la migration cellulaire et la croissance tumorale *in vivo* dans des souris (Poillet-Perez *et al*, 2017). De façon intéressante, ces travaux ont montré que la fonction suppressive de tumeur de *GABARAPL1* était indépendante de sa lipidation à un phospholipide et de sa localisation aux autophagosomes. La protéine *GABARAPL1* serait aussi impliquée dans l'invasion cellulaire et l'apparition de métastases (Su *et al*, 2016). En effet, l'inactivation du gène *GABARAPL1* dans des cellules issues d'un carcinome de prostate augmente *in vitro* l'invasion cellulaire et l'apparition de métastases *in vivo* dans les ganglions lymphatiques (Su *et al*, 2016). *GABARAP* aurait un rôle similaire à *GABARAPL1* sur la viabilité cellulaire, la prolifération cellulaire et la migration cellulaire (Rho *et al*, 2013).

A ce jour, le rôle des protéines LC3 dans la progression tumorale est mal connu et peu étudié. La protéine LC3B pourrait activer la sénescence induite par un oncogène *RAS* dans des cellules primaires et HEK293 transformées, limitant ainsi la tumorigenèse (Dou *et al*, 2015). Ainsi, l'expression des ARNm de *LC3* est diminuée dans les cancers du poumon et il a été démontré qu'une faible expression du taux d'ARNm et de protéines est associée à un mauvais pronostic dans le carcinome rénal (Jiang *et al*, 2012; Deng *et al*, 2013).

L'ensemble de ces résultats suggère donc un rôle suppresseur de tumeur de la famille ATG8 dans les cancers et en particulier des membres de la sous-famille GABARAP. Le rôle suppresseur de tumeurs des protéines GABARAP pourrait être dû à la dégradation sélective de composés cellulaires oncogéniques comme par exemple p62 (Jacquet *et al*, 2020).

Les protéines ATG8 semblent également être impliquées dans la survie cellulaire et jouer un rôle pro-tumoral. En effet, les membres de la sous-famille GABARAP sont surexprimés dans certains cancers comme le cancer colorectal, le cancer de la tête/du cou et sont associés à un mauvais pronostic (Miao *et al*, 2010; Keulers *et al*, 2015). De plus, une forte expression de LC3 a aussi été montrée dans certains cancers, tels que les cancers du sein triples négatifs et les cancers colorectaux (Lefort *et al*, 2014; Wu *et al*, 2015b). Dans les cancers hépatiques, des études par immunohistochimie ont montré que LC3B est plus exprimée dans les métastases que dans les cellules de la tumeur primaire. Ces résultats suggèrent que l'autophagie serait importante pour la formation de métastases et la colonisation d'autres tissus par les cellules tumorales (Peng *et al*, 2013b).

3. Rôle de l'autophagie dans la présentation antigénique

Cette dernière partie de l'introduction a fait l'objet de l'écriture d'un chapitre de livre (Fonderflick *et al*, 2020).

Le système immunitaire protège l'hôte contre les agents pathogènes qu'il rencontre grâce à la coopération de plusieurs types cellulaires. On distingue généralement l'immunité « innée » et l'immunité « adaptative ». L'immunité innée se caractérise par la mise en place d'une réponse immunitaire immédiate. C'est la première ligne de défense qui est mise en place vis-à-vis de différents pathogènes et elle assure aussi le rôle de sentinelle dans la survenue de tumeurs. Cette réponse implique plusieurs acteurs de la réponse immunitaire tels que les cellules phagocytaires ou les lymphocytes NK (natural killer). La deuxième ligne de défense immunitaire à être mise en place est la réponse immunitaire adaptative (ou spécifique). Cette réponse est spécifique de la reconnaissance par les lymphocytes T et B d'un antigène immunogène (par exemple les antigènes de tumeurs). Dans le cas des lymphocytes T, ils ne reconnaissent pas directement l'antigène, mais un peptide issu de celui-ci et associé aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). Les molécules du CMH de classe I (CMH-I) sont exprimées à la surface de presque toutes les cellules somatiques et les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) tandis que les molécules du CMH de classe II sont exprimées seulement par les CPA dites « professionnelles ». Le complexe [CMH:peptide] présent à la surface des CPA est reconnu par le TCR (T cell receptor) présent à la surface des lymphocytes

T entraînant la prolifération clonale des lymphocytes spécifiques d'un peptide antigénique. Cette réponse peut aussi permettre la mise en place d'une réponse immunitaire mémoire qui perdure plusieurs années (Chatenoud, 2002).

Cette réponse immunitaire antitumorale adaptative est importante dans l'immunosurveillance des cancers (Thomas, 1982; Burnet, 1957) et dans la théorie de l'immunoédition des cancers, développé par Schreiber (Dunn *et al*, 2004) et qui ont permis de nouvelles avancées dans le développement de thérapies anti-tumorales, comme les immunothérapies. Récemment, l'autophagie a été décrite comme pouvant être impliquée dans l'apprêtement des antigènes et dans la présentation de ces peptides à la fois par les molécules du CMH-I et du CMH-II. Les peptides présentés par le CMH-I sont reconnus par les lymphocytes T CD8⁺ (cytotoxiques), tandis que les lymphocytes T CD4⁺ (helper) reconnaissent les peptides dérivés de protéines présentés par le CMH-II (Blum *et al*, 2013).

3.1. La présentation classique d'antigènes par les molécules du CMH de classe I et II

Les molécules du CMH de classe I et II sont importantes pour la mise en place de la réponse immunitaire adaptative. Dans le paradigme classique, les molécules du CMH-I présentent des peptides antigéniques principalement générés à partir d'antigènes d'origines cytosolique et nucléaire, tandis que les peptides antigéniques présentés par le CMH-II ont une origine exogène.

3.1.1. Présentation d'antigènes par les molécules du CMH de classe I

Les molécules du CMH-I sont présentes à la surface de toutes les cellules nucléées. Chez l'Homme, ces molécules sont appelées molécules HLA (human leucocyte antigen). Les molécules du CMH-I se composent de deux types de chaînes : une chaîne lourde membranaire polymorphe et une chaîne invariante appelée β 2-microglobuline, qui s'assemblent au niveau du réticulum endoplasmique. En l'absence de peptides, le complexe CMH-I est stabilisé par 3 protéines chaperonnes : (1) la calréticuline, (2) la protéine ERp57 (Protéine disulfide isomérase) et (3) la tapasine. Ces 3 sous-unités s'associent au niveau de la membrane du RE et forment le complexe appelé PLC (peptide-loading complex) permettant le chargement du peptide. La tapasine est également capable d'interagir avec le transporteur TAP (transporter-associated with antigen processing) impliqué dans le transport de peptides du cytoplasme au RE et au CMH-I (Figure 19).

Ces peptides sont générés à partir de protéines endogènes dégradées par le protéasome nucléaire et cytoplasmique. Les peptides formés se composent de 8 à 16 acides aminés et sont raccourcis par l'aminopeptidase ERAP1 (Endoplasmic reticulum aminopeptidase 1). Les peptides se fixent ensuite dans le sillon de liaison au peptide antigénique présent au niveau des molécules du CMH-I (Figure 19) (Blum *et al*, 2013).

Cependant des antigènes d'origine exogène peuvent également être présentés par les molécules du CMH-I au niveau des cellules dendritiques CD8 α^+ (DC CD8 α^+), spécialisées dans la présentation croisée d'antigènes. Ce mode de présentation moins conventionnel est appelé présentation croisée. Ainsi, ces antigènes exogènes peuvent être traités indépendamment du système TAP ou de manière dépendante au système TAP après leur endocytose (Cruz *et al*, 2017). Ce mécanisme de présentation a été décrit pour la première fois en 1976, sous la dénomination de « cross-priming » (présentation croisée) (Bevan, 1976). Ce processus permet d'élargir le répertoire antigénique que les cellules dendritiques peuvent présenter sur les molécules du CMH-I afin d'activer la réponse des cellules T CD8 $^+$. Ce mécanisme joue un rôle important dans les maladies auto-immunes lorsque le cross-priming permet la présentation d'auto-antigènes aux lymphocytes T CD8 $^+$ (Ji *et al*, 2013) ou lors de l'immunosurveillance des cancers et des infections virales (Cruz *et al*, 2017).

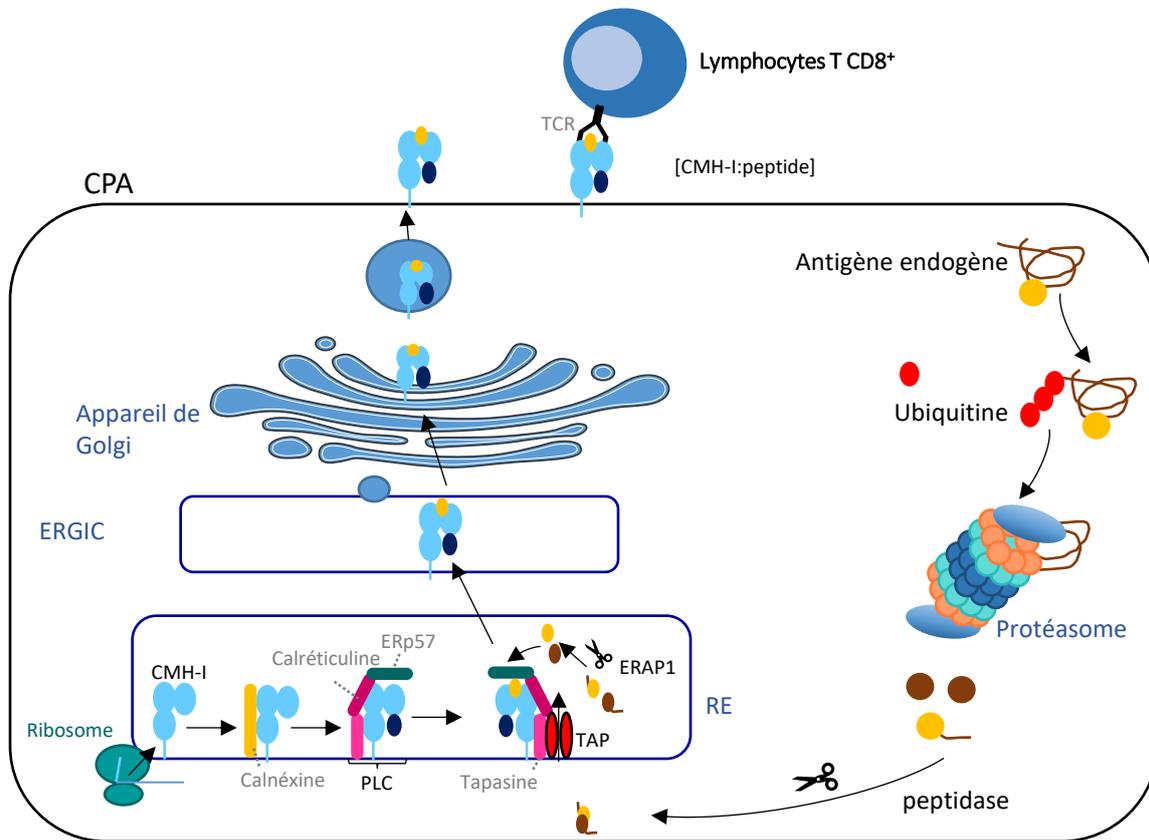


Figure 19 : Représentation schématique de la voie classique de présentation par les protéines du complexe majeur d'histocompatibilité de classe I. D'après Blum et al, (2013). La présentation classique par les protéines du CMH de classe I (CMH-I) permet la présentation de peptides antigéniques d'origine endogène. Les protéines destinées à la dégradation sont conjuguées à l'ubiquitine et dégradées par le protéasome. Les peptides produits sont ensuite clivés par des peptidases cytosoliques. Une partie des peptides est alors transloquée dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE) par le système TAP (transporter-associated with antigen processing) et, pour certains, pris en charge et coupés par l'aminopeptidase ERAP1 (endoplasmic reticulum aminopeptidase 1) dans le RE. Les peptides sont ensuite fixés aux nouvelles molécules de CMH-I. Ce complexe CMH-I qui se forme dans le RE est composé d'une chaîne lourde et d'une chaîne de β 2-microglobuline. En l'absence de peptide, le complexe CMH-I est stabilisé par 3 protéines chaperonnes : la calréticuline, la protéine ERp57 et la tapasine. Ces 3 sous-unités s'associent et forment le complexe appelé PLC (peptide-loading complex) permettant le chargement du peptide. La tapasine est également capable d'interagir avec le transporteur TAP impliqué dans le transport de peptides du cytoplasme au RE et au CMH-I. Une fois le peptide fixé sur le complexe CMH-I-PLC, le complexe [CMH-I:peptide] est transporté à la membrane plasmique à travers la voie de sécrétion (ERGIC/Appareil de Golgi) pour activer et stimuler les lymphocytes T CD8⁺ par l'intermédiaire du récepteur T (TCR).

3.1.2. Présentation d'antigènes par les molécules du CMH de classe II

Les molécules du CMH-II sont exprimées par un sous-groupe de cellules immunitaires appelées cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, telles que les cellules dendritiques (DC), les macrophages et les lymphocytes B. Les peptides présentés par les molécules du CMH-II sont générés à partir d'antigènes exogènes livrés aux endosomes tardifs par phagocytose, macropinocytose et endocytose et digérés par les hydrolases acides. Les sous-unités α et β du CMH-II sont synthétisées et repliées dans le réticulum endoplasmique grâce à une protéine chaperonne spécifique, la chaîne invariante (Ii). Ce processus permet de limiter l'association précoce des peptides au niveau du sillon de liaison sur les molécules du CMH. Le complexe formé des molécules du CMH-II et de la chaîne invariante est ensuite transporté à travers l'appareil de Golgi dans un compartiment appelé le compartiment du CMH-II (MIIC). Dans le MIIC, en raison du pH acide, les protéases cathepsine S et L sont activées et la chaîne Ii est clivée pour donner un fragment de chaîne Ii résiduel appelé CLIP (class II-associated invariant chain peptide). Ensuite, le complexe CMH-II $\alpha\beta$ -CLIP se lie à la molécule HLA-DM chez l'Homme (H2-DM ou H-2M chez la souris) qui agirait comme une molécule chaperonne pour permettre le bon repliement conformationnel des molécules du CMH-II. Cette molécule permettrait également l'échange du fragment CLIP contre un peptide antigénique de haute affinité dérivé d'une protéine dégradée par la voie endosomale. Les complexes [CMH-II:peptide] sont ensuite transportés vers la membrane plasmique pour être reconnus et stimuler les lymphocytes T CD4⁺ (Figure 20) (Trombetta & Mellman, 2004; Blum *et al*, 2013).

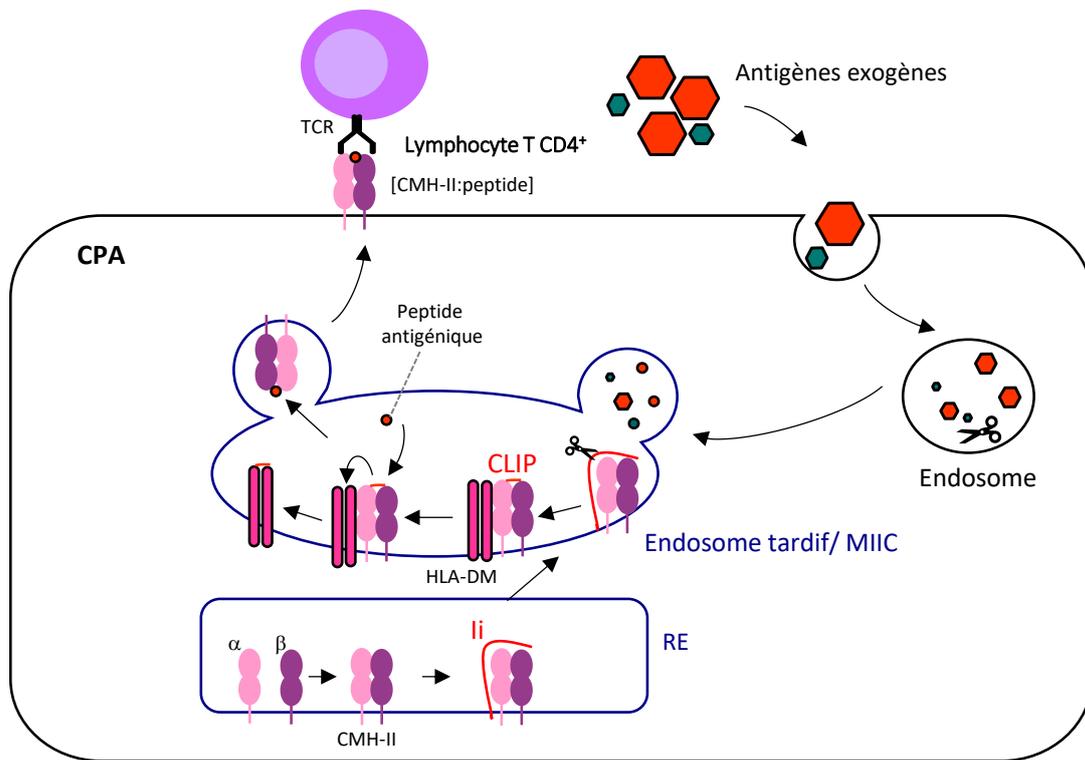


Figure 20 : Représentation schématique de la voie classique de présentation par le CMH de classe II. La présentation classique par le CMH de classe II (CMH-II) permet la présentation de peptides antigéniques d'origine exogène. Ils sont capturés par les cellules présentatrices d'antigènes par phagocytose, endocytose ou par macropinocytose. Ces antigènes sont dégradés par la voie endolysosomale qui contient des hydrolases acides pour former des petits peptides. Les molécules de CMH-II sont synthétisées et adressées au réticulum endoplasmique. Elles sont composées de deux sous-unités α et β qui sont correctement repliées grâce à la chaîne invariante (Ii), empêchant l'association prématurée avec un peptide. Ce complexe formé avec la chaîne invariante est transporté dans le compartiment MIIC (compartiment du CMH-II). En raison du pH acide de ce compartiment, les protéases cathepsine S et L sont activées et la chaîne Ii est lysée pour donner un fragment de chaîne I résiduel appelé CLIP (class II-associated invariant chain peptide). Ensuite, le complexe CMH-II $\alpha\beta$ -CLIP se lie à la molécule HLA-DM pour permettre l'échange du fragment CLIP contre un peptide antigénique dégradé par la voie endolysosomale. Les complexes [CMH-II:peptide] sont ensuite transportés vers la membrane plasmique pour être reconnus et stimuler les lymphocytes T CD4+.

3.2. Autophagie et présentation d'antigènes

Des données récentes sur l'autophagie semble indiquer que l'autophagie peut être directement impliquée dans l'apprêtement et la présentation d'antigène par les molécules du CMH-I et II (Munz, 2012; Crotzer & Blum, 2009).

3.2.1. Autophagie et présentation d'antigènes par les molécules du CMH de classe II

3.2.1.1. Autophagie et présentation d'antigènes endogènes par les molécules du CMH-II

Les premières preuves de la participation de l'autophagie à la présentation de peptides antigéniques par le CMH-II ont été fournies par les données de colocalisation entre les protéines de l'autophagie et les molécules du CMH-II. Des études antérieures ont montré que les peptides dérivés de la protéolyse des protéines ATG (Suri *et al*, 2008), ainsi que les protéines lysosomales (Dengjel *et al*, 2005), peuvent être présentés par les molécules du CMH-II. En effet, lors de la maturation des autophagosomes, la membrane interne est dégradée à la suite de la fusion avec le lysosome. Or, les formes II des protéines ATG8 sont ancrées à la fois à l'intérieur et à l'extérieur des autophagosomes. Ainsi, les protéines ATG8 pourraient être dégradées et produire des peptides antigéniques. Par exemple, dans les cellules β des îlots pancréatiques exprimant les molécules I-Ag7 (classe II), le peptide dérivé de GABARAP 29-45 (VPVIVEKAPKARIGDLD) a été trouvé sur les molécules du CMH-II, suggérant que GABARAP peut être ciblée vers le compartiment MIIC (Suri *et al*, 2008). Une autre preuve a été fournie par Schmid et ses collaborateurs dans les cellules dendritiques humaines, les lymphocytes B et les cellules épithéliales (Schmid *et al*, 2007). En effet, ils ont montré, lors d'expériences de colocalisation ciblant les protéines LC3B, HLA-DM, CMH-II et LAMP-2, que les autophagosomes sont continuellement formés et fusionnés avec le MIIC (Schmid *et al*, 2007). De même, une autre étude dans les lignées de cellules épithéliales thymiques corticales et médullaires a montré que LC3 colocalise, dans le compartiment lysosomal, avec des molécules H2-DM, CMH-II et CLIP (Kasai *et al*, 2009). Cet apport continu d'antigènes endogènes du soi par autophagie semble contribuer à l'auto-tolérance dans le thymus par la sélection positive et négative des lymphocytes T CD4⁺ (Nedjic *et al*, 2008). Ainsi, la perte d'*Atg5* dans les cellules thymiques perturbe la sélection positive et négative et contribuerait à l'apparition de maladie auto-immune chez la souris (Nedjic *et al*, 2008). En effet, pendant le développement des lymphocytes T, les précurseurs des lymphocytes T subissent une sélection positive dans le cortex thymique et négative dans la zone médullaire du thymus. Cette sélection positive entraîne l'établissement

de lymphocytes T fonctionnels et un répertoire de cellules T varié. La sélection négative entraîne l'élimination des lymphocytes T potentiellement auto-réactifs pour permettre d'établir une tolérance centrale envers les antigènes du soi. Cette sélection a lieu avec les CPA thymiques, les cellules épithéliales thymiques (TEC, thymic epithelial cell) et les cellules dendritiques thymiques. La génération d'un répertoire de lymphocytes T CD4⁺ fonctionnels et tolérants vis-à-vis du soi repose sur un grand nombre de peptides du soi qui sont présentés par les CPA du thymus. Les peptides présentés doivent correspondre au plus grand nombre d'antigènes retrouvés dans les différents tissus (Duraes *et al*, 2015).

L'autophagie est également impliquée dans l'apprêtement et la présentation par le CMH-II des antigènes endogènes tels que les antigènes viraux, bactériens ou cytoplasmiques. Le premier exemple que l'on trouve dans la littérature concerne l'antigène nucléaire endogène 1 du virus Epstein-Barr (EBNA1). En effet, l'inhibition de l'autophagie, à l'aide de NH₄Cl ou de chloroquine, a conduit à une accumulation d'EBNA1 dans les vésicules cytosoliques. De plus, l'inhibition de la formation d'autophagosomes avec des siRNA *Atg12* dans des lignées de lymphocytes B diminue la reconnaissance des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques à EBNA1 (Paludan *et al*, 2005). De même, Nimmerjahn et ses collègues ont montré que l'antigène bactérien cytosolique néomycine phosphotransférase II (Neor) était présenté sur les molécules du CMH-II par la voie autophagique (Nimmerjahn *et al*, 2003). Cependant, dans ce cas, l'autophagie pourrait également être capable de traiter des antigènes nucléaires pour la présentation aux molécules du CMH-II. En effet, lorsque l'antigène Neor est adressé au noyau cellulaire par l'ajout d'un signal de localisation nucléaire (antigène grand T de SV40), cette protéine de fusion NucNeor est exclusivement localisée dans le noyau. Pour éviter l'exportation de NucNeor dans le cytosol, le système d'exportation nucléaire de la protéine CRM1 a été bloqué à l'aide de l'antibiotique leptomycine B. Néanmoins, Neor et NucNeor ont été traités par la voie autophagique et les cellules ont pu stimuler les lymphocytes T CD4⁺ spécifiques de cet antigène avec la même efficacité (Riedel *et al*, 2008). L'autophagie est également capable de dégrader les bactéries qui envahissent le cytosol (Gutierrez *et al*, 2004a). Dans les macrophages, l'induction de l'autophagie par la rapamycine (un inhibiteur de mTOR) conduit à la diminution de la survie des mycobactéries (*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*)) en favorisant la maturation du phagosome contenant cette bactérie en phagolysosome (Gutierrez *et al*, 2004a). L'étude *in vivo* de la présentation de l'antigène immunodominant de *Mtb* Ag85B par les CPA de souris a montré que l'induction de l'autophagie par la rapamycine conduit à l'amélioration de la présentation des peptides dérivés de l'Ag85B sur les molécules du CMH-II (Jagannath *et al*, 2009). Cependant, le *Mtb* peut échapper au système immunitaire de l'hôte en bloquant la présentation de l'antigène restreint au CMH-II. En effet, dans les cellules dendritiques infectées par *Mtb*, la protéine PE_PGRS47 produite par *Mtb* inhibe l'autophagie et limite la présentation d'antigènes

dont l'antigène Ag85B (Saini *et al*, 2016). Lors d'une infection par *Mtb* mutant exprimant la protéine mutée PE_PGRS47 *Mtb* chez la souris, la présentation de peptides dérivés de Ag85B par le CMH-II est améliorée (Saini *et al*, 2016).

Mais, la macroautophagie n'est pas le seul processus impliqué dans la présentation d'antigènes endogènes par les molécules du CMH-II. En effet, l'autophagie dépendante des chaperonnes peut également participer à la présentation de peptides dérivés d'un antigène cytoplasmique par les molécules du CMH-II. Ainsi, il a été démontré dans un modèle de lymphocytes B que la surexpression de LAMP-2A et de HSC-70 favorisait la capture d'antigènes endogènes et leurs présentations par les molécules du CMH-II sans augmenter le niveaux d'expression des molécules du CMH-II à la membrane plasmique (Zhou *et al*, 2005). Au contraire, la surexpression de LAMP-2C inhiberait la présentation d'antigènes par les molécules du CMH-II (Pérez *et al*, 2016).

3.2.1.2. Autophagie et présentation d'antigènes exogènes par les molécules du CMH-II

L'autophagie est généralement associée à la dégradation des composants endogènes. Cependant, ce processus semble également impliqué dans la dégradation des antigènes exogènes. L'autophagie s'est en effet révélée essentielle pour le traitement et la présentation optimale des antigènes extracellulaires phagocytés par la voie TLR (toll-like receptor) (Lee *et al*, 2010). Afin d'étudier le rôle de l'autophagie dans la présentation d'antigènes, ce groupe a généré un modèle de souris conditionnelles délétées pour le gène *Atg5*, codant une protéine autophagique essentielle qui est requise pour la formation d'autophagosomes. Dans ce modèle, toutes les cellules hématopoïétiques, y compris les DC et les lymphocytes T, n'avaient pas de gène *Atg5* dans la rate, les ganglions lymphatiques et la moelle osseuse (Lee *et al*, 2010). *In vivo*, la suppression d'*Atg5* dans les cellules dendritiques a provoqué des défauts de « priming » des lymphocytes T CD4⁺. Ainsi, lorsque ces souris ont été infectées par voie intravaginale par le virus HSV1 (Herpes Simplex virus 1), elles n'ont pas pu produire de réponse T helper 1 (TH1, CD4⁺) (le nombre de lymphocytes T producteurs d'IFN- γ et la synthèse d'IFN- γ ont été réduits par rapport aux souris de type sauvage). De plus, les souris déficientes en *Atg5*^{-/-} sont mortes plus rapidement que les souris de type sauvage après une infection virale. Des investigations supplémentaires ont pu démontrer que les DC *Atg5*^{-/-} étaient incapables d'amorcer et d'activer la prolifération des cellules T CD4⁺ de type sauvage bien que ces CPA étaient encore capables de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires, de produire des cytokines et d'exprimer les protéines du CMH-II (Lee *et al*, 2010). De plus, les DC *Atg5*^{-/-} ainsi que les DC de type sauvage ont pu capturer des antigènes fluorescents solubles ainsi que des cellules apoptotiques

fluorescentes, ce qui suggère que les processus d'endocytose et de phagocytose étaient inchangés dans les DC *Atg5*^{-/-} (Lee *et al*, 2010). Afin d'étudier les besoins de la machinerie autophagique dans l'apprêtement et la présentation des antigènes endogènes, les DC ont été infectées par la *Listeria monocytogenes* exprimant le modèle d'antigène couramment utilisé OVALBUMINE (OVA). La présentation du peptide OVA par les DC a modérément diminuée en l'absence d'ATG5, comme en témoigne une diminution de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques à OVA, montrant que l'autophagie était en effet impliquée dans l'apprêtement et la présentation des antigènes endogènes. De plus, en utilisant des inhibiteurs spécifiques de l'autophagie ou en supprimant l'expression de protéines autophagiques clés par interférence à l'ARN (si *Atg7* et *Atg12*) dans les DC WT, les auteurs ont montré que ces cellules présentatrices d'antigènes étaient altérées dans leur capacité à présenter des peptides dérivés d'antigènes exogènes phagocytés. Ces résultats suggèrent que l'autophagie est également nécessaire pour le traitement et la présentation des antigènes exogènes dans les cellules dendritiques. Enfin, il a été démontré qu'en l'absence d'ATG5 dans les DC, la fusion entre les phagosomes et les lysosomes était retardée, ce qui suggère que l'autophagie est impliquée dans cette étape et est aussi nécessaire à l'apport efficace de cathepsines dans le compartiment MIIC (Lee *et al*, 2010).

La phagocytose associée à LC3 (LAP, LC3-associated phagocytosis) est qualifiée d'autophagie non canonique et est décrite comme également impliquée dans l'apprêtement et la présentation des antigènes exogènes sur les molécules du CMH-II. Pendant la LAP, les antigènes exogènes sont phagocytés dans un phagosome à membrane unique recouverte de la protéine autophagique essentielle LC3B sous sa forme conjuguée au PE (forme -II) (Figure 21) (Romao *et al*, 2013). La LAP peut intervenir dans différentes cellules immunitaires, notamment les macrophages (Sanjuan *et al*, 2007), les cellules dendritiques conventionnelles (Martinez *et al*, 2016) ou les cellules dendritiques plasmacytoïdes (Henault *et al*, 2012). Dans un modèle utilisant des cellules présentatrices d'antigènes humains et des antigènes de *C. albicans*, Romao et collaborateurs ont pu montrer que le recrutement des antigènes dans le phagosome recouvert de LC3B dépendait de la stimulation des récepteurs de reconnaissance de formes (TLR2 par exemple) et de l'activité de la NADPH oxydase 2 (NOX2). La déconjugaison de LC3B-II associée à la membrane du phagosome semble se produire avant l'acidification des phagosomes et la fusion avec les lysosomes. Dans ce cas, les auteurs suggèrent que la formation de LAP pourrait retarder la dégradation de l'antigène par la voie endolysosomale et ainsi prolonger la présentation des peptides antigéniques sur les complexes du CMH-II conduisant à une meilleure réponse des lymphocytes T CD4⁺ (Romao *et al*, 2013).

A Stimulus externes :

- Induction et blocage de l'autophagie de l'autophagie (a-TEA, Bortézomib...)
- Mort cellulaire par autophagie
- Chimiothérapie, radiothérapie

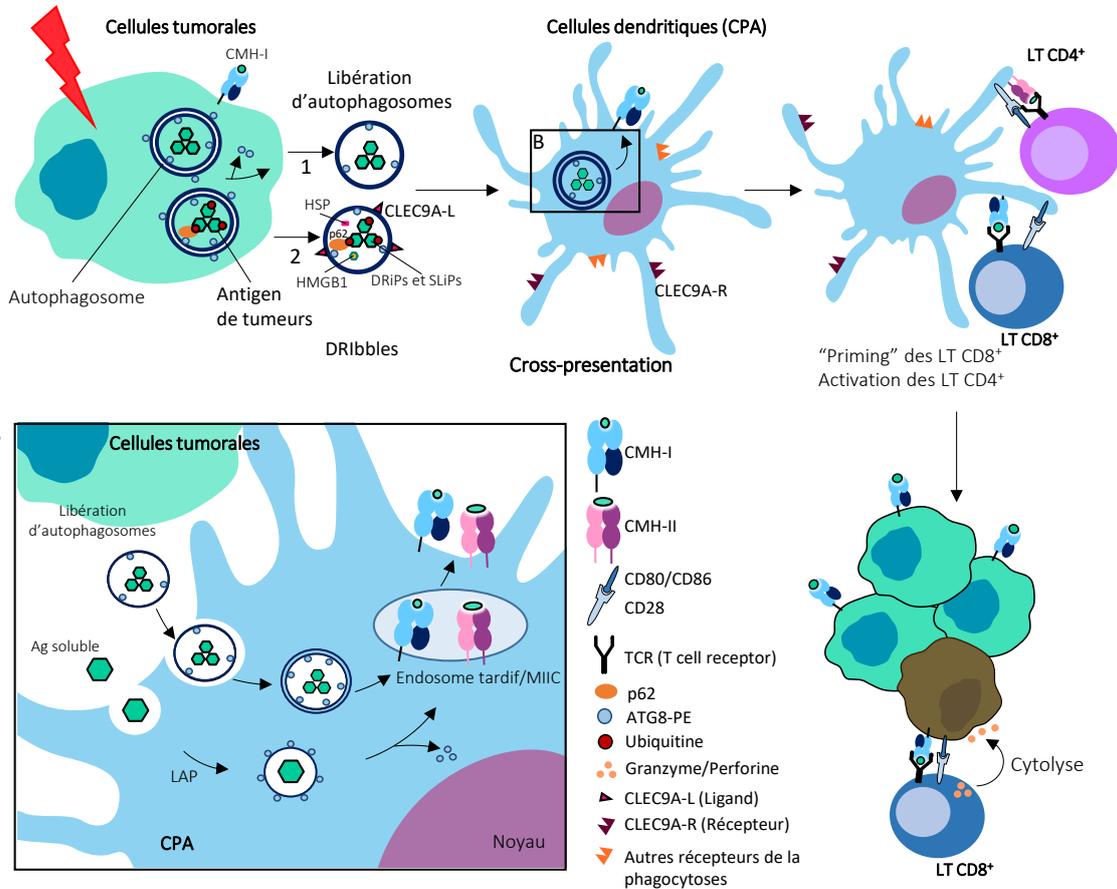


Figure 21 : contribution schématique de l'autophagie dans l'apprêtement d'antigènes de tumeurs exogènes.

D'après (Fonderflick et al, 2020). (A) (1) L'autophagie peut être induite dans les cellules tumorales par la privation de nutriments, le traitement médicamenteux, la chimiothérapie... Les autophagosomes des cellules tumorales peuvent être libérés naturellement dans l'environnement ou à cause des différents stimuli que peuvent recevoir les cellules tumorales. Ces autophagosomes sont libérés dans l'environnement extracellulaire et internalisés par des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) qui sont spécialisées dans la présentation croisée d'antigènes. Les antigènes sont ensuite traités et liés aux molécules de CMH-I (complexe majeur d'histocompatibilité de classe I) à la surface cellulaire pour le « priming » et l'activation des LT (lymphocytes T) CD8⁺. (2) L'inhibition de l'activité du protéasome et de la dégradation des autophagosomes dans les cellules tumorales conduisent à l'agrégation de protéines ubiquitinylées, comme le produit ribosomal défectueux (DRiPs) et les protéines à vie courte (SLiPs) qui sont séquestrées dans les autophagosomes via p62. La protéine p62 est capable d'interagir avec LC3B au niveau des autophagosomes grâce à un domaine d'interaction à LC3 (LIR) et aux ubiquitines liées à l'antigène grâce à un domaine de liaison à l'ubiquitine. Puis, la vésicule interne des autophagosomes est également libérée dans le milieu extracellulaire. Cette vésicule dérivée des autophagosomes est appelée Dribble DRiPs containing autophagosomes-rich bleeds). (B) Les vésicules contenant les antigènes et d'autre molécules importantes (DAMP, CLEG9A-L) pour l'activation du système immunitaire et la capture par les CPA sont endocytées par la CPA. Ces vésicules endocytées sont ensuite probablement fusionnées avec des endosomes tardifs et/ou le compartiments MIIC pour être traitées engendrer des peptides liés aux protéines du MHC-I par présentation croisée. L'autophagie dans les cellules donneuses d'antigène pourrait améliorer l'immunogénicité des cellules tumorales en augmentant la présentation croisée. Dans un second temps, la libération des antigènes directement dans le domaine extracellulaire permet une internalisation par les CPA par phagocytose associée à LC3 (LAP). La LAP facilite le traitement de l'antigène et augmente la présentation par le CMH-II afin d'activer les lymphocytes T CD4⁺. Abréviations : Ag : Antigène, DRiP : produits ribosomiques défectueux, HMGB1 : High Mobility Group Box 1, HSP : Heat shock Protein, MIIC : Compartiment CMH de classe II, SLiP : protéine de courte durée de vie.

3.2.2. Autophagie et présentation d'antigènes par les molécules du CMH de classe I

L'autophagie est aussi impliquée dans la présentation d'antigènes par les protéines du CMH-I ; d'une part en régulant le niveau d'expression du CMH-I sur la membrane cellulaire et d'autre part, en générant des peptides antigéniques pour une présentation par le CMH-I.

3.2.2.1. Autophagie et expression des molécules du CMH de classe I

Chez les souris, les DC et les macrophages invalidés pour les gènes de l'autophagies *Atg5* et *Atg7* présentent un niveau de molécule CMH-I plus élevé à leur surface cellulaire par rapport aux cellules de type sauvage. Les protéines ATG semblent donc être impliquées dans l'internalisation et le recyclage du CMH-I (Loi *et al*, 2016). En effet, il a été démontré que les molécules du CMH-I recrutent l'adaptateur protéique AAK1 (adaptator associated kinase 1) (Loi *et al*, 2016), un régulateur de l'endocytose médiée par la clathrine (Conner & Schmid, 2002), *via* la protéine LC3B liée à la membrane plasmique (Loi *et al*, 2016). Ainsi, un défaut d'expression de la protéine ATG5 entraîne une inhibition de la lipidation de LC3 et conduit à un recrutement moins efficace d'AAK1 par les molécules du CMH-I. Ainsi, l'augmentation d'expression des molécules du CMH-I à la surface dans les CPA *Atg5*^{-/-} conduit à une amélioration de la stimulation des lymphocytes T CD8⁺ au cours de l'infection par le virus de la grippe A et de la chorioméningite lymphocytaire chez ces souris (Loi *et al*, 2016). De plus, une étude récente de 2020 montre que, dans des adénocarcinomes ductaux du pancréas (PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma), les molécules du CMH-I sont la cible d'une dégradation lysosomale dépendante de l'autophagie et qui semble faire intervenir le récepteur autophagique NBR1. Dans cette étude, l'inhibition de l'autophagie permet d'augmenter l'expression des molécules du CMH-I à la surface cellulaire, favorisant la présentation d'antigènes. L'inhibition de l'autophagie dans un modèle de souris syngéniques portant une tumeur PDAC permet la reconnaissance de ces cellules PDAC par les lymphocytes T cytotoxiques CD8⁺ antitumoraux, conduisant à une diminution de la croissance tumorale pour ces souris. Cette étude montre que l'autophagie peut participer à l'échappement tumorale en dégradant et en internalisant les molécules du CMH-I, empêchant ainsi la reconnaissance des peptides dérivés de tumeurs par les lymphocytes T (Yamamoto *et al*, 2020).

3.2.2.2. Autophagie et présentation d'antigènes endogènes par les molécules du CMH-I

Au-delà du rôle de l'autophagie dans la dégradation et le recyclage de molécules du CMH-I présentes au niveau de la membrane, il a également été décrit un rôle contradictoire de l'autophagie favorisant la présentation d'antigènes par les molécules du CMH-I en augmentant l'apprêtement d'antigènes endogènes et leur présentation par les protéines du CMH-I. Ainsi, dans un modèle de macrophages infectés par le virus HSV-1, les auteurs ont montré que, pendant les premières heures de l'infection, la présentation des peptides dérivés de l'antigène glycoprotéine B (gB) suivait la voie classique de présentation impliquant le protéasome et la stimulation des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques de l'antigène gB (English *et al*, 2009). Néanmoins, après une infection de 8 à 12 heures, les antigènes gB peuvent être apprêtés par autophagie. En effet, la réalisation d'un traitement à la bafilomycine A, un inhibiteur de l'acidification lysosomale, entraîne une forte diminution de la capacité des macrophages à stimuler les lymphocytes T CD8⁺ restreints à l'antigène gB (English *et al*, 2009). D'autre part, une étude complémentaire par microscopie électronique a permis d'observer que l'antigène était internalisé dans des autophagosomes spécifiques à quatre membranes provenant probablement du noyau. Après avoir été dégradés dans les autophagosomes, les peptides se sont échappés vers le cytosol pour être ensuite traités par le protéasome et rejoindre la voie classique du CMH-I d'une manière dépendante du système TAP (English *et al*, 2009).

La présentation de l'antigène par les protéines du CMH-I peut aussi impliquer l'autophagie, mais indépendamment du protéasome et du transporteur peptidique TAP. Cela a été démontré dans un modèle différent d'infection par le cytomégalovirus (CMV) de lymphoblastes humains déficients pour le transporteur TAP (Tey & Khanna, 2012). En effet, l'inhibition du protéasome n'a pas affecté l'apprêtement et la présentation de l'antigène viral pUL138 puisque les cellules étaient encore capables d'activer les cellules T CD8⁺ restreintes à pUL138. En revanche, l'inhibition de l'autophagie par un traitement à la chloroquine réduisait fortement la présentation de l'antigène pUL138 par les molécules du CMH-I. De plus, dans ce cas le complexe [CMH-I:peptide] était assemblé dans le compartiment endosomal et non dans le RE comme cela est décrit classiquement (Tey & Khanna, 2012).

Certains virus ont développé la capacité de bloquer la machinerie autophagique pour échapper à la surveillance du système immunitaire. Par exemple, *in vitro*, il a été montré que des DC de souris infectées par un mutant du virus HSV1 qui n'exprime pas la protéine ICP34.5 (Infected Cell Protein), une protéine jouant un rôle inhibiteur de l'autophagie, présentaient une meilleure capacité à stimuler les lymphocytes T CD8⁺ (Budida *et al*, 2017). ICP34.5 inhiberait l'autophagie par son interaction avec BECLIN1, une protéine majeure impliquée dans la

formation des autophagosomes, et limiterait ainsi la présentation antigénique (Budida *et al*, 2017).

3.2.2.3. Autophagie et présentation croisée d'antigènes par les molécules du CMH-I: Rôle dans les cellules dendritiques

Le mécanisme par lequel les peptides exogènes peuvent être apprêtés et présentés par les molécules du CMH-I n'est pas complètement compris. Dans ce contexte, le rôle de l'autophagie dans la présentation croisée d'antigènes exogènes par les molécules du CMH-I dans les cellules dendritiques reste controversé. Dans les expériences menées par Lee et ses collaborateurs, que nous avons mentionnées précédemment (Lee *et al*, 2010), les auteurs ont également examiné si l'autophagie était capable de présenter un peptide exogène sur les molécules du CMH-I dans un modèle de cellules hématopoïétiques *Atg5*^{-/-} (Lee *et al*, 2010). Pour cela, des DC de type sauvage ou des DC déficientes en autophagie ont été incubées avec un antigène OVA soluble ou avec des cellules apoptotiques exprimant l'OVA. Dans ces cellules n'exprimant pas ATG5, ni la phagocytose ni l'endocytose ne sont affectées. Dans tous les cas, les DC de type sauvage ou *Atg5*^{-/-} ont pu stimuler les cellules T CD8⁺ spécifiques de l'OVA avec une efficacité similaire et il a également été montré que, chez les souris *Atg5*^{-/-}, le « priming » des lymphocytes T CD8⁺ n'était pas affecté (Lee *et al*, 2010). Selon ces auteurs, l'inhibition du processus autophagique ne perturbe donc pas la présentation croisée.

Dans un second article, des auteurs sont arrivés à des conclusions différentes sur le rôle de l'autophagie dans la présentation croisée. Dans cette étude, le gène *VPS34* a été invalidé dans une sous-population de cellules dendritiques (DC CD8 α +) impliquées dans la présentation croisée (Parekh *et al*, 2017). *VPS34* est une protéine impliquée dans l'autophagie ainsi que dans l'endocytose et le trafic vésiculaire intracellulaire (Backer, 2008). En l'absence de *VPS34*, aucune structure à double membrane de type autophagosome n'a été détectée dans les cellules dendritiques et l'accumulation de réticulum endoplasmique ou de mitochondries montre que la voie autophagique canonique est défectueuse dans ces cellules (Parekh *et al*, 2017). Néanmoins, ces cellules dendritiques déficientes en *VPS34* présentent une meilleure capacité à présenter des peptides par les voies classiques du CMH I et II (respectivement par la voie protéasomale ou endosomale). Toutefois, les DC déficientes en *VPS34* ne sont pas en mesure de présenter de manière croisée l'antigène OVA exogène lorsque les DC sont exposées à des cellules apoptotiques exprimant l'OVA. Au contraire, la présentation croisée de OVA exogène est possible lorsque l'antigène OVA est présenté aux DC sous une forme soluble, surexprimé dans les bactéries ou adressé aux DC par un anticorps. Ces résultats suggèrent que la

pinocytose, l'endocytose médiée par les récepteurs ou les processus de phagocytose n'ont pas été affectés (Parekh *et al*, 2017). Les auteurs ont également montré que l'inhibition de l'expression de la VSP34 dans les DC entraînait une diminution de leur capacité à présenter des antigènes provenant de cellules apoptotiques. Cette inhibition de la présentation par les DC est probablement due à une diminution de l'expression du récepteur TIM-4. Ce récepteur est impliqué dans la phagocytose de cellules apoptotiques qui présentent de la phosphatidylsérine en surface. La perte de VPS34 diminue l'efficacité de la phagocytose du fait de l'absence du récepteur TIM4.

De plus, dans les souris où l'expression de *VPS34* a été invalidée spécifiquement dans les DC, les auteurs ont montré une augmentation du développement des métastases à la suite de l'inoculation de cellules issues d'un mélanome murin (B16). Le VPS34 semble donc jouer un rôle clé dans la régulation de l'homéostasie des cellules dendritiques CD8 α^+ (Parekh *et al*, 2017).

Cependant les résultats de ces travaux sont sujet à débat car d'autres études ont donné des conclusions différentes. En effet, il a été montré que des nanoparticules $\alpha\text{Al}_2\text{O}_3$ recouvertes de l'antigène OVA étaient capables d'induire une présentation croisée de l'antigène OVA sur les molécules du CMH-I par autophagie dans les DC. Ce mécanisme fait intervenir les autophagosomes puisque des études par immunofluorescence montrent que les nanoparticules recouvertes d'OVA sont retrouvées dans ces structures à double membranes. De plus, l'inhibition de l'autophagie diminue la présentation de OVA par les molécules du CMH-I, démontrée par une diminution de la prolifération des LT CD8 $^+$ spécifiques de OVA (Li *et al*, 2011a).

3.2.2.4. Autophagie et présentation croisée d'antigènes par les molécules du CMH-I : Rôle dans les cellules donneuses d'antigènes

Pendant la présentation croisée, l'antigène provient de l'extérieur. Les DC peuvent internaliser des cellules infectées par un virus ou des cellules tumorales en mort cellulaire qui deviennent alors des cellules donneuses d'antigènes. Des résultats intéressants ont suggéré un rôle important de l'autophagie pour une présentation croisée optimale d'antigènes issus de ces cellules. Pour montrer cette présentation croisée, Li et ses collègues (Li *et al*, 2008) ont utilisé un modèle de cellules HEK293T exprimant l'antigène GFP-OVA se liant à la membrane ou une lignée cellulaire de mélanome humain exprimant l'antigène endogène tumoral gp100. L'autophagie a été stimulée dans ces cellules donneuses d'antigènes par la rapamycine ou par une privation en nutriments avant que les cellules ne soient irradiées puis incubées avec les DC.

Cette activation de l'autophagie a amélioré la présentation croisée de ces antigènes par les DC, comme le démontre une stimulation plus forte des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques des antigènes OVA et gp100 (Li *et al*, 2008). L'effet inverse a été observé lorsque l'autophagie a été inhibée dans les cellules donneuses d'antigènes, soit en bloquant l'étape d'initiation par des siRNA *Beclin1* ou soit en bloquant la formation de l'autophagosome par des siRNA *Atg12*. De façon surprenante, le blocage de l'étape de fusion entre les autophagosomes et les lysosomes, en utilisant le NH₄Cl, a également augmenté la présentation croisée, ce qui suggère que l'apprêtement de l'antigène ne se produit pas dans l'autolysosome (Li *et al*, 2008).

Afin d'étudier le rôle des différents types de mort cellulaire sur l'efficacité de la présentation croisée, Uhl et collaborateurs, ont établi deux lignées cellulaires donneuses d'antigènes. Dans une lignée cellulaire de fibroblastes embryonnaires murins (MEF), l'apoptose a été supprimée en invalidant l'expression de *Bax* et *Bak* (Uhl *et al*, 2009). Les cellules ont ensuite été infectées par le virus de la grippe puis tuées par un stress génotoxique UV-B (Uhl *et al*, 2009). Suite à ces traitements, les cellules contrôles MEF de type sauvage sont mortes par apoptose, tandis que les MEF *Bax/Bak*^{-/-} sont mortes par mort cellulaire programmée de type II (autophagie). Ces deux lignées cellulaires ont été utilisées pour immuniser des souris. Neuf jours après l'immunisation *in vivo*, le nombre de lymphocytes T CD8⁺ restreints aux complexes peptides dérivés du virus de la grippe associés au CMH-I était plus important dans les ganglions lymphatiques des souris immunisées avec des cellules MEF *Bax/Bak*^{-/-} (Uhl *et al*, 2009). Ces résultats suggèrent qu'une cellule donneuse d'antigènes mourant par autophagie aurait une plus grande capacité à induire une présentation croisée dans les DC. L'importance de l'autophagie a clairement été démontrée puisque l'inhibition de l'expression d'ATG5 dans les cellules donneuses d'antigènes réduit drastiquement l'apprêtement dans les DC (Uhl *et al*, 2009). Ainsi, l'autophagie peut être indirectement impliquée dans l'apprêtement et la présentation des antigènes par les molécules du CMH-I en délivrant des antigènes aux DC pour le « priming » et la stimulation de LT CD8⁺ spécifiques. Cependant, le mécanisme exact doit encore être élucidé.

3.2.3. Autophagie et présentation d'antigènes de tumeurs

Nous avons précédemment montré que l'autophagie peut être impliquée dans l'apprêtement et la présentation des antigènes endogènes et exogènes présentés par les molécules du CMH-I et II. La voie autophagique pourrait également jouer un rôle important dans l'immunosurveillance des cancers et dans l'élimination des cellules tumorales par les LT CD8⁺ et CD4⁺.

3.2.3.1. Autophagie et présentation des antigènes tumoraux par les molécules du CMH-II

L'autophagie pourrait jouer particulièrement un rôle dans l'apprêtement et la présentation, par les molécules du CMH-II, des peptides dérivés d'antigènes tumoraux. Par exemple, la MUCINE 1 (MUC1) est une protéine normalement exprimée à la surface cellulaire des cellules épithéliales. Cette protéine est surexprimée par les cellules tumorales dans la leucémie myéloïde aiguë humaine (Liu *et al*, 2014b) et dans le cancer du sein (Rahn *et al*, 2001). Dörfel et ses collaborateurs ont démontré (Dörfel *et al*, 2005), dans un modèle de DC surexprimant MUC1, que l'apprêtement de la protéine MUC1 impliquait plusieurs voies comme le protéasome et le compartiment endolysosomal. Dans ce modèle, l'inhibition de l'autophagie (par le 3-MA ou la Wortmannine), diminue la capacité des DC à présenter les peptides de MUC1 sur les molécules du CMH-II sans modifier la présentation par les molécules du CMH-I (Dörfel *et al*, 2005). D'autres peptides dérivés d'antigènes des tumeurs du mélanome tels que MAGE-3 (Chaux *et al*, 1999), Melan-A (Godefroy *et al*, 2006), Melan-A / MART-1 (Zarour *et al*, 2000) et gp100 (Robila *et al*, 2008) ont également été décrits comme des antigènes présentés par les molécules du CMH-II dans des CPA ou des cellules de mélanome. Néanmoins, la contribution des protéines ATG et de l'autophagie dans l'apprêtement des antigènes de tumeurs du mélanome n'a pas encore été étudiée.

3.2.3.2. Autophagie et présentation croisée : Rôle dans les cellules tumorales comme cellules donneuses d'antigènes

Comme nous avons pu le décrire précédemment, l'activation de l'autophagie peut être importante dans les cellules HEK293T ou les cellules tumorales exprimant l'OVA ou gp100 lorsqu'elles sont utilisées comme cellules donneuses d'antigènes pour la présentation croisée d'antigènes dans les DC (Li *et al*, 2008). Dans cette étude, Li et ses collaborateurs ont supposé que les autophagosomes provenant des cellules donneuses et contenant des antigènes tumoraux pouvaient être utilisés pour délivrer ces antigènes tumoraux aux DC. Pour vérifier leur hypothèse, des autophagosomes ont été purifiés à partir de cellules HEK293T prétraitées par le NH₄Cl afin de bloquer la fusion entre l'autophagosome et le lysosome. Les DC incubées avec ces vésicules autophagiques purifiées ont ensuite pu stimuler les LT CD8⁺ spécifiques d'OVA. De même, des DC incubées avec des autophagosomes isolés à partir des cellules de mélanome ont également été capables d'induire une réponse T CD8⁺ contre l'antigène tumoral gp100. L'ensemble de ces résultats suggère que les autophagosomes purifiés pourraient être de bons candidats pour une vaccination contre des antigènes tumoraux (Li *et al*, 2008) (Figure 21).

Dans une autre étude, le même groupe a montré que l'acide alpha-tocophéryloxyacétique (α -TEA), un analogue de la vitamine E principalement décrit comme un inducteur de l'apoptose des cellules tumorales, pouvait également stimuler l'autophagie et améliorer la présentation croisée des antigènes tumoraux par les DC (Li *et al*, 2012). De plus, les cellules tumorales stimulées par l' α -TEA sont aussi capables de libérer des vésicules qui présentent des niveaux élevés de LC3B-II suggérant comme origine les autophagosomes. Ces vésicules appelées α -TAGS (α -TEA-derived autophagosome-enriched supernatant) proviennent du surnageant de cellules tumorales exprimant l'antigène OVA stimulées par le α -TEA. Ces vésicules permettent de fournir l'antigène OVA aux cellules dendritiques pour induire *in vitro* une meilleure réponse des cellules T CD8⁺.

La dégradation des protéines par le protéasome concerne en général des protéines à courte durée de vie SLiP (short-lived protein) ou des produits de traduction ribosomique défectueux DRiP (defective ribosomal product) ; alors que l'autophagie concerne plutôt la dégradation des protéines à longue durée de vie. Cependant, lorsque le protéasome est inhibé par le Bortezomib, un inhibiteur irréversible du protéasome, les SLiP ainsi que les DRiP s'agrègent et deviennent des substrats de la dégradation par la voie autophagique (Li *et al*, 2009b). En effet, des études effectuées sur des autophagosomes présents dans les cellules cancéreuses traitées à la fois avec des inhibiteurs du protéasome et de la fusion autophagosome-lysosome montrent que les protéines SLiPs et DRiPs ubiquitinylées colocalisent avec LC3B (Li *et al*, 2011b). Ces autophagosomes contiennent également des protéines à longue durée de vie ubiquitinylées. La présence de ces protéines ubiquitinylées dans les autophagosomes dépendrait du récepteur autophagique p62 (Twitty *et al*, 2011). De plus, ce traitement prolongé par un inhibiteur du protéasome entraîne la libération d'un nouveau type de vésicules dans le milieu de culture appelées DRibbles (DRiPs containing autophagosomes-rich blebs) (Li *et al*, 2011b; Yu *et al*, 2017) (Figure 21). Ces DRibbles contiennent également des DAMP comme HMGB1, HSP 90, HSP 94 et la calréticuline. Ainsi, ces autophagosomes contenant des DAMP peuvent libérer ces différentes protéines dans le milieu extracellulaire provoquant une amélioration de l'efficacité d'une vaccination à base de DRibbles (Li *et al*, 2011b). Les DRibbles provenant de cellules cancéreuses traitées par des inhibiteurs du protéasome présentent un plus large spectre d'antigènes cellulaires en comparaison aux autophagosomes libérés naturellement et provenant de cellules non traitées.

Le mécanisme par lequel les DRibbles sont internalisés dans les DC n'est pas encore complètement élucidé. Cependant, la présence du ligand CLEC9A sur leur membrane pourrait contribuer à leur internalisation. Le récepteur de cette lectine de type C, CLEC9A, a été décrit comme étant impliqué dans la capture de cellules nécrotiques et dans la présentation

d'antigènes par une sous-population de DC compétentes pour la présentation croisée (Figure 21) (Li *et al*, 2011b). Ces auteurs suggèrent que les DRibbles pourraient pénétrer dans les cellules par les cavéoles ou par endocytose dépendante de la clathrine. Ils ont également suggéré que CLEC9A pourrait orienter les antigènes contenus dans les DRibbles vers le compartiment endosomal non acide dans les cellules dendritiques pour une présentation croisée. De plus, la dégradation des antigènes ferait intervenir, en plus de l'endocytose, la voie de dégradation par le protéasome/TAP et le système ERAD (ER-associated degradation). Les antigènes s'échapperaient du compartiment endosomal vers le cytosol (Li *et al*, 2011b). Une autre hypothèse suggère que les autophagosomes internes pourraient être endocytés par les cellules dendritiques et se retrouver dans les endosomes tardifs/le MIIC (Figure 21). En effet, des molécules actives du CMH-I ont été trouvées dans ce compartiment de la voie vacuolaire (Mahmutefendić *et al*, 2007). Les molécules du CMH-I sont recyclées continuellement à partir de la surface cellulaire et reçoivent un nouveau peptide dans le compartiment MIIC (Kleijmeer *et al*, 2001). Ainsi, les peptides créés dans la voie autophagique ou dans la voie endocyttaire pourraient être chargés sur des molécules de CMH-I dans ce compartiment, puis transportés à la membrane plasmique pour activer les lymphocytes T CD8⁺.

Des DRibbles ont également été produits à partir de différentes lignées cellulaires cancéreuses et incubés avec les DC pour une présentation croisée afin d'induire une réponse immunitaire des cellules T CD8⁺ (Xing *et al*, 2016). Une prolifération *in vitro* de ces lymphocytes T CD8⁺ a été observée lorsque ces cellules ont été co-cultivées avec des DC qui avaient été au préalable mis en présence des DRibbles pour amorcer une présentation croisée. En plus d'induire une puissante réponse des lymphocytes T, les DRibbles ont également été décrits comme impliqués dans la réponse immunitaire innée. En effet, ces vésicules activent plusieurs récepteurs de reconnaissance de forme (PRR) comme TLR2, 4, 7 et 8 et le récepteur NOD2 intracellulaire pour induire l'expression de cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , IL-6, IL-10 et IL1- β) et la maturation des DC (Xing *et al*, 2016). Les DRibbles fournissent également les signaux 1 (TLR) et 2 (ATP) nécessaires à l'activation de l'inflammasome à NLRP3 induisant la production d'IL-1 β par les cellules mononucléaires du sang périphérique (Xing *et al*, 2016).

L'ensemble de ces données confirme que les autophagosomes provenant de cellules donneuses d'antigènes sont une bonne alternative pour délivrer des antigènes tumoraux aux cellules dendritiques pour une présentation croisée.

3.3. Autophagie et présentation d'antigènes pour améliorer les immunothérapies

Le but d'un protocole d'immunothérapie est d'aider le système immunitaire à combattre et à éliminer les cellules cancéreuses. Différents types d'immunothérapies sont utilisés à l'heure actuelle : les anticorps ciblant les inhibiteurs des points de contrôle immunitaire, les thérapies utilisant des transferts adoptifs de cellules immunitaires modifiées ou non génétiquement, les anticorps monoclonaux, les vaccins thérapeutiques et les modulateurs du système immunitaire. Dans ce paragraphe, nous présenterons les résultats sur l'utilisation potentielle de l'autophagie pour moduler la présentation d'antigène dans les cellules cancéreuses et dans les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles par vaccination, par chimiothérapie et par radiothérapie.

3.3.1. Fractions de vésicules enrichies en autophagosomes (DRibbles)

Comme nous l'avons vu précédemment, les DC incubées avec du surnageant contenant des α -TAGS (α -TEA-derived autophagosome-enriched) sont capables de délivrer l'antigène OVA aux DC pour induire une forte réponse des cellules T CD8⁺ *in vitro* (Li *et al*, 2012). De façon intéressante, l'immunisation *in vivo* de souris BALB/c à l'aide de DC incubées avec ces α -TAGS permet de réduire les métastases pulmonaires et d'améliorer la survie des souris portant des tumeurs mammaires murines 4T1 (Li *et al*, 2012). Cet effet n'a pas pu être reproduit si les cellules tumorales utilisées pour produire les α -TAGS sont traitées avec des shRNA *Atg12* ou avec du 3-MA, prouvant le rôle déterminant de la formation d'autophagosomes dans la présentation croisée par les DC (Li *et al*, 2012). Ces données suggèrent donc que la chimiothérapie à base de α -TEA pourrait permettre de développer des nouvelles stratégies pour générer des antigènes associés aux tumeurs et induire une présentation croisée par les DC et améliorer la réponse immunitaire contre les cellules tumorales (Li *et al*, 2012).

Il a également été montré que les cellules tumorales traitées avec des inhibiteurs du protéasome et des inhibiteurs de la fusion autophagosome-lysosome libéraient dans le milieu de culture des vésicules dérivées d'autophagosomes contenant des antigènes tumoraux. Ces DRibbles ont été présentés comme de bons candidats pour la vaccination antitumorale en délivrant des antigènes tumoraux *via* les autophagosomes aux DC. En effet, lorsque des souris portant des tumeurs 3LL ont reçu une injection sous-cutanée de DC qui ont été incubées avec des DRibbles dérivés de 3LL (3LL-DRibbles), un retard de croissance tumorale et une amélioration significative de la survie des souris ont pu être observés (Li *et al*, 2011b). De plus, lorsque les souris ont été vaccinées avec des DC incubées avec du 3LL-DRibbles en présence

d'IFN- γ et de l'adjuvant poly [IC], l'efficacité de cette vaccination a été considérablement améliorée. Par ailleurs, des souris inoculées par voie intraveineuse avec des cellules tumorales 3LL ont ensuite été vaccinées pour évaluer la formation de métastases. La vaccination avec les DC chargées avec des 3LL-DRibbles a fortement réduit le nombre de métastases (Li *et al*, 2011b). Les DC chargées de DRibbles ont activé les lymphocytes T CD8⁺ avec une meilleure efficacité que les DC chargées de cellules mortes ou de lysats cellulaires. Sur la base de ces résultats, Li et ses collaborateurs ont proposé que les vaccins liés aux DRibbles pourraient être une approche clinique prometteuse pour traiter les patients atteints d'un cancer du poumon non à petites cellules ou d'un cancer du sein (Li *et al*, 2011b).

Dans une autre étude, Twitty et collaborateurs (Twitty *et al*, 2011) ont utilisé un modèle de sarcomes murins induits par le 3-méthylcholanthène (MCA) pour comparer l'efficacité de la vaccination des souris faite soit avec des cellules entières de sarcomes induits par le MCA, soit avec des DRibbles dérivés de ces tumeurs. Les DRibbles ont été produits à partir de cellules tumorales traitées par bortézomib et NH₄Cl. La vaccination avec des cellules entières irradiées a déclenché une réponse immunitaire contre les sarcomes homologues mais n'a pas permis de déclencher une réponse immunitaire contre les sarcomes dérivés de MCA non homologues. Au contraire, la vaccination avec des DRibbles dérivés d'un sarcome induit par un traitement MCA a donné une protection contre ce sarcome homologue mais aussi contre les autres sarcomes non homologues. Les SLiP sont une source commune d'antigènes entre tous les sarcomes indépendants. Néanmoins, la vaccination avec les DRibbles dérivés d'un sarcome induit par un traitement au MCA n'a pas pu produire de réponse immunitaire contre d'autres lignées cellulaires comme par exemple les lignées cellulaires de mélanomes B16 et les cellules rénales primaires. Les auteurs ont également montré qu'un traitement au bortézomib stabilisait les SLiP ubiquitinylées qui étaient délivrées dans les autophagosomes par l'adaptateur autophagique p62. La réponse immunitaire générée par la vaccination avec les DRibbles est dirigée spécifiquement contre les SLiP ubiquitinylées. En fait, un prétraitement des cellules avec un inhibiteur de la synthèse des protéines limite la production de SLiP et, dans ces conditions, la vaccination par les DRibbles ne permet pas d'induire une protection immunitaire (Twitty *et al*, 2011).

Une vaccination thérapeutique efficace est basée sur une forte réponse des lymphocytes T qui peut être induite si les cellules tumorales génèrent des néo-épitopes et si ces cellules sont reconnues par les cellules T spécifiques de ces épitopes. La plupart du temps, la réponse immunitaire n'est pas efficace car les cellules tumorales elles-mêmes sont capables d'inhiber la réponse immunitaire des lymphocytes T infiltrant les tumeurs. Pour améliorer cette réponse, une immunothérapie combinatoire utilisant des DRibbles allogéniques et des anticorps anti-

récepteurs de costimulation OX40 a été utilisée chez des souris porteuses d'un carcinome mammaire 4T1. L'OX40 est un récepteur appartenant à la famille des récepteurs du TNF. Ce récepteur est exprimé dans les cellules T stimulées mais pas dans les cellules T naïves. La combinaison d'anticorps agonistes d'OX40 et des DRibbles a entraîné une amélioration de l'activation, de la prolifération et de la différenciation des lymphocytes T naïfs en lymphocyte T mémoires et effecteurs associés à la régression tumorale (Yu *et al*, 2016).

Un autre effet immunitaire des DRibbles a été observé sur les réponses immunitaires induites par les lymphocytes B (Li *et al*, 2013). En effet, l'injection intraveineuse dans des souris de DRibbles isolés à partir de lignées cellulaires Hepa1-6 (hepatoma cell lines) induit une meilleure réponse (activation et prolifération des cellules B) *in vivo* que l'injection d'un lysat de cellules tumorales. De plus, lorsque les lymphocytes B ont été mis en présence de DRibbles, ces cellules ont pu capturer les antigènes des DRibbles pour traiter et présenter des peptides afin de réactiver directement les lymphocytes T effecteurs. Le niveau de réponse des lymphocytes B était directement corrélé à la quantité de protéines présentes dans les DRibbles. Il est intéressant de noter que l'activation des lymphocytes B implique la voie de signalisation passant par TLR2 (Li *et al*, 2013). Le récepteur TLR2 reconnaît des DAMP, et cette reconnaissance induit une cascade de signalisation passant par MyD88 et qui aboutit à l'activation du facteur de transcription NF- κ B (Li *et al*, 2013). Le facteur de transcription NF- κ B promeut ensuite l'expression de gènes comme *pro-IL-1 β* et *NLRP3* qui permettront la production de la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β après clivage par une caspase et la mise en place de l'inflammasome à NLRP3 (Segovia *et al*, 2012).

Enfin, la vaccination par les DRibbles a également fait l'objet d'essais cliniques. Un essai clinique de phase II évaluant l'utilisation de vaccin à DRibbles (DPV-001) chez les patients atteints de cancer du poumon (NSCLC) montre que ce vaccin présente un large spectre d'antigènes. Au bout de 12 semaines, les PBMC et le sérum ont été récupérés chez les patients vaccinés. Les résultats obtenus à partir de ces échantillons ont montré une activation des cellules T et B (NCT01909752) (Hilton *et al*, 2014). En 2017, les auteurs de cette étude clinique décrivent qu'ils envisagent de débiter un essai clinique avec l'utilisation du vaccin DPV-001 et d'anti-PD1 pour améliorer la réponse immunitaire antitumorale. Une étude plus récente a démarré en 2017, et les résultats sont attendus pour 2020 (NCT03057340).

Dans toutes les études mentionnées précédemment, des DRibbles ont été produits à partir de cellules tumorales traitées, soit avec un inducteur d'autophagie, soit avec un inhibiteur du protéasome et un inhibiteur de fusion autophagosome-lysosome. Cependant, les résultats d'une autre étude montrent que les cellules tumorales sont également capables, sans traitement, de produire et de libérer des autophagosomes appelés TRAP (Tumor cell-Released

AutoPhagosomes) (Zhou *et al*, 2016). La libération de ces TRAP dans l'environnement tumoral favorise la différenciation des lymphocytes B en lymphocytes B régulateurs produisant de l'IL-10 qui a une activité immunosuppressive sur les lymphocytes T. Ces TRAP permettent ainsi la mise en place d'un microenvironnement tumoral immunosuppresseur (Zhou *et al*, 2016). De même, les TRAP ont été isolés à partir de la lignée cellulaire B16-F10 et ajoutés au milieu de culture de macrophages dérivés de la moelle osseuse conduisant à la différenciation de ces macrophages en un phénotype immunosuppresseur M2. Ce phénotype se caractérise, sur les macrophages, par une diminution de l'expression des molécules de CMH-II et par l'absence de protéines de costimulation CD86 (Zhou *et al*, 2016; Wen *et al*, 2018). De plus, ces TRAPs peuvent augmenter l'expression de PD-L1 sur les macrophages M2. PD-L1 est le ligand du récepteur « checkpoint inhibiteur » PD1 (programmed cell death protein 1) présent sur les lymphocytes T. L'activation de cette voie exerce un rétrocontrôle négatif sur les lymphocytes T effecteurs pour limiter leur prolifération et donc leur activité antitumorale. Aussi, en plus de la surexpression de PD-L1, ces macrophages M2 produisent des cytokines comme IL-10, favorables à l'environnement immunosuppresseur. De plus, ces macrophages ne produisent plus de cytokines inflammatoires qui favoriseraient l'élimination des cellules tumorales (Wen *et al*, 2018).

Les TRAP, les α -TAGS et les DRibbles forment des vésicules qui peuvent différer les unes des autres par la quantité et la nature des antigènes qu'elles contiennent. La composition antigénique de ces vésicules peut varier en fonction de l'activation et l'inhibition de l'autophagie. Néanmoins, des recherches supplémentaires sont nécessaires pour identifier la nature exacte des protéines contenues dans ces vésicules dérivées d'autophagosomes afin de définir la meilleure stratégie de vaccination pour une action antitumorale.

3.3.2. Utilisation de vaccin à base d'ADN

Les études que nous avons décrites précédemment concernent la présentation croisée d'antigènes exogènes dans le but d'induire une réponse immunitaire antitumorale des lymphocytes T CD8⁺. Or, l'élimination des cellules tumorales pourraient aussi être améliorée en favorisant une réponse des lymphocytes T CD4⁺. Ces lymphocytes T CD4⁺ peuvent induire des mécanismes cytotoxiques mais peuvent également améliorer les activités cytotoxiques des cellules NK et des lymphocytes T CD8⁺. Pour induire une réponse immunitaire des lymphocytes CD4⁺, il faut adresser directement des antigènes à la voie autophagique pour favoriser un apprêtement et une présentation par les molécules du CMH-II. Dans le but d'adresser des antigènes endogènes aux autophagosomes, des cellules de mélanome humain M199 ont été transfectées par un plasmide exprimant la protéine autophagique LC3B fusionnée à l'extrémité

C terminale de NY-ESO-1 (New York esophageal squamous cell carcinoma 1) (Fonteneau *et al*, 2016). NY-ESO-1 est un antigène normalement exprimé dans les cellules germinales mâles mais qui est surexprimé dans différents types de cancer. Ces études montrent que NY-ESO-1 fusionné avec LC3B a subi un apprêtement lysosomal en transitant par la voie autophagique pour être adressée dans le compartiment de chargement des molécules du CMH-II. Les cellules M199 exprimant cette protéine de fusion sont capables d'activer davantage les lymphocytes T CD4⁺ *in vitro* qui produisent une forte quantité d'IFN- γ (Fonteneau *et al*, 2016).

En utilisant une stratégie similaire, une autre étude montre que la protéine Gag p24 du VIH est retrouvée dans les autophagosomes des cellules dendritiques lorsque cette protéine est fusionnée avec LC3B. Ce ciblage aux autophagosomes permet d'améliorer l'activité des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques du VIH (Coulon *et al*, 2016). Dans une autre étude, le récepteur autophagique p62 a également été fusionné avec l'antigène du VIH Gag p24. Dans cette étude, comme pour les autres protéines de fusion avec LC3B, les auteurs ont observé la mise en place d'une réponse lymphocytaire T CD4⁺ et CD8⁺ spécifique à Gag p24 (Andersen *et al*, 2016). Compte tenu de ces résultats, nous pouvons également supposer que les autres membres de la famille ATG8 tels que GABARAP ou GABARAPL1, ou d'autres récepteurs autophagiques sélectifs tels que NIX ou NDP52 pourraient aussi être utilisés pour adresser efficacement des antigènes aux autophagosomes.

D'autres stratégies ont également été utilisées pour favoriser l'adressage d'un antigène aux autophagosomes. Ainsi, un peptide court appelé VIPA (viral inducer of protein aggregation) codé à partir du gène ICP10 du virus HSV2 a été utilisé pour sa capacité à agréger les protéines entre elles (Fu *et al*, 2010). Ce peptide a été utilisé pour produire une protéine de fusion GFP-VIPA-OVA. Lorsque cette protéine de fusion est exprimée dans les cellules B16, des agrégats ont été visualisés par fluorescence dans les autophagosomes suggérant que VIPA permettrait l'agrégation des protéines et leur dégradation par autophagie. Ces cellules surexprimant la protéine de fusion ont ensuite été utilisées pour vacciner des souris inoculées avec des cellules B16-OVA. Cette vaccination permet d'augmenter la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et conduit à une diminution de la croissance tumorale (Fu *et al*, 2010).

L'ensemble de ces études suggère que l'utilisation de protéines ATG8, d'adaptateurs de cargo ou d'inducteurs d'agrégats constituent une bonne stratégie pour cibler les antigènes tumoraux dans les autophagosomes des cellules dendritiques. Cette approche pourrait permettre, en utilisant un vaccin à base d'ADN, d'améliorer l'activation des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ en immunothérapie antitumorale.

4. Cadre et but de la thèse

Nous avons décrit précédemment que l'autophagie était impliquée dans l'immunité antitumorale. Les objectifs de ces travaux de thèse étaient :

1) D'adresser des antigènes aux autophagosomes en utilisant les protéines de la famille ATG8 pour favoriser une présentation des peptides antigéniques par les molécules du CMH-II.

Les données de la littérature ont pu montrer que la fusion de la protéine LC3B à un antigène dérivé de tumeur NY-ESO-1 (Fonteneau *et al*, 2016) ou à un antigène dérivé d'un virus Gag p24 (Coulon *et al*, 2016) permettait d'augmenter la présentation de peptides dérivés de ces antigènes par les protéines du CMH-II et donc d'augmenter la réponse des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques du peptide antigénique. Ainsi, l'adressage de l'antigène à la voie autophagique grâce à LC3B permet de favoriser un apprêtement par cette voie et aussi une réponse passant par les lymphocytes T CD4⁺ qui peut être recherchée en immunité antitumorale.

Nous nous sommes donc demandé si les protéines GABARAP et GABARAPL1, appartenant comme LC3B à la sous-famille ATG8 étaient capables, comme la protéine LC3B, d'adresser un antigène aux autophagosomes et de favoriser ainsi la présentation de cet antigène par les protéines du CMH de classe II. L'antigène ovalbumine (OVA) fusionné aux différentes protéines ATG8 a été utilisé comme modèle d'antigène pour mimer un antigène de tumeur et les cellules B16-F10 (cellules métastatiques issues d'un mélanome de souris) comme modèle cellulaire pouvant présenter des peptides OVA par les protéines codées par les gènes du CMH-I et CMH-II. Par la suite, nous avons dû utiliser un vrai modèle de cellule présentatrice d'antigènes pour démontrer l'activation des lymphocytes T CD4⁺ spécifique de l'antigène OVA grâce à la fusion avec les protéines ATG8.

2) D'étudier le rôle de la protéine GABARAPL1 dans la présentation d'antigène par les cellules B16-OVA et dans l'immunité antitumorale en réalisant des croissances tumorales dans des souris immunocompétentes.

Le gène *Gec1/Gabarapl1* a été initialement identifié chez le cochon d'Inde, au sein de notre laboratoire en 1993 et décrit comme positivement régulé par les estrogènes (Pellerin *et al*, 1993). Puis, GABARAPL1 a été décrit comme appartenant à la famille ATG8 et comme participant à la maturation et à la fermeture des autophagosomes (Weidberg *et al*, 2010). Les

protéines de la famille ATG8 participent à la voie autophagique et peuvent s'ancrer à la membrane de l'autophagosome suite à la conjugaison au PE (Chakrama *et al*, 2010; Kabeya *et al*, 2004). Le laboratoire s'est ensuite intéressé au rôle de GABARAPL1 dans la prolifération cellulaire et dans le cancer. GABARAPL1 est plutôt décrit comme un gène suppresseur de tumeur. *In vitro*, la perte d'expression de GABARAPL1 dans les cellules tumorales de cancer du sein MDA-MB-236 est associée à une augmentation de la prolifération cellulaire et d'une diminution du flux autophagique (Boyer-Guittaut *et al*, 2014). Aussi, la surexpression de GABARAPL1 dans les cellules MCF-7 entraîne une diminution de la croissance tumorale en sous cutanée dans des souris immunodéficientes (Poillet-Perez *et al*, 2017).

Nous nous sommes donc demandé si l'inactivation de *gabarapl1* dans un modèle cellulaire de mélanome de souris (B16-OVA) était aussi associée à une diminution du flux autophagique, une augmentation de la prolifération cellulaire *in vitro* et de la croissance tumorale dans des souris immunocompétentes. Notre hypothèse de départ était que l'inactivation de *GABARAPL1* dans les cellules B16-OVA pouvait modifier la présentation d'antigènes par les protéines du CMH de classe I et II. Afin d'étudier le rôle de GABARAPL1 dans l'adressage des antigènes aux autophagosomes et la présentation des peptides par les protéines du CMH-II, nous avons entrepris de créer un modèle d'extinction de GABARAPL1. L'expression de la protéine GABARAPL1 a été invalidée dans les cellules B16-OVA par la technologie CRISPR-Cas9. Le statut autophagique des cellules n'exprimant plus GABARAPL1 a été déterminé, puis la prolifération de ces cellules a été étudiée *in vitro* et *in vivo*. L'impact de la perte de GABARAPL1 dans ces tumeurs a été évalué en caractérisant le phénotype et la fonctionnalité des lymphocytes infiltrant les tumeurs.

Matériels et méthodes

1. Culture cellulaire

1.1. Les lignées cellulaires utilisées

Les cellules B16-F10 sont des lignées cellulaires issues d'un mélanome murin (souche C57BL/6). Elles ont été cultivées en milieu RPMI 1640 (Dominique Dutscher, L0498), 10 % SVF (sérum de veau fœtal, Corning, 702774C), 1 % d'un cocktail d'antibiotiques (100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine, Dominique Dutscher, L0018-100) et d'un antifongique (Amphotericin B 0,4 µg/mL). Les cellules B16-F10 ont été utilisées pour étudier la présentation d'antigènes par le CMH de classe I et II. En effet, il constitue un modèle d'étude de la présentation des peptide dérivés de l'antigène OVALBUMINE (OVA) dans un modèle murin. L'expression du CMH de classe I et II est inductible par l'IFN- γ dans les cellules B16-F10.

1.1.1. Modèle de surexpression stable des protéines OVA et OVA-ATG8

Des lignées B16-F10 cultivées en plaque 6 puits ont été transfectées par les plasmides pcDNA 3.1 OVALBUMINE et pcDNA 3.1 OVA-LC3B, pcDNA 3.1 OVA-GABARAP et pcDNA 3.1 OVA-GABARAPL1 en utilisant le kit JetPrime™ (Polyplus) selon les recommandations du fournisseur. Les lignées stables ont été sélectionnées par sélection antibiotique à l'aide de l'hygromycine B (Euromedex) sur environ 2 à 4 semaines. Les clones ont été sélectionnés par la technique du western blot et 2 clones ont été conservés pour chacun des plasmides construits.

1.1.2. Modèle de surexpression transitoire des protéines OVA, OVA-Myc-ATG8 et OVA242-Myc-ATG8

Les lignées B16-F10 ont été transfectées transitoirement (*voir la partie 2. Transfection*).

1.2. Modèle cellulaire d'inactivation de GABARAPL1

Les cellules B16-F10 OVA (surexprimant l'antigène OVA, B16-OVA) expriment la protéine GABARAPL1. L'expression des protéines du CMH de classe I et II est inductible par l'IFN- γ (100 ng 24-48 h) et permet d'étudier l'expression des peptides de OVA par le CMH de classe I et II en utilisant les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ provenant de souris transgéniques exprimant un TCR spécifique restreint au CMH I et II.

L'expression de GABARAPL1 a été éteinte dans les cellules B16-OVA par la technologie CRISPR-Cas9 en ciblant le gène *gabarapl1* de la souris. Nous avons utilisé un plasmide construit par Marc Vigneron de l'ESBS Strasbourg, (UMR 7242, Biotechnologie et Signalisation cellulaire, Strasbourg), possédant un ARN guide qui ciblait l'exon 2 du gène. Après la transfection des cellules B16-OVA (JetPrime), les cellules ont été triées par FACS car elles exprimaient la GFP grâce à une séquence IRES située sur le plasmide pour la GFP. Les cellules ont ensuite été ensemencées en boîte de Pétri. Puis, les clones ont été isolés et sélectionnés par western blotting en recherchant l'absence d'expression de la protéine. Nous avons également réalisé le séquençage par la méthode de Sanger sur des PCR d'ADN génomique (extraction kit Macherey Nagel selon les recommandations du fournisseur) en utilisant des amorces ciblant la mutation créée par l'ARN guide du plasmide CRISPR-Cas9.

1.3. Culture primaire de cellules dendritiques

Les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuses (bmDC) proviennent de la moelle osseuse de souris C57Bl6. La moelle osseuse a été extraite des fémurs et tibias des souris par « flush » en utilisant une aiguille 25 G. Les globules rouges ont été lysés à l'aide d'un traitement ACK (Amonium-Chlorure-Potassium, Gibco, A10492-01) pendant 3 min. Le traitement a été arrêté en ajoutant du milieu de culture RPMI 1640 supplémenté de 10 % de SVF inactivé, d'un cocktail d'inhibiteurs (100 U/mL de pénicilline, 100 µg/mL de streptomycine) et de β-mercaptoéthanol (50 µM) afin d'obtenir un milieu réducteur. La suspension cellulaire a été ensemencée en plaques de Pétri à 1 million/mL avec un volume final de 20 mL avec du milieu de culture supplémenté par GM-CSF murin (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor 5 ng/mL) et IL-4 (10 ng/mL). Au 3^{ème} jour, les progéniteurs des bmDC étaient adhérents. Ainsi, 70 % du milieu de culture a été retiré afin d'éliminer les lymphocytes et granulocytes non-adhérents. Du milieu de culture frais a été ajouté avec une concentration finale en cytokines de 5 ng/mL en GM-CSF, 10 ng/mL d'IL-4. A J6, les bmDC immatures non adhérentes ou faiblement adhérentes ont été récupérées avec une pipette délicatement pour réaliser les expériences. Le milieu de culture a été remplacé par du milieu frais supplémentées en cytokines.

2. Transfections :

Les plasmides OVA, OVA-Myc-ATG8 et 242OVA-Myc-ATG8 ont été fabriqués au laboratoire. Les siRNA ATG5 murin ont été acheté chez Sigma Aldrich (SASI_Mm01 0008196).

2.1. Transfection des cellules B16-F10 par le kit JetPrime™

Les lignées cellulaires B16-F10 ont été étalées à 400 000 cellules dans des plaques 6 puits et à 100 000 cellules dans des plaques à 24 puits. Elles ont été transfectées avec le kit JetPrime™ (Polyplus®, 114-07) selon le protocole du fabricant 24 h après avoir été ensemencées pendant 4 h. Plus le milieu a été remplacé par du milieu frais et les cellules ont pu être utilisées 24 h après. Pour l'établissement des lignées stable de B16-F10 surexprimant OVA ou les protéines OVA-ATG8 se référer à la partie 1.1 du matériel et méthode : culture cellulaire

2.2. Transfection des bmDC par la méthode JetPEI™-Macrophage (Polyplus®)

Pour la transfection transitoire des bmDC, le réactif JetPEI™-Macrophage (Polyplus®) a été utilisé selon le protocole recommandé par le fournisseur. En bref, au jour 6, les bmDC non adhérentes (4×10^5 cellules) ont été ensemencées en plaques à 6 puits avec du milieu RPMI 1640 frais complet contenant 10 ng/mL de rmGM-CSF et 10 ng/mL d'IL-4. Ensuite, les bmDC ont été transfectées au jour 7 avec 2 µg des différents plasmides pcDNA 3.1 pendant 16 à 24 h. Au jour 8, les bmDC ont été irradiées ou non à 25 Gy, puis utilisées pour la co-culture avec des lymphocytes T pour mesurer la présentation du peptide OVA par des molécules du CMH de classes I et II. Les bmDC ont été traitées avec 3-MA le même jour de transfection (jour 7) pour vérifier si l'autophagie était impliquée. Nous avons également utilisé la rapamycine comme inducteur de l'autophagie et le bortézomib pour inhiber l'activité du protéasome.

2.3. Electroporation des bmDC (Amaxa Nucleofector™ kit)

Les bmDC ont été électroporées après avoir été cultivées *in vitro* au 7^{ème} ou au 9^{ème} jour de culture. Les cellules ont été traitées 6 h avant l'électroporation par différentes concentrations de lipopolysaccharides (LPS, de 0,1 à 10 µg/mL) Pour l'électroporation, nous avons utilisé le kit Amaxa Mouse Dendritic cell Nucleofector kit selon les recommandations du fournisseur avec les programmes AN-001 ou Y-001 sur cellules matures et immatures respectivement. Rapidement, les cellules ont été électroporées à 600 000 cellules par électroporation et subdivisées ensuite en deux plaques 24 puits pour les traitements inhibant (3-MA, 3 mM, 16 h) ou activant l'autophagie (Rapamycine, 100 nM, 16 h) ou encore bloquant l'activité du protéasome (Bortézomib, 25 nM, 16 h). Vint quatre heures après l'électroporation, les cellules ont été utilisées directement pour les expériences de co-culture avec les lymphocytes T provenant de souris OT-I ou OT-II. Nous avons également utilisé en

remplacement de la solution d'électroporation du kit un tampon phosphate préparé appelé 1SM (5 mM KCl ; 15 mM MgCl₂ ; 120 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH7.2 ; 25 mM Sodium Succinate ; 25 mM Manitol) (Chicaybam *et al*, 2013) avec le programme AN-001. Par ailleurs, les cuvettes ont été réutilisées plusieurs fois.

3. Analyse des protéines

3.1. Extraction des protéines

Les cellules ont été rincées avec du PBS froid, puis elles ont été collectées par grattage mécanique à l'aide d'un grattoir et centrifugées pendant 5 min à 600 g (4°C). Les culots cellulaires obtenus ont été repris dans 10 µL de tampon RIPA [Tris-HCl 10 mM pH 7,4 NaCl 0,1 M, EDTA 1 mM, Triton X-100 1 % (v/v), NaDOC 0,5% (p/v), SDS 0,1 % (p/v)] pour 100 000 cellules environs, additionné d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (100X, sigma Aldrich). Les cellules ont ensuite été lysées 10 s au sonicateur sur glace et le lysat cellulaire a été incubé 20 min sur glace. Les protéines ont ensuite été dosées par la méthode de Bradford. La quantité de protéines souhaitée a été additionné d'un tampon de charge 1X [Tris-HCl 60 mM pH 6,8, glycérol 10 % (v/v), SDS 2 % (p/v), β-mercaptoéthanol 5 % (v/v), bleu de bromophénol 0,02 % (p/v)]. Pour les études de phosphorylation de protéines, les culots cellulaires ont été repris directement dans 10 µL de tampon de charge pour 100 000 cellules, avant d'être passés au sonicateur 10 s sur glace.

3.2. Western blotting

Les échantillons protéiques ont été dénaturés 5 min à 95°C avant d'être chargés sur un gel d'acrylamide TGX (1610172, BioRad). La migration a été effectuée dans un tampon d'électrophorèse [Tris-HCl 25 mM pH 8,3, glycine 192 mM, SDS 0,1 % (v/v)] pendant environ 10 min à 100 V puis 20 min à 300 V. Après migration, les protéines ont été transférées sur une membrane PVDF (1704157, BioRad) avec le Transblot turbo (1704150, Biorad) en suivant les recommandations du fournisseur. Les sites de fixation non spécifiques ont été saturés dans un tampon TBS-T ([Tris-HCl 199 mM pH 7,4, NaCl 0,35 M, Tween 20 0,1 % (v/v)] supplémenté de 5% de protéines de lait en poudre ou 5% de BSA (Bovine serum albumin) pendant 1 h à température ambiante sous agitation. Les membranes ont ensuite été incubées une nuit, sous agitation avec l'anticorps primaire à 4°C (Tableau 1). Après trois lavages de 10 min dans une solution de TBS-T, les membranes ont été incubées avec l'anticorps secondaire dilué dans une solution de TBS-T 5 % protéines de lait. Trois nouveaux lavages ont été réalisés dans les mêmes

conditions que précédemment puis les protéines ont été révélées par chimioluminescence. Les membranes ont été recouvertes de 1 ml d'ECL (1705060, Biorad) pendant 5 min à l'abri de la lumière puis analysées à l'aide du Chemidoc XRS+ (Biorad).

Anticorps	Dilution	Références
PRIMAIRES		
Actine	1/10000	A5060, Sigma Aldrich
GABARAPL1	1/1000	11010-1-AP, Proteintech
GABARAP/GABARAPL1	1/2000	AB15278, Chemicon Milipore
OVALBUMINE	1/10000	3G-2E1D9, Santa Cruz
OVALBUMINE	1/10000	2808226, Milipore
LC3B	1/3000	LB8918, Sigma Aldrich
P62	1/2000	Cell signaling
SECONDAIRES		
Anti-IgG de souris conjugué HRP	1/10000	B1213C, Paris anticorps
Anti-IgG de lapin conjugué HRP	1/10000	B12407, Paris anticorps

Anticorps	Dilution	Références
PRIMAIRES		
Actine	1/10000	A5060, Sigma Aldrich
GABARAPL1	1/1000	11010-1-AP, Proteintech
GABARAP/GABARAPL1	1/2000	AB15278, Chemicon Milipore
OVALBUMINE	1/10000	3G-2E1D9, Santa Cruz
OVALBUMINE	1/10000	2808226, Milipore
LC3B	1/3000	LB8918, Sigma Aldrich
pP62	1/2000	Cell signaling
SECONDAIRES		
Anti IgG de souris conjugué HRP	1/10000	B1213C, Paris anticorps
Anti IgG de lapin conjugué HRP	1/10000	B12407, Paris anticorps

4. Etude des cellules par microscopie confocale

4.1. Immunofluorescence

Les cellules ont étéensemencées sur lamelle de verre en plaque 24 puits à raison de 100 000 cellules/puits. Le lendemain, suite aux différentes stimulations, les cellules ont été rincées par du PBS 1X froid puis fixées pendant 15 min au PFA 4 % (p/v). Après rinçage au PBS, les cellules ont été perméabilisées 5 min au PBS-Triton X100 0,1 % (v/v) et rincées au PBS. Les sites aspécifiques ont été saturés pendant 30 min à température ambiante par ajout d'une solution de PBS-BSA 5%. L'anticorps primaire a été dilué dans une solution de PBS-BSA 1% puis incubé une nuit à 4 °C (Tableau 2). Le lendemain, les cellules ont été rincées rapidement avant d'être incubées 1 h à 37 °C en présence de l'anticorps secondaire dilué dans une solution PBS-BSA 1 %. Les noyaux ont ensuite été marqués 3 min au DAPI (1/5000) puis les cellules ont été rincées trois fois avant d'être montées sur lame avec du milieu de montage aqueux (F4680 Fluoromount, Sigma Aldrich) et observées au microscope.

4.2. Transfection transitoire de protéines fluorescentes

Les cellules ont étéensemencées sur lamelle à raison de 100 000 cellules/puits en plaque 24 puits puis ont été transfectées 4h par le plasmide pRFP-GFP-LC3 (pTF-LC3 (plasmid tandem fluorescent)), par le pGFP-LC3 ou par les plasmides pRFP-OVA, pRFP-OVA-LC3B, pRFP-OVA-GABARAP, pRFP-OVA-GABARAPL1. Le lendemain, les cellules ont été traitées, puis rincées par du PBS froid et fixées 15 min au PFA 4%. Cette étape a été suivie ou non d'un marquage par des anticorps selon le protocole d'immunofluorescence ci-dessus. Les noyaux ont été marqués au DAPI et suite à trois rinçages, les lames ont été montées dans du milieu de montage.

5. Clonage

5.1. Digestion de l'ADN par les enzymes de restriction

Les digestions ont été réalisées pendant 1 H à 37°C avec 5 unités d'enzyme 2 µg d'ADN dans le tampon indiqué par le fournisseur (Thermo Fisher) ou 10 min avec les enzymes FASTAP de Thermo Fisher.

5.2. Extraction des ADN plasmidiques

L'extraction et la purification des plasmides ont été réalisées grâce au kit midi Xtra et mini prep selon de Macherey Nagel selon les recommandations du fournisseur.

5.3. Ligature

Les ligatures dans le vecteur pcDNA 3.1 Hygro (+) ont été réalisées sur la nuit à 4°C en présence de 100 ng de vecteur linéarisé avec X ng de produit de PCR digéré, ou d'un insert digéré dans un vecteur (ratio 1 : 3 / vecteur : insert) et 1 U de FAST T4 DNA ligase dans le tampon de réaction recommandé par le fournisseur (Thermo Fisher). Le vecteur linéarisé a parfois dû être déphosphorylé avant la ligature en utilisant le kit de phosphatase alcaline FASTAP thermosensible (Thermo Fisher, EF0651) selon les recommandations du fournisseur. De plus, les produits de PCR ont été préalablement purifiés par PCR clean up selon les recommandations du fournisseur, ou prélevés sur gel d'agarose quand il fallait isoler un insert issu de la digestion d'un vecteur plasmidique (Gel and PCR clean up, kit Macherey Nagel).

Après dilution dans un tampon Electrophorèse sur gel d'agarose de charge 1X (3 mM de bleu de bromophénol, 1,5 mM de saccharose, 10 mM de Tris-HCl pH 8) et chargement sur un gel d'agarose 1%, les fragments de PCR ont migré à 50 V pendant 40 min dans du tampon TAE (40 mM Tris-acétate pH 8, 1 mM EDTA). L'ADN a été révélé par un bain de 20 min dans une solution de bromure d'éthidium (0,5 µg/mL). Le marqueur de taille utilisé a été le DNA ladder Plus (Euromedex).

5.4. Transformation des bactéries compétentes

Les bactéries *E. Coli* compétentes (souche JM109) ont été incubées pendant 30 min sur glace avec 50 ng de d'ADN plasmidique. Un choc thermique à 42°C été réalisé pendant 1 min et les bactéries ont ensuite été maintenues sur glace pendant 2 min. Les bactéries ont été remises en suspension dans 1 mL de milieu LB pendant 1h30 à 37°C sous agitation. Le culot bactérien a été repris dans 200 µL de LB et étalé sur du milieu sélectif gélosé composé de LB-Agar supplémenté de l'antibiotique de sélection (15 g/L).

6. Etude des phénotypes cancéreux

6.1. Test de prolifération cellulaire in vitro : test XTT

Le test XTT est un test colorimétrique de viabilité cellulaire qui permet de suivre la prolifération cellulaire *in vitro*. Ce test colorimétrique permet de détecter les activités métaboliques cellulaires et la prolifération. Pendant le test, le sel XTT [2.3-bis(2methoxy-4nitro-5-sulfophenyl)-2H-tetrazolium-5-carboxanilide], disodium salt] jaune est réduit en formazan plus coloré par des déshydrogénases dans les cellules métaboliquement actives et viables.

Les différents lignées B16-F10 ont étéensemencées à 2000 cellules/puits en plaque 96 puits fond plat dans 100 µL de milieu complet. La solution de XTT (FluoProbes®) a été préparée à 1 mg/mL dans du milieu de culture et supplémenté d'un agent de couplage électronique le PMS (phenazine metosulfate) à 10 µM final. Le jour de la mesure, 50 µL du réactif XTT à 1mg/mL-PMS a été ajouté directement dans chaque puits et incubé 2 h à 37°C dans l'incubateur sous atmosphère humide. Après incubation, la plaque a été lue à 450 nm pour mesurer la formation de formazan coloré à l'aide d'un lecteur de plaque.

6.2. Croissances tumorales in vivo dans des souris et extractions des lymphocytes infiltrant les tumeurs

Pour induire la formation d'une tumeur solide, 2×10^5 cellules issues des lignées B16-F10 reprises dans 50 µl de PBS ont été injectées en sous-cutanée sur le flanc droit des souris C57BL/6 ou SCID. Toutes les manipulations ont été conduites selon les directives du comité d'éthique de l'Université de Bourgogne Franche-Comté.

Les lymphocytes infiltrant les tumeurs ont été isolés après broyage mécanique des tumeurs réséquées grâce à l'appareil de Milteniy. Le broyat tumoral a été mélangé une solution de percoll à 20 %. Cette solution a été ajouté délicatement sur une solution de percoll à 60%. Les tubes contenant le gradient de percoll ont été centrifugés pendant 20 min à 1500 rpm en enlevant le frein mécanique de la centrifugeuse. L'anneau contenant les lymphocytes T a ensuite été aspiré. Les lymphocytes T ont ensuite été comptés et utilisés pour la cytométrie.

7. Souches murines

Les souris C57BL/6N ont été achetées chez Charles Rivers (France). Les souris, OT-II, OT-I et SCID provenaient d'élevage de l'université de Franche-Comté. L'ensemble des souris a été élevé et maintenu selon les directives de l'animalerie de l'université de Franche-Comté.

8. Cytométrie en flux

8.1. Etude de la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ OT-II et CD8⁺ OT-I : marquage au CFSE

Pour évaluer la division cellulaire des lymphocytes T, les splénocytes et les cellules des ganglions lymphatiques ont été isolées des souris C57BL/6 (H-2^b) OT-I et OT-II. La suspension cellulaire obtenue par broyage mécanique, suivi d'une filtration a été incubée dans du milieu ACK pour éliminer les globules rouges. Les cellules ont ensuite été rincées par du milieu RPMI complet supplémenté de 50 µM de β-mercaptoéthanol, puis centrifugées 5 min à 1500 rpm. Après un second rinçage au PBS, la suspension cellulaire a été concentrée à 10x10⁶ cellules/mL et mélangée au même volume de CellTrace™ (CFSE, 5(6)-carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester) à 5 µM pendant 10 min pour marquer et suivre la prolifération des lymphocytes T. Le marquage fluorescent a été arrêté par l'ajout de milieu complet. Les cellules ont ensuite été centrifugées et mises à la bonne concentration pour les co-cultures. Les co-cultures ont été réalisées en plaque 96 puits (fond en U). Les cellules dendritiques ont été co-cultivées à raison de 10 000 DC pour 100 000 cellules de la suspension cellulaire de lymphocytes T et les différentes lignées de B16-10 ont étéensemencées à raison de 100 000 B16-F10 pour 200 000 cellules de la suspension cellulaire contenant les lymphocytes T. Après 3 à 6 jours de co-culture, la prolifération des lymphocytes T a été étudiée par cytométrie en flux.

En cytométrie en flux, les lymphocytes T ont été marqués avec les anticorps anti-CD3 PercpCy5.5 (126405, Biolegend), anti-CD4 Pacific Blue (100428, Biolegend) et anti-CD8 APC (100712, Biolegend). Pour les contrôle positifs, les lymphocytes T ont été incubées soit *i*) avec des anticorps anti-CD3 (5 µg/mL) préalablement fixé sur la plaque de co-culture 2 h avant la co-culture et avec un anti-CD28 (5 µg/mL), soit *ii*) avec les peptides de l'OVALBUMINE restreint au CMH-I (OVA₂₅₇₋₂₆₄, vac-sin, Invivogen) et restreint au CMH-II (OVA₃₂₃₋₃₃₉, vac-isq, Invivogen) à 10 µg/mL directement dans le milieu ou soit *iii*) en pré-incubant les cellules dendritiques ou les cellules B16-F10 pendant 3 h dans du milieu de culture complet contenant 10 µg/mL de peptides.

Principe du marquage CFSE : le CFSE est une sonde perméable au membrane cellulaire qui va marquer le cytoplasme des cellules en se fixant de façon covalente aux protéines intracellulaires. A chaque cycle de division, une cellule mère va donner deux cellules filles dans lesquelles la fluorescence aura été divisée par deux. Ainsi, chaque nouvelle génération cellulaire va apparaitre en cytométrie en flux par un nouveaux pic qui va se décaler vers la gauche par rapport pic de la génération précédente. Les cellules ayant proliféré sont dites CFSE négatives, car la fluorescence est plus faible par rapport aux cellules n'ayant pas proliférées.

8.2. Etude de l'activation des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺

Les lymphocytes T ont été isolés et préparés comme décrit ci-dessus. L'activation des lymphocytes T a été étudiée en regardant la production d'IFN- γ par les lymphocytes T activés grâce à un marquage intracellulaire. La sécrétion d'IFN- γ par les LT a été bloquée en utilisant le kit GolgiPlug™ contenant de la brefeldin A (BD Biosciences) selon les recommandations du fournisseur pour bloquer le transport de cette cytokine. Après traitement les lymphocytes T ont été co-cultivés en plaque 96 puits (fond U) pendant 16 h puis la sécrétion d'IFN- γ a été étudiée par cytométrie en étudiant les populations de lymphocytes T OT-II CD3⁺CD4⁺IFN- γ ⁺ et les lymphocytes T OT-I CD3⁺CD8⁺IFN- γ ⁺. Brièvement, les lymphocytes T ont été lavés au PBS puis le marquage des protéines de surface a été réalisé avec les anticorps anti-CD3, anti-CD4 et anti-CD8 pendant 20 min. Les cellules ont ensuite été lavées, avant d'être fixées et perméabilisées avec les réactifs Cytofix/Cytoperm™ du kit GolgiPlug™ (BD Bioscience) selon les recommandations du fournisseur.

8.3. Etude de la fonctionnalité des lymphocytes infiltrant les tumeurs

La fonctionnalité des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ des TILs a été étudiée par cytométrie en flux en regardant l'expression de surface des marqueurs TIM3 (anticorps anti-TIM3, FITC), PD1 (anti-PD1 Pacific Blue) et PD1/TIM3 sur les lymphocytes T CD4 et T CD8. Les lymphocytes T ont été ciblés en utilisant un anti-CD3 (PercpCy5.5), un anti-CD4 (APC-Cy7) et un anti-CD8 (APC).

Résultats

1. Etude de l'adressage de l'antigène OVA fusionné aux différentes protéines ATG8 dans les autophagosomes pour favoriser la présentation de l'antigène OVA par les molécules du CMH-II

Notre hypothèse de départ était que les protéines GABARAP et GABARAPL1 pouvaient, de la même manière que LC3B, adresser un antigène aux autophagosomes et permettre ainsi à cet antigène d'être présenté par les molécules du CMH-II.

Dans un premier temps, des outils moléculaires ont été fabriqués. Ainsi, les différents plasmides d'expression codant les protéines OVA fusionnées aux différentes protéines ATG8 (GABARAP, GABARAPL1 et LC3B) ont été créés et séquencés au laboratoire. Dans un deuxième temps, nous avons utilisé comme cellule présentatrice d'antigène, les cellules B16-F10 issues d'un mélanome de souris, cellules qui expriment les molécules du CMH-I et du CMH-II lorsqu'elles sont traitées par de l'IFN- γ . Ce modèle cellulaire de présentation d'antigènes permet donc la présentation de peptides dérivés d'un antigène sur les molécules du CMH-I et II. L'antigène cellulaire couramment utilisé dans ce modèle est l'antigène OVA. Des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺ ont été modifiés génétiquement pour exprimer un TCR transgénique dans des souris OT-I et OT-II respectivement. Les LT CD8⁺ possèdent un TCR qui reconnaît spécifiquement le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SIINFKL) présent sur les molécules de CMH-I et les LT CD4⁺ ont un TCR qui reconnaît spécifiquement le peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉ (ISQAVHAAHAEINEAGR) présent sur les molécules du CMH-II. La co-culture entre les cellules B16-F10 surexprimant les antigènes OVA et les LT permet d'étudier indirectement la présentation des peptides par les molécules du CMH. En effet, si le peptide est présent à la surface des cellules B16-F10 au niveau des molécules du CMH alors les LT peuvent être activés et proliférer. La prolifération des LT a été étudiée par cytométrie en flux.

Les cellules B16-F10 ont également été choisies comme modèle pour la présentation d'antigène car ces cellules présentent une autophagie basale constitutive qui peut aussi être induite dans certaines conditions.

Tout d'abord, des lignées stables B16-F10 surexprimant les protéines de fusion OVA, OVA-LC3B, OVA-GABARAP ou OVA-GABARAPL1 ont été générées et co-cultivées avec les LT CD4⁺ OT-II et les LT CD8⁺ OT-I. Les résultats ont montré que :

- **Les lignées B16-F10 surexprimant les antigènes OVA-ATG8 ne permettent pas d'activer la prolifération des LT CD4⁺ OT-II suggérant que les antigènes OVA fusionnés aux protéines ATG8 ne sont pas envoyés dans les autophagosomes.**

- **Néanmoins, toutes les lignées B16-OVA ou B16-OVA-ATG8 peuvent activer la prolifération des LT CD8⁺ OT-I, montrant en outre que OVA ou les différentes protéines de fusion sont bien exprimées dans les cellules.**

Afin d'améliorer l'adressage de l'antigène OVA aux autophagosomes dans les cellules B16-F10, nous avons décidé de modifier les constructions plasmidiques : soit en ajoutant une étiquette (c-Myc) entre OVA et les ATG8 ou, soit en supprimant la séquence signal de sécrétion et les sites d'ubiquitination de OVA.

- **L'ajout d'une étiquette entre l'antigène OVA et les protéines ATG8, a permis d'augmenter l'adressage de l'antigène aux autophagosomes. En revanche, la limitation de la sécrétion de OVA en supprimant la séquence signal ne favorise pas l'adressage aux autophagosomes.**

Ces nouvelles constructions ont alors été utilisées pour transfecter transitoirement la lignée B16-F10 pour surexprimer transitoirement les antigènes OVA, OVA-Myc-LC3B, OVA-Myc-GABARAP ou OVA-Myc-GABARAPL1 et pour étudier l'activation des LT.

- **Cependant, ces nouvelles protéines de fusion OVA-Myc-ATG8 n'ont toujours pas permis d'activer la prolifération des LT CD4⁺ OT-II.**

La lignée B16-F10 ne semble pas être un bon modèle cellulaire pour étudier la présentation de peptides par les molécules du CMH-II. En effet, ces cellules ne sont pas des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles, elles expriment très faiblement les protéines de costimulation CD80 et CD86 (Böhm *et al*, 1998) essentielles au signal 2 d'activation des LT. Pour être activés, les LT naïfs ont besoin de différents signaux d'activation. Le premier est la reconnaissance du complexe [protéine du CMH:peptide] par leur TCR, le deuxième est généré par l'activation de la voie de costimulation et le troisième signal correspond à la production de cytokines activatrices par les cellules présentatrices d'antigènes. Ainsi, les cellules B16-F10 ne produisent pas les mêmes cytokines que les CPA professionnelles qui pourraient favoriser l'activation des lymphocytes T CD4⁺.

L'ensemble de ces résultats nous a donc amené à utiliser un nouveau modèle cellulaire plus physiologique de présentation d'antigènes : la cellule dendritique. Des cultures primaires de cellules dendritiques ont été générées *ex vivo* à partir des cellules progénitrices murines de moelle osseuse (souris C57BL/6N femelles) et d'un cocktail de cytokines incluant le GM-CSF et l'IL-4.

Les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse ont été transfectées transitoirement pour pouvoir surexprimer les différentes protéines de fusion ATG8. Les cellules dendritiques ont été

transfectées par le kit JetPEI-Macrophage qui permet l'entrée de l'ADN chargé négativement dans la cellule par un polymère cationique (polyéthylèneimine (PEI)) couplé à un mannose. La première manipulation réalisée en irradiant les cellules dendritiques surexprimant les antigènes OVA-Myc-ATG8 avant leur co-culture avec les LT CD4⁺ OT-II a permis d'activer la prolifération de ces LT. Cependant les expériences reconduites ultérieurement en l'absence d'irradiation des cellules dendritiques n'ont pas permis d'observer la même prolifération des LT CD4⁺ spécifiques de l'antigène OVA. Nous n'avions au départ pas mis en cause l'irradiation des cellules dans ces observations, mais nous avons recherché la cause de cette absence de prolifération dans la maturation des cellules dendritiques et dans l'efficacité de la transfection. Ainsi, nous avons pu constater que :

- **Lorsque les cellules dendritiques sont transfectées par le kit JetPEI-Macrophage, cette méthode permet une maturation suffisante des cellules dendritiques.**
- **L'efficacité de transfection a pu être augmentée en utilisant l'électroporation.**

L'électroporation, en revanche, ne mature pas les cellules dendritiques. Nous avons donc utilisé du lipopolysaccharide pour augmenter leur maturation. Les cellules dendritiques ont été électroporées à J9 ou J6, puis utilisées en co-culture. La co-culture des cellules dendritiques surexprimant l'antigène OVA ou OVA-Myc-ATG8 (J9) avec les LT CD8⁺ OT-I a permis l'activation de leur prolifération sans augmenter celle des LT CD4⁺ OT-II. Aussi, l'utilisation de cellules dendritiques électroporées (J6) a permis d'améliorer légèrement la prolifération des LT CD4⁺ OT-II, mais surtout lorsque les cellules dendritiques surexpriment l'antigène OVA seul. Ces résultats sont à l'encontre de notre hypothèse que les protéines ATG8 peuvent augmenter la présentation d'un antigène lorsqu'elles sont fusionnées à celui-ci. La protéine OVA est une protéine sécrétée, il est donc possible que la présentation de peptide OVA soit due à l'endocytose de cette protéine par les cellules dendritiques.

Enfin, nous avons testé à nouveau le kit Jet-PEI-Macrophage mais en irradiant les cellules dendritiques pour les co-cultures. Ces expériences nous ont permis de montrer que :

- **L'utilisation des protéines GABARAP et GABARAPL1, tout comme LC3B permet d'augmenter la présentation de peptides dérivés de l'antigène OVA au LT CD4⁺ par les cellules dendritiques par rapport à l'antigènes OVA.**
- **Les antigènes OVA fusionnés aux protéines ATG8 sont envoyés aux autophagosomes et dégradés dans les lysosomes puisque le traitement par le 3-MA ou des si *Atg5* des cellules dendritiques diminue l'activation des LT CD4⁺ OT-II.**

- **L'irradiation des cellules dendritiques est essentielle à l'activation, par les cellules dendritiques, de la prolifération des LT CD4⁺.**

L'ensemble des résultats a pu aboutir à la rédaction d'un article scientifique qui est présenté ci-dessous (**Publication I**). Les résultats obtenus sur la maturation des cellules dendritiques et leur transfection par électroporation sont présentés en résultats complémentaires.

1.1. Publication I

Publication I

**“MHC-II presentation of the surrogate antigen
OVALBUMIN endogenously expressed in transfected
dendritic cells using the autophagy ATG8 fused protein”**

Leïla Fonderflick¹, Timothée Baudu¹, Olivier Adotévi^{1,2}, Michael Guittaut^{1,3},
Pascale Adami¹, Régis Delage-Mourroux^{1*}

Soumission prévue en novembre 2020 dans *Frontiers in immunology*

1 **MHC-II presentation of the surrogate antigen OVALBUMIN**
2 **endogenously expressed in transfected dendritic cells using the**
3 **autophagy ATG8 fused protein**

4 **Leïla Fonderflick¹, Timothée Baudu¹, Olivier Adotévi^{1,2}, Michael Guittaut^{1,3}, Pascale Adami¹,**
5 **Régis Delage-Mourroux^{1*}**

6 ¹Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-
7 Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France.

8 ²CHRU de Besançon, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France.

9 ³DimaCell platform, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France.

10 *** Correspondence:**

11 Pr. Régis Delage-Mourroux

12 regis.delage-mourroux@univ-fcomte.fr

13 **Keywords: Antigen presentation, Autophagy, ATG8, OVALBUMIN, CD4⁺ T cell, dendritic cell**

14 **Abstract**

15 Vaccine therapy based on DNA vaccine is a promising way of research to promote T cell immune
16 response in novel immunotherapy research. Accumulating evidence show that autophagy is involved
17 in antigen processing and presentation for CD8⁺ and CD4⁺ T cells activation. The CD4⁺ T cell response
18 is important for of anti-tumoral immunity. Studies report that the fusion between antigen and the N-ter
19 of the important autophagy protein LC3B could enhanced specific CD4⁺ T cell response. LC3B is an
20 ATG8 family member that is docked to the inner and outer of the autophagic membrane when it is
21 lipidated. Here, we hypothesized that GABARAP and GABARAPL1, other members of the ATG8
22 family protein, can also target the endogenous surrogate tumor antigen OVALBUMIN when fused, to
23 the macroautophagy pathway and enhanced MHC class II presentation. B16-F10 cell expressing OVA-
24 ATG8 fusion proteins used as antigen presenting cells failed to generate CD4⁺ T cell response but bone
25 marrow-derived dendritic cells were able to prime OVA-specific CD4⁺ T cells *in vitro*. Interestingly,
26 part of the fused proteins was also degraded by the proteasome pathway and presented by MHC class
27 I to activate CD8⁺ T cells. In the future, these fusion construction between OVALBUMIN and ATG8
28 proteins will be evaluated, *in vivo*, as candidates in vaccination trial to control tumor growth.

29 **1 Introduction**

MHC-II presentation

30 Classical and conventional paradigm pathways for antigen presentation involve the processing and
31 presentation of antigen-derived peptides from intracellular and extracellular sources by major
32 histocompatibility complex (MHC) class I and II (MHC-I and MHC-II) molecules respectively.
33 Antigen-derived peptides presented by MHC-I molecules are recognized by CD8⁺ (cytotoxic) T cells
34 while peptides presented by MHC-II are recognized by CD4⁺ (helper) T cells (Blum et al., 2013;
35 Trombetta et al., 2004).

36 Recently, accumulating evidences have demonstrated that autophagy and autophagy proteins are
37 directly involved in antigen delivery, presentation by both MHC-I and MHC-II molecules and in
38 adaptative immunity (Schmid et al., 2007; Dengjel et al., 2005; Jagannath et al., 2009; Romao et al.,
39 2013; Joubert et al., 2012; Crotzer et al., 2010; Jin et al., 2014).

40 Macroautophagy (hereafter called autophagy), is a catabolic process involved in the degradation of
41 cytosolic constituents by delivering them to lysosomes for the recycling (Klionsky et al., 2011). These
42 constituents include cytosolic long-lived proteins, damaged organelles but also intracellular pathogens.
43 All these targets are sequestered into a double membrane vesicle called autophagosome. Then,
44 autophagosomes could directly fuse with lysosomes and lysosomal hydrolases would degrade the
45 contents to produce energy. This process requires more than 30 proteins called autophagy-related
46 (ATG) proteins. Among these proteins, the ATG8 family proteins are crucial for the autophagosome
47 membrane elongation. This family is composed of two subfamilies, light chain 3 (LC3) subfamily and
48 γ -aminobutyric acid receptor associated protein (GABARAP) subfamily. LC3 subfamily includes LC3
49 form A, B and C, whereas GABARAP subfamily comprises GABARAP, GABARAPL1/GEC1
50 (GABARAP-like-1/Glandular epithelial cells 1) which was first described by our group as an estrogen
51 regulated gene (Pellerin et al., 1993), GABARAPL2 (GABARAP-like-2) and GABARAPL3
52 (GABARAP-like-3). During autophagy pathway, two forms of LC3/GABARAP proteins were
53 produced: the form I is cytosolic and the form II, covalently linked to phosphatidylethanolamine
54 (ATG8-II) is docked at the autophagic membrane. ATG8 form -II is so localized in autophagosome
55 and is correlated with autophagosome formation (Le Grand et al., 2011; Jacquet et al., 2020). The
56 autophagy pathway could also generate protein-derived peptides (Feng et al., 2014) presented by MHC
57 proteins in the cell surface.

58 The requirement for autophagy in MHC-I presentation is well established. For example, it has been
59 shown that autophagy could process the endogenous glycoprotein B (gB) antigen after HSV-1 infection
60 of antigen presenting cells (APC) (English et al., 2009). Treatment with Bafilomycin A1 (Baf-A1), a

MHC-II presentation

61 lysosomal acidification inhibitor, strongly inhibited the ability of the macrophages to stimulate gB-
62 restricted CD8⁺ T cells (English et al., 2009). Autophagy is also involved in cross-presentation of
63 exogenous antigens by MHC-I proteins in dendritic cells (Haiyan Li et al., 2011). Dendritic cells can
64 acquire antigens from phagocytosed dying cells. When these dying cells, also called antigen donor
65 cells, express a specific antigen, this antigen will be processed as every cell protein. Interesting results
66 suggested that autophagy in antigen donor cells could enhance cross-priming of CD8⁺ T cells and could
67 give protection against cancer in a model of mouse vaccination (Uhl et al., 2009; Yuhuan Li et al.,
68 2008). In addition, under specific treatments including autophagic inhibitors and proteasome inhibitors,
69 antigen donor cells can produce and release tumor-derived autophagic vesicles enriched in antigens.
70 These vesicles are an interesting and promising source of antigens for cross-presentation by DC to
71 CD8⁺ T cells and for vaccination (Twitty et al., 2011; Bo Li et al., 2009) .

72 Moreover, several studies also suggest a role of autophagy in MHC-II presentation of cytoplasmic and
73 nuclear antigens (Dengjel et al., 2005; Nimmerjahn et al., 2003; Riedel et al., 2008). For instance,
74 Schmid and collaborators (Schmid et al., 2007) showed that, the autophagic protein LC3B colocalized
75 with HLA-DM and LAMP-2 present in the MHC class II compartment (MIIC) of human dendritic, B
76 and epithelial cells (Schmid et al., 2007). In addition, MHC-II presentation to CD4⁺ T cells after antigen
77 autophagic processing has been demonstrated in different model antigens as the neomycin
78 phosphotransferase II (Nimmerjahn et al., 2003), as a self-endogenous antigen, the complement protein
79 C5 (Brazil et al., 1997), the viral-derived antigen EBNA1 (Paludan et al., 2005) or the tumor antigen
80 MUCIN-1 (Dörfel et al., 2005). However, autophagy is also implicated in the degradation of exogenous
81 antigens. For example, autophagy seems to be required for the optimized processing and presentation
82 of extracellular phagocytosed antigens through the toll-like receptor (TLR) pathway (Lee et al., 2010).
83 In fact, in a mouse model, *in vivo* conditional deletion of *Atg5* (involves in the early steps of
84 autophagosome formation) led to a defect in this processing and presentation, impairing the CD4⁺ T
85 cell response *in vivo* (Lee et al., 2010). Taken together, these works indicate that autophagy plays a
86 crucial role in the processing and presentation of various and numerous antigens by both MHC- I and
87 -II molecules to induce CD8⁺ or CD4⁺ T cell responses, respectively. These data suggest also that a
88 driven antigen-delivery into autophagosomes could be a new strategy to promote a specific immune
89 response against this antigen. Schmid and collaborators produced a fusion protein between the
90 mammalian ATG8 protein LC3 and the influenza matrix protein 1 (MP1). Then the LC3-MP1 antigen
91 was specifically delivered to the autophagosome and enhanced MCH-II protein presentation of MP1
92 derived peptides to CD4⁺ T cells by up to 20 folds without modification of the presentation of MP1 to

MHC-II presentation

93 MP1-specific CD8⁺ T cells (Schmid et al., 2007). By the same strategy, fusion between the tumor testis
94 antigen NY-ESO-1 and LC3 enhanced by up to 4-fold the presentation of NY-ESO-1 epitope on MHC-
95 II to NY-ESO-1-specific CD4⁺ T cells (Fonteneau et al., 2016). These studies demonstrated that
96 antigens could be delivered to MHC-II proteins after been processed by the autophagic pathway to
97 enhance the presentation of antigen to specific CD4⁺ T cells (Schmid et al., 2007; Fonteneau et al.,
98 2016).

99 Improving T cell response by vaccination could help for the antitumor effect desired in
100 immunotherapy. In this context, *in vitro* targeting of antigen to the autophagy pathway could enhance
101 CD4⁺ T cell response and antitumor activity of the immune system to fight against tumor cells. Cancer
102 immunotherapy clinical trials are predominantly based on cytotoxic CD8⁺ T cell response. However,
103 accumulative evidences showed that this CD8⁺ response is transient and that an efficient antitumor
104 response needs also CD4⁺ T cells (Adotévi et al., 2013; Hunder et al., 2008). So, other
105 immunotherapeutic trials try to enhance CD4⁺ T cell response for antitumoral immunity. The effect of
106 CD4⁺ T cell against tumor cells could be direct or indirect. Indeed, cytotoxic CD4⁺ T cells could
107 directly contribute to the elimination of cancer cells by killing them when tumor cells expressed MHC-
108 II. Moreover, the helper CD4⁺ T cells could enhance CD8⁺ T and Natural Killer cell responses by
109 providing for example help during priming and generation of the long-lived memory CD8⁺ T cells
110 (Ray et al., 2010; Haabeth et al., 2014; Janssen et al., 2003). So, new vaccine strategies enhancing both
111 CD4⁺ and CD8⁺ T cell responses appear to be good candidates to improve immunotherapy (Andersen
112 et al., 2016; Fonteneau et al., 2016; Yuhuan Li et al., 2011).

113 Our goal was to use autophagy to improve the processing and presentation of a surrogate tumor antigen
114 by MHC-II molecules. This work takes place in the global aim of our research group to develop new
115 vaccination strategies for anticancer immunotherapy (Dosset et al., 2012). We were particularly
116 interested to study if the other members of Atg8 family, GABARAP and GABARAPL1 proteins, can
117 be used, as LC3B, to efficiently address an antigen to the autophagic pathway in order to promote the
118 presentation of antigen on MHC-II for specific CD4⁺ T cell priming and response. To target the antigen
119 to the autophagic pathway, ATG8 proteins were fused to the C-terminus of the surrogate tumor antigen
120 model OVALBUMIN (OVA). ATG8 proteins could target the antigen to the inner autophagosome
121 when they are conjugated to a phosphatidylethanolamine, and then the antigen could be degraded by
122 autophagy pathway (Chakrama et al., 2010; Kabeya et al., 2004). In this study, we showed that B16-
123 F10 overexpressing the endogenous OVA or autophagosome membrane-bound OVA-ATG8 fusion

MHC-II presentation

124 proteins could efficiently present MHC-I-restricted OVA₂₅₇₋₂₆₄ epitope to CD8⁺ T OT-I cells
125 expressing a transgenic T-cell receptor (TCR). However, B16-F10 expressing OVA-ATG8 proteins
126 failed to activate OVA₃₂₃₋₃₃₉-restricted OT-II CD4⁺ T cells coming from OT-II mice. Nonetheless,
127 CD4⁺ OT-II T cells were indeed stimulated by bone marrow-derived dendritic cells (bmDC)
128 overexpressing the OVA-ATG8 fusion proteins. Then, our findings demonstrate for the first time that
129 GABARAP and GABARAPL1 as LC3 were able to address the OVA antigen to autophagosomes to
130 activate CD4⁺ T cells.

131 **2 Materiel and methods**

132 **2.1 Cells, Cell Culture**

133 B16-F10 cell lines (H-2^b), a murine melanoma cells, were obtained from INSERM UMR 1098
134 Laboratory. All cell lines were cultured in Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640)
135 (Dutscher, L0498) supplemented with AB (100 U/mL de penicillin, 100 µg/mL de streptomycin
136 (Dutscher, L0018), 10 % foetal calf serum (Corning, 35-079-CV) and 0.4 mg/L amphotericin B in a 5
137 % CO₂ atmosphere at 37°C.

138 Splenocytes were isolated from C57BL6 OT-I (H-2^b) and OT-II (H-2^b) mice. The total cell suspension
139 was filtrated and then, lysed using Amonium-Chlorure-Potassium Lysing buffer (ACK, Gibco,
140 A10492-01) to eliminate erythrocytes. The cells were rinsed with complete RPMI 1640 medium
141 containing FBS and Penicillin-Streptomycin.

142 **2.2 Treatments**

143 Autophagy was induced by either 4 h incubation of cells in EBSS (Sigma, ref E7510), or by the mTOR
144 rapamycin treatment for 4 h at 10 µM (Invivogen, tlr1-rap) in complete growth medium. To block the
145 fusion between autophagosomes and lysosomes different autophagic inhibitors were used:
146 Bafilomycine-A1 (Baf-A1, 100 nM, Sigma Aldrich, Ref B1793), chloroquine (CQ, 50 µM, Sigma
147 Aldrich, Ref C6628), ammonium chloride (NH₄Cl, 50 mM) for 2 or 4 h. Early stage of autophagy was
148 blocked using 3-Methyladenine (3-MA, 3 mM, Sigma Aldrich, ref M9281) for 16 h. Proteasome
149 activity was inhibited by bortezomib treatment at 25 nM for 16 h.

150 **2.3 Bone marrow Cell Culture with recombinant mouse GM-CSF and IL4 cytokines**

151 Tibias and femurs of C57BL/6 mice (female, 20 to 25 g, 8-12 weeks old, Charles River, Lyon) were
152 withdrawn and cleaned up from surrounding muscle tissue by scalpel and Kleenex tissues. Then intact

MHC-II presentation

153 bones were left in 70 % ethanol for maximum 2 min for disinfection and washed in PBS for rinsing off
 154 ethanol. After rinsing, the bones were transferred to RPMI 1640 complete culture medium containing
 155 10 % complement inactivated foetal calf serum and 1 % Penicillin-Streptomycin supplemented with
 156 50 μ M of β -mercaptoethanol. Both end of the femurs and tibias were cut with a scalpel and marrow
 157 were flushed out with complete culture using a syringe with 25 G diameter needle. Any clusters of the
 158 marrow suspension were disintegrated by vigorous pipetting. The cell suspension containing bone
 159 marrow (bm)-derived hematopoietic precursors was centrifuged at 1500 rpm for 5 min and the
 160 supernatant was removed. Erythrocytes of the cell pellet were lysed for 3 min with 1 mL of ACK
 161 Lysing buffer. After one wash with 10 mL of complete culture medium RPMI 1640, the cell suspension
 162 was centrifuged at 1500 rpm x 5 min and supernatant was removed. The bone marrow-derived dendritic
 163 cells (bmDC) were generated by culturing the bone marrow cells in Petri dishes with complete media
 164 supplemented with 5 ng/mL recombinant mouse (rm) GM-CSF (granulocyte macrophage-colony-
 165 stimulating factor, Peprotech, 315-03) and 10 ng/mL rmIL-4 (Peprotech, 214-14) at final concentration
 166 in complete culture medium for 6 days. At day 3, fresh complete medium containing 5 ng/mL rmGM-
 167 CSF and 10 ng/mL rmIL-4 was added into the dishes. At day 6, the non-adherent cells were removed
 168 and analysed by flow cytometry with a FACS Canto II using DC cell surface markers.

169 **2.4 Plasmid and Design constructs**

170 pcDNA 3.1 Hygro (+) was used as an expression vector with a CMV promotor. All cDNA of this study
 171 were cloned in this vector. The cDNA sequence of OVA was provided by the pVAX-OVA codon
 172 optimized vector (a gift from Gaëlle Vandermeulen, University of Louvain, Belgium) and cloned to
 173 pcDNA 3.1 using the preexisting *Bam*HI and *Xho*I restricted enzyme sites. The fusion protein
 174 expression vectors were produced by cloning the OVA full length sequence without stop codon in an
 175 open reading frame with the ATG8 protein coding sequence. Primers used to amplify OVA sequence
 176 including overhangs for *Nhe*I and *Bam*HI sites were, (*Nhe*I-OVA-F: 5'-
 177 GCTAGCCACCATGGGCTCTATCG-3') and *Bam*HI (BamHI-OVA-R: 5'-
 178 AAGGATCCAGGGGACACGCATCTG-3'). The cDNA encoding GABARAP was produced by
 179 PCR from a pcDNA 3.1 GFP-GABARAP vector (human GABARAP, UMR 1098 laboratory, France),
 180 by PCR. The primers contained overhangs for *Bam*HI (BamHI-GABARAP-F: 5'-
 181 CGGGATCCTTATGAAGTTCGTGTACAAAGAAG-3') and *Xho*I (XhoI-GABARAP-R: 5'-
 182 CCCTCGAGGGTCACAGACCGTAGACACTTTC-3'). cDNA encoding human GABARAPL1
 183 isolated from MCF7, was amplified by PCR with primers, including overhangs for *Bam*HI (BamHI-
 184 GABARAPL1-F: 5'-GGATCCTTATGAAGTTCAGTACAAGGAGG-3') and *Xho*I (XhoI-

GABARAP/GABARAPL1 contribution to

MHC-II presentation

185 GABARAPL1-R: 5'-CTCGAGTCACTTCCCATAGACACTCTCACTCAC-3'). cDNA encoding
186 *Rattus norvegicus* LC3B (GenBank ID: U05784)°was amplified by PCR with primers, including
187 overhangs for *Bam*HI (BamHI-LC3B-F: 5'- GGATCCTTATGCCGTCCGAGAAGACCTTC-3') and
188 *Xho*I (XhoI-LC3B-R: 5'- CTCGAGCTGTCACAAGCATGGCTCTC-3') and ptfLC3 vector as matrix
189 (Tamotsu Yoshimori Lab). Hybridization of specific overlapping primers (myc tag) with 3'OH end (
190 5'-GATCGAGCAAAGCTCATTCTGAAGAGGACTTGTC-3' and 5'-
191 GATCCACAAGTCCTCTTCAGAAATGAGCTTTTGCTC-3') in water at room temperature has
192 been performed to create compatible *Bam*HI site between OVA and ATG8 sequences. Plasmid
193 encoding OVA₂₄₂₋₃₈₆-Myc-ATG8 proteins expressed a deleted version of OVA were designed by PCR
194 using a forward primer including overhangs for *Nhe*I (NheI-242OVA-F: 5'-
195 CTAGCTAGCTAGATGCTGGTGCTGCTG-3') and the precedent reverse primers including
196 overhangs for *Xho*I specific for each ATG8 proteins. The different fusion proteins are presented Fig.
197 1.

198 2.5 DNA Transfection of B16-F10 cell lines and on bmDC and

199 500,000 B16-F10 cells were plated in 6 well plates. The day after, cells were transfected using 2 µg of
200 the different pcDNA3.1 plasmids and 4 µL Jetprime reagent (Polyplus, 114-07), according to the
201 manufacturer's protocol. The day after transfection, cells were harvested for analysis or two days later,
202 cells were plated in Petri dishes (1 x 10⁶ cells/Petri) and grown in selective complete medium
203 supplemented with 1 mg/mL of Hygromycin B (Euromedex) antibiotic until detection and
204 characterization of single clones to establish stable cell lines.

205 For transient transfection of bmDCs, JetPEI™-Macrophage reagent (Polyplus®) was used according
206 to the standard protocol. Briefly, at day 6, the non-adherent bmDC (4 x 10⁵ cells) were plated in 6 well
207 plates with complete fresh RPMI 1640 medium containing 10 ng/mL rmGM-CSF and 10 ng/mL rmIL-
208 4. Then, bmDCs were transfected at day 7 with 2 µg of the different pcDNA 3.1 plasmids for 16 to 24
209 h. At day 8, bmDCs were irradiated at 25 Gy and then used for co-culture with T cells.

210 2.6 CFSE labeling and proliferation of T lymphocytes assay

211 The splenocytes were stained with CellTrace™ 5(6)-carboxyfluorescein diacetate *N*-succinimidyl ester
212 (CFSE) for 10 min at 5 µM (Invitrogen). Then cells were washed and cultured in RPMI 1640 complete
213 medium supplemented with β-mercaptoethanol (50 µM), plated in 96 wells U bottom with bmDC at a
214 ratio of 20 000 bmDCs for 100 000 splenocytes. OVA control peptides OVA₂₅₇₋₂₆₄ (10 µg/mL, vac-sin,

MHC-II presentation

215 Invivogen), OVA₃₂₃₋₃₃₉ (10 µg/mL, vac-isq, Invivogen) and antibodies against CD3 and CD28 were
216 used as positive control. 96 wells U bottom plates were coated with CD3 antibodies (2 µg/mL) for 2 h,
217 then wash and the CD28 antibodies (5 µg/mL) were added in coculture. After 3 to 5 days, the T cells
218 were labelled with anti CD3 PercpCy5.5 (126405, Biolegend), CD4 Pacific Blue (100428, Biolegend)
219 and CD8 APC (100712, Biolegend) antibodies and proliferation was analysed by flow cytometry.

2.7 Western blotting

221 Cells were scraped and harvested in cold Phosphate-buffered saline (PBS) (137 mM NaCl, 2.7 mM
222 KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM KH₂PO₄) and lysed in Laemmli buffer (45 mM Tris-HCl, pH 6.8, 10
223 % Glycerol, 2 % SDS, 1.5 % 2-mercaptoethanol, 0.001 % bromophenol blue). Cell lysates were
224 sonicated for 10 s (Sonic and Materials, Vibra-Cell) before loading (40 µg) and then separated on a
225 10 or 12 % TGX Stain-Free™ FastCast™ polyacrylamide gel (Biorad, 1610183 (10 %) or 1610185
226 (12 %)) in running buffer at 100 V for 10 min, and then at 300 V for 30 min before being transferred
227 using Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Biorad) onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) 0.2
228 µm membrane (Bio-Rad, 162-0177) at 25 V, 2.5 mA for 7 min in transfer buffer. The membrane was
229 blocked with 5 % non-fat milk in Tris-buffered saline supplemented with Tween 20 (TBS-T) (20 mM
230 Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl, 0.1 % Tween 20) for 1 h and incubated with primary antibodies in
231 TBS-T supplemented with 1 % non-fat milk, overnight at 4°C or 5 % BSA following instructions.
232 Following three washes in TBS-T, immunoreactive bands were detected using a secondary goat
233 horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary antibodies and the Clarity Western ECL blotting
234 substrate (Biorad, 1705061). The signals were then analysed and quantified using the ChemiDoc XRS+
235 system (Biorad) and the Image Lab software (Biorad).

2.8 Immunofluorescence Microscopy

237 Cells were grown on microscopy cover glasses in 24-well plates. Cells were transfected with 0.5 µg of
238 ptf-LC3 (tandem fluorescent tagged LC3 plasmid) (Kimura et al., 2007) and 24 h post-transfection,
239 B16-F10 were treated and then fixed in 3 % paraformaldehyde in PBS for 10 min at room temperature.
240 Cover glasses were mounted onto microscope slides using Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium
241 (Sigma-Aldrich) at room temperature. Cells were pictured on an Olympus confocal microscope with a
242 60x numerical aperture oil immersion lens (Olympus), and picture are processed with the ImageJ
243 software (National Institutes of Health) using the macro RFP-GFP-LC3 to counting the number of
244 autophagosomes and autolysosomes.

MHC-II presentation245 **2.9 Mice**

246 Female C57BL/6 mice (H-2^b) were purchased from Charles River laboratory (Lyon, France). The OT-
247 I and OT-II mice were raised in the animal facility at the University of Franche-Comté and used at 8-
248 12 weeks old. The research was approved by (Id 2015-005-OA-4PR (N° du MENESR: 05085.01)),
249 and the experiments were performed in accordance with the approved guidelines and regulation.

250 **2.10 Statistical Analyses**

251 Statistical analyses were performed using GraphPad Prism version 6. Differences between were
252 analyses by student t test or one-way ANOVA test. P-values ≤ 0.05 were considered significant.

253 **3 Results**254 **3.1 B16-F10 cells as a model of antigen presenting cells of peptides processed by**
255 **macroautophagy**

256 The B16-F10 cell line was chosen to express the fusion proteins. To confirm that autophagy was active
257 in this cell model, the specific marker LC3B was analysed under basal or induced conditions. LC3B is
258 a ubiquitin-like protein covalently conjugated to a phosphatidylethanolamine *via* its C-terminal end at
259 a glycine in position G120 to form the LC3B- form II. LC3B-II is docked into the inner and outer
260 membranes of autophagosomes (Nakatogawa, 2013). After the fusion between lysosomes and
261 autophagosomes, LC3B-II present in the inner face of the autophagosomes is rapidly degraded by
262 lysosomal hydrolases. So, autophagy is a dynamic process since autophagosomes are continuously
263 formed and at the same time autophagosomes fused with lysosomes are degraded.

264 To measure the autophagic flux, the LC3B-II was quantified. To observe the LC3 turnover in
265 melanoma B16-F10 cell lines by western blotting, the fusion between autophagosomes and lysosomes
266 was inhibited with the inhibitors Baf-A1, NH₄Cl or chloroquine (CQ) for 2 h. As shown in Fig. 2A,
267 LC3B-II strongly accumulated in immunoblot upon CQ, Baf-A1 and NH₄Cl treatments of B16-F10
268 cell lines suggesting that autophagic flux is active in these cells under basal conditions (Fig. 2A).
269 Furthermore, the autophagic flux induced upon rapamycin treatment, a target of mTOR (mammalian
270 target of rapamycin) was also monitored by immunoblotting. The stronger accumulation of LC3B-II
271 under Baf-A1 treatment compared to basal conditions suggested that rapamycin treatment induced
272 autophagy in B16-F10 melanoma cells (Fig. 2B). Autophagy could also be activated by privation in
273 nutriments using the EBSS medium, but no induction of autophagy could be observed under such
274 conditions in B16-F10 cells (data not shown). To determine the effect of EBSS on the autophagic flux,

MHC-II presentation

275 we used fluorescence confocal microscopy. B16-F10 melanoma cells were transfected by ptf-LC3
 276 (tandem fluorescent-tagged LC3) (Kimura et al., 2007) to overexpress the tandem fluorescent fusion
 277 protein RFP-GFP-LC3. Before their fusion with lysosomes, autophagosomes showed a yellow colour
 278 due to GFP and RFP signals, but after the fusion, the GFP signal was lost due to lysosomal acidification
 279 and indeed, autophagosomes appeared only RFP positive. RFP-GFP-LC3 transfected B16-F10 cell
 280 lines were treated with the inhibitors of autophagosome-lysosome fusion to visualize the accumulation
 281 of both yellow autophagosomes and red autolysosomes. The higher number of autophagosomes per
 282 cell in EBSS treated B16-F10 cells compared to normal culture condition suggests an increase of
 283 autophagosome formation indicating that indeed starvation induced autophagy. The significant
 284 increase of the autolysosome number per cell confirms the increase of the autophagic flux (Fig. 2C).
 285 Taken together, these results show that B16-F10 cell line presents a basal autophagic flux and the flux
 286 could be enhanced upon rapamycin and starvation. So, this cell line could be appropriate for the
 287 delivering and lysosomal degradation of OVA when fused with ATG8 proteins.

288 In order to stimulate CD4⁺ or CD8⁺ T cells, the B16-F10 cell line must also express, at a sufficient
 289 level MCH class II and class I proteins for the OVA epitope presentation to OVA specific T cells. The
 290 T lymphocytes used in this study were isolated from OT-II and OT-I mice. These mice are transgenic
 291 for the T cell receptor. OT-II T cells detect OVA₃₂₃₋₃₃₉ in the context of the protein I-Ab (MHC-II),
 292 while OT-I T cells recognize OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide in the context of H2-Kb (MHC-I). We assessed the
 293 MCH presentation by flow cytometry and the results were presented fig. 3A and B. The B16-F10 cells
 294 expressed Kb class I MCH proteins at a basal level but at a barely detectable level of the I-A class II
 295 proteins. Nevertheless, when the cells were previously incubated with IFN- γ , the expression level of
 296 both class I and class II proteins was strongly induced and 100% of the cells became positive. This
 297 expression level appeared strong enough to prime T cells since, when directly incubated with the
 298 antigenic epitope (i.e peptide OVA₃₂₃₋₃₃₉ for class II presentation), the B16-F10 cells were able to
 299 stimulate the proliferation of 65% of OT-II T cells. Nonetheless, IFN- γ , did not increase the autophagic
 300 flux as it has been described in other cell lines (Peiyuan Li et al., 2012). Thus, the B16-F10 cell model
 301 seemed to be appropriate for the specific targeting and processing of OVA antigen connected to ATG8
 302 proteins involving the autophagy pathway.

303 **3.2 OVA and OVA-ATG8 overexpressing B16-F10 cell lines induce MHC-I-restricted T cell**
 304 **proliferation of CD8⁺ T cells but failed to induce CD4⁺ T cell proliferation**

MHC-II presentation

305 We designed different plasmid constructions based on the fusion between the OVALBUMIN (OVA)
306 antigen cDNA and the autophagic proteins LC3B, GABARAP and GABARAPL1 cDNA. An OVA-
307 expressing plasmid was used as a control. OVA protein contains well defined MHC-I and II protein
308 binding sequences at position OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SL8 peptide, SIINFEKL, H2-Kb-restricted peptide OVA
309 class I epitope) and OVA₃₂₃₋₃₃₉ (OVA-II, ISQAVHAAHAEINEAGR, I-Ab-restricted OVA class II
310 epitope) (Fig. 1). Our hypothesis was that ATG8 proteins would address OVA to autophagosomes and
311 that the OVA antigen proteolysis would result in an increase of antigenic peptide presentation on MHC-
312 II molecules specifically to enhance OVA-II-specific CD4⁺ T cell responses. OVA derived epitope
313 presented by MHC-I and II molecules can be recognized by transgenic TCR of CD8⁺ and CD4⁺ T cells
314 isolated from OT-I and OT-II C57BL6 mice, respectively. Indeed, B16-F10 cells were transfected with
315 plasmids pcDNA 3.1 OVA, pcDNA 3.1 OVA-LC3B, pcDNA 3.1 OVA-GABARAP and pcDNA 3.1
316 OVA-GABARAPL1 to generate stable cell lines overexpressing OVA, OVA-LC3B, OVA-
317 GABARAP or OVA-GABARAPL1. Two clones for each stable cell line model were isolated by
318 western blotting: B16-OVA clones 21 and 22 (Fig. 4A), B16-OVA-GABARAP clones H and D (Fig.
319 4B), B16-OVA-LC3B clones 18 and 30 (Fig. 4C) and B16-OVA-GABARAPL1 clones 22 and 45 (Fig.
320 4D). Polyclonal anti-OVALBUMIN antibody and antibodies against LC3B, GABARAP and
321 GABARAPL1 revealed the 45 kDa band corresponding to OVA protein and 65 kDa bands
322 corresponding to the different OVA-ATG8 proteins. The expression of OVA and OVA-ATG8 proteins
323 were analysed in presence of the autophagosome-lysosome fusion inhibitor, Baf-A1 or in presence of
324 proteasome inhibitor bortezomib. Supposedly, if the fusion proteins were indeed addressed to the
325 autophagosomes for degradation, blocking the fusion between autophagosomes and lysosomes would
326 lead to an accumulation of OVA and OVA-ATG8 proteins. Inhibiting the autophagosome-lysosome
327 fusion for 4 h did generate neither an accumulation of OVA as expected since it is not supposed to be
328 degraded by lysosome, nor of OVA-GABARAP and OVA-LC3B. These results suggest that OVA-
329 LC3 and OVA-GABARAP were not sufficiently or efficiently delivered to autophagosomes for the
330 degradation to be detected (Fig. 4A, B and C). Only, solely accumulation of OVA-GABARAPL1 was
331 detected by immunoblotting (Fig. 4D). On the contrary, treatment of B16-F10 cells with bortezomib,
332 an inhibitor of proteasome, showed a strong accumulation of OVA and of the different OVA-ATG8
333 proteins indicating that the major degradation process of these fusion proteins occurred into the
334 proteasome.

335 To test their ability to induce antigen specific MHC-II restricted CD4⁺ T cell activation, the various
336 B16-F10 cells overexpressing the fusion proteins or full-length OVA as a control were co-cultivated

MHC-II presentation

337 with CD4⁺ OT-II T cells expressing a transgenic TCR specific of OVA epitopes isolated from OT-II
338 mice. Having established that macroautophagy is an active process in melanoma cell lines, we
339 hypothesized that the different OVA-AT8 antigens could access to the MIIC by delivery through
340 autolysosomes. T cell proliferation was assessed after 3 days, by flow cytometry, using a CFSE
341 labelling assay and specific CD3, CD4 and CD8 antibodies to gate on CD8⁺ and CD4⁺ T cells (Fig.
342 5A). OVA, OVA-LC3B, OVA-GABARAP and even OVA-GABARAPL1 overexpressing B16-F10
343 cell lines failed to induce a CD4⁺ OT-II cell proliferation (Fig. 5D). These results agree with the
344 previous immunoblotting results showing no autophagic degradation of OVA-LC3B and OVA-
345 GABARAP in overexpressing B16-F10 cells (Fig. 4B and C). Nevertheless, the different clones were
346 able to induce MHC-I-restricted T cell proliferation of CD8⁺ OT-I T cells to the same extent than CD8⁺
347 T cells incubated with the SL8 peptide or with anti CD3-CD28 antibodies that mimic the two
348 stimulation signal from antigen presenting cells (Fig. 5B and C). This result suggests that the different
349 OVA proteins were indeed produced, and that their proteasome degradation allowed peptides to be
350 presented by the class I CMH proteins.

351 As a last control, when the different cell lines expressing the OVA-ATG8 proteins were pulsed directly
352 with OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide for 3 h, and then rinsed, there were able to stimulate MHC-II restricted CD4⁺
353 OT-II T cells (Fig. S2 A and B). We hypothesized that, because been too highly degraded by the
354 proteasome, the chimeric OVA-ATG8 antigens were not sufficiently processed by the autophagy
355 pathway to gain access to MIIC and be presented by MHC-II molecules.

356 Firstly, considering that ATG8 proteins are relatively small proteins compared to full length
357 OVALBUMIN, there could be a steric hindrance that made ATG8 inaccessible to the modification
358 enzymes or for the docking into the membrane. Secondly, the OVA-ATG8 protein may aggregate and
359 be immediately degraded by the proteasome as we demonstrated it or, thirdly, part of the protein is
360 secreted and not available to participate to the autophagy process. Therefore, we designed new
361 expression plasmids encoding fusion proteins somewhat modified. We added a linker sequence
362 between ovalbumin and ATG8. A Myc tag sequence was chosen to get ATG8 slightly away from OVA.
363 In an alternative strategy, we chose to clone ovalbumin cDNA without the first N terminal 241 amino-
364 acyl coding sequence to get rid of the leader sequence responsible of the secretion. Nevertheless, the
365 truncated form of OVA kept MHC-I and II epitopes (Fig. 1).

MHC-II presentation

366 **3.3 The chimeric OVA-Myc-ATG8 proteins were better delivered to the autophagosomes**
 367 **whereas the 242OVA-Myc-ATG8 proteins were not. Both kinds were still unable to**
 368 **stimulate OT-II T cells.**

369 To examine the intracellular turnover of full-length OVA-Myc-ATG8 or the deleted 242OVA-Myc-
 370 ATG8 proteins (Fig. 1), B16-F10 cells were transiently transfected with plasmid encoding OVA, OVA-
 371 Myc-ATG8 or 242OVA-Myc-ATG8 before treatment with inhibitors of autophagy or inhibitors of
 372 proteasome. Western blotting of cell lysates revealed that Baf-A1 treatment enhanced significantly
 373 the level of the new fusion antigens OVA-Myc-LC3B, OVA-Myc-GABARAP and OVA-Myc-
 374 GABARAPL1 confirming that the proteins were indeed targeted into the autophagosomes (Fig. 6A
 375 and B). So, with these new constructions encoding OVA-Myc-ATG8 antigens, OVA appeared to be
 376 better addressed to the autophagosomes than the previous OVA-ATG8 antigens. Bortezomib treatment
 377 led to similar accumulation of proteins showing that at least part of the protein was still degraded by
 378 the proteasome. In contrast, the deletion of the 241 N-terminal amino acids of OVA did not improve
 379 the targeting of OVA and the protection of the 242OVA-Myc-ATG8 antigens against the degradation
 380 by the proteasome (Fig. 6C and D). It is also to note that the expression level was weak and that the
 381 protein, probably because of conformational instability, was mostly degraded by the proteasome.

382 B16-F10 were transfected with the different OVA-Myc-ATG8 and 242OVA-Myc-ATG8 to study the
 383 ability of these fusion protein to induce antigen specific MHC-I and II restricted CD8⁺ and CD4⁺ T cell
 384 activation. So transiently transfected B16-F10 were co-cultured as previously described in results and
 385 T cell proliferation was assessed after 3 days by flow cytometry using CFSE labelling assay. OVA,
 386 OVA-Myc-LC3B, OVA-Myc-GABARAP and OVA-Myc-GABARAPL1, 242OVA-Myc-LC3B,
 387 242OVA-Myc-GABARAP, 242OVA-Myc-GABARAPL1 expressing B16-F10 cell lines induced
 388 MHC-I-restricted OT-I T cell proliferation of CD8⁺ T cells to the same extent as T cells incubated with
 389 the peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SL8) and B16-F10 pulsed for 3 h with the peptides SL8 (Fig. 7A and B).
 390 However, the same chimeric OVA-ATG8-expressing B16-F10 did not induce MHC-II-restricted CD4⁺
 391 OT-II T cell proliferation as we could have expected (Fig. 7C). These data led us to believe that the
 392 use of a more physiological model of antigen presentation would be more suitable for studying OVA
 393 presentation by MHC-II molecules. *In vivo*, the antigen presentation function is dedicated to
 394 professional antigen presenting cells i.e dendritic cells which have the capacity to deliver the 2 signals
 395 necessary for priming naïve T cells and engage them to proliferation and differentiation. Thus, dendritic
 396 cells were obtained from C57BL6/N mouse bone marrow cells which were differentiated in the

MHC-II presentation

397 presence of recombinant mouse rmGMCSF and rmIL4 and used at day 7 for transfection with the
398 different expression plasmids to study presentation of OVA derived peptides by both MHC-I and II.

399 **3.4 Bone marrow dendritic cells overexpressing OVA-Myc-ATG8 induce both MHC-II and**
400 **MHC-I-restricted T cell activation.**

401 The autophagy process was analysed in primary culture of mouse bone-marrow derived dendritic cells
402 (bmDC). More than 50 % of bmDC after differentiation expressed MHC class II⁺ and Cd11c⁺ and can
403 be already used for experiment assay (data not shown). As usual, LC3B-II turnover was followed by
404 western blotting in presence or absence of Baf-A1, NH₄Cl or CQ. As shown in Fig. 8A and B, LC3B-
405 II strongly accumulated in immunoblotting upon CQ, Baf-A1 and NH₄Cl of bmDC suggesting that
406 autophagic flux is active in bmDC. Furthermore, bmDC endogenously expressed GABARAP and
407 GABARAPL1 proteins. Blockage of autophagic flux led to an accumulation of GABARAP-II
408 suggesting that GABARAP, as well as LC3B could be docked on the autophagosome membrane
409 (Figure 8C). The form II of GABARAPL1 was not visible here, because it was overlapped by the
410 GABARAP bands on the western blot.

411 Being established that autophagy is an active process in bone marrow-derived dendritic cells, (Fig. 8),
412 their ability to induce antigen specific MHC-II and MHC-I restricted T cell activation was analyzed.
413 At day 7 of differentiation, bmDC were used transiently transfected with plasmid encoding OVA or
414 OVA-Myc-ATG8 (Fig. 9A and B). One day after transfection, bmDC overexpressing, OVA, OVA-
415 Myc-LC3B, OVA-Myc-GABARAP, and OVA-Myc-GABARAPL1 were harvested and irradiated
416 before co-culture with specific CD4⁺ OT-II and CD8⁺ OT-I T cells. T cell proliferation was assessed
417 after 5 days of co-culture by CFSE labelling. OVA-Myc-LC3B, OVA-Myc- GABARAP and OVA-
418 Myc-GABARAPL1-expressing bmDC induced a strong proliferation of OT-II T cells indicating that
419 finally, the OVA peptides were presented by MHC-II complex on the cell surface. The induced
420 proliferation was notably at the same level than the one induced by OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide-pulsed bmDC
421 (9A and B). The OVA overexpressing bmDC induced a very weak proliferation of OT-II CD4⁺ T cells
422 compared to OVA-Myc-ATG8 overexpressing bmDCs (9A and B). These results demonstrate that
423 OVA-Myc-ATG8 fusion constructs delivered OVA antigen to the MHC-II processing pathway. Using
424 3-Methyladenine (3-MA) treatment which is an inhibitor of phosphoinositide 3-kinases required for
425 autophagy initiation (Seglen et al., 1982), we noticed that CD4⁺ OT-II T cell proliferation was
426 diminished confirming that the processing was done into the autolysosomes. Thus, 3-MA did not affect
427 the proliferation induced by wild type OVA-expressing bmDC cell. This excluded that OVA could be

MHC-II presentation

428 partly engulf in autophagosomes as every component of the cytoplasm. It is possible that the secreted
429 OVA protein could be recaptured by endocytosis or pinocytosis. The same results on T cells activation
430 were obtained when autophagy was inhibited by siRNA targeting of *Atg5* (Fig. 9B). All experiments
431 presented in the Fig. 9 were done several times with bmDC transiently transfected with the different
432 expression plasmids, but when the irradiation step of bmDC was omitted, no proliferation of CD4⁺ T
433 cells was observed (data not shown).

434 OVA, OVA-Myc-LC3B, OVA-Myc-GABARAP, and OVA-Myc-GABARAPL1 overexpressing
435 bmDC induced MHC-I-restricted T cell proliferation of CD8⁺ OT-I T cells to the same extent as
436 peptide-pulsed bmDC (Figure 9C). Moreover, CD8⁺ OT-I T cell proliferation was unchanged under 3-
437 MA treatment (Fig. 9C).

438 Thus, presentation of OVA on MHC-II molecules to CD4⁺ OT-II T cells can be significantly enhanced
439 by targeting this antigen to autophagosomes using the fusion with LC3B but also GABARAP and
440 GABARAPL1.

441 Discussion

442 Several evidences suggest that CD4⁺ T cell plays a critical in antitumor immunity (Hung et al., 1998;
443 Schnell et al., 2000). However, different cancer immunotherapies are mainly based on the activity and
444 response of CD8⁺ T cells but the expected response could fail in the absence of CD4⁺ T cell response.
445 Indeed, tumor-specific CD4⁺ T cells could help CD8⁺ T cells in promoting their recruitment, in
446 enhancing their proliferation and in the expression of granzyme B (Bos et al., 2010). Berner and
447 collaborators (Berner et al., 2007) reported that after successful immunotherapy based on CD40 and
448 IL-2 treatment of mice bearing tumor, the CD4⁺ population was subjected to a strong apoptosis
449 dependent of IFN- γ . Mice were then unable to mount a secondary response because of the absence of
450 memory cells. Thus, these data underline the critical role that CD4⁺ T cells can play and suggest the
451 importance of improving their responses to increase the efficacy of immunotherapies in antitumor
452 immunity.

453 In this context, genetically modifying DC to express, process and present a tumor antigen by MHC-II
454 molecules represents a good strategy in immunotherapies to provide CD4⁺ T cell help. In this work,
455 we used macroautophagy to address the antigen to autophagosomes to be processed for MHC-II
456 pathway. We chose to use the complete OVA antigen instead of just specific epitopes to evaluate if
457 this strategy could be transposed to large tumor antigens for which antigenic epitopes are not defined.

MHC-II presentation

458 It open also the possibility for antigen to be presented by both MHC-I and II molecules. Here we
459 demonstrated that B16-F10 transfected with OVA cDNA fused by its C-terminus to LC3B, GABARAP
460 or GABARAPL1 elicit MHC-I-restricted CD8⁺ T cell response but not an MHC-II-restricted CD4⁺ T
461 cell response as we hypothesized. B16-F10 are not professional antigen presenting cells and these
462 melanoma cells expressed MHC-II molecules only when treated with IFN- γ . Several studies have
463 shown that peptide derived antigens from tumor could be presented by cancer cells to activate CD4⁺ T
464 cells. For example, Gp100 antigen and the mutated triosephosphate isomerase antigen-derived
465 peptides were recognised by specific CD4⁺ T cells in the context of MHC-II HLA-DR and the cancer
466 testis NY-ESO-1 antigen in the context of HLA-DP4 on melanoma cell lines (Pieper et al., 1999;
467 Robbins et al., 2002; Fonteneau et al., 2016). However, the processing pathway by which the antigens
468 could access to MHC-II molecules remained elusive and probably independent of autophagy.

469 Because melanoma B16-10 cell line are not professional antigen presenting cell, indeed they lack some
470 costimulatory molecules at their surface such as CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) (Böhm et al., 1998).
471 We used dendritic cells as professional APC upon *in vitro* differentiation of bone marrow-derived
472 dendritic cells of mice (ten Broeke et al., 2013). Indeed, a study used DC overexpressing Ii-OVA fusion
473 cDNA, with Ii the invariant chain that address OVA to MHC-II pathway through MIIC compartment
474 were effective in eliciting MHC-II-restricted T cell response in DC/T cell co-culture *in vitro* (Diebold
475 et al., 2001). This data suggest that DC are efficient *in vitro* to present the endogenous OVA expressed
476 antigen to MHC-II molecules if it is correctly delivered to MHC-II pathway. Thus, in our study bmDC
477 overexpressing OVA-Myc-LC3B, OVA-Myc-GABARAP and OVA-Myc-GABARAPL1 fusion
478 proteins after transfection were able to induce a powerful MHC-II-restricted CD4⁺ T cell proliferation
479 in DC/T cell cocultures *in vitro*. In addition, the blockage of the induction of autophagy with an
480 inhibitor drastically reduced the proliferation of MHC-II-restricted CD4⁺ T cells, suggesting that the
481 delivery of this antigens to autophagy pathway could serve as a strategy to enhance antitumoral CD4⁺
482 T cell response if a tumor antigen is used instead of OVA. Furthermore, it appears that GABARAP
483 and GABARAPL1 were as effective as LC3B to address OVA to the autophagosomes. However, it
484 was unforeseen that DC must be irradiated before the mixed lymphocyte reaction to be able to prime
485 naïve T cells. When irradiation is omitted, absolutely no T cell proliferation was observed. It is to
486 mention that we also employed irradiation in the experiments we run with B16-F10 cells without
487 success. This observation raises questions to understand what effect irradiation does on dendritic cells
488 and on their ability to stimulate naïve T cells. The answer is not yet clear and contradictory results are
489 proposed in the literature. In one hand, Cao et al, 2004 reported that 30 Gy irradiation of *in vitro*

MHC-II presentation

490 differentiated DC reduced expression of CD86, CD80 and HLA-DR. DC also showed a markedly lower
491 capacity to promote T cell proliferation and they alter the capacity of T cell to produce IL-2 and IL-4
492 cytokines (Cao et al., 2004). Merrick et al, 2005 demonstrated limited changes in surface phenotype of
493 DC which maintained their endocytic, phagocytic and migration capacities after irradiation (Merrick
494 et al., 2005). Again, irradiated DC were less efficient to stimulate proliferation in mixed lymphocyte
495 reaction than unirradiated. In the other hand, Huang et al 2011 reported that irradiation of mature DC
496 induced a stronger expression of CD70 that correlated well with the ability of these cells to stimulate
497 T cell proliferation and IFN- γ production. There was no obvious effect on the CD80, CD86 or CD40
498 expression (Huang et al., 2011). Another point to be discussed is the effect of irradiation on autophagy
499 itself in mature DC. It has been reported that irradiation produced macromolecular damage directly or
500 because of mitochondria alterations that induce generation of reactive oxygen species. Chaurasia et al.,
501 2016 reviewed the role of oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, DNA damage, altered
502 mitochondrial potential and calcium imbalance in radiation-induced autophagy (Chaurasia et al.,
503 2016). Autophagy has been studied in a model of murine macrophage cell line *in vitro* as well on
504 peritoneal macrophages *ex vivo* (Chaurasia et al., 2019). 2,5 Gy irradiation was sufficient to induce
505 autophagy as a pro-survival response against oxidative damage of macromolecules, unfolded protein
506 response and metabolic imbalances. The autophagy induction is dependant of the major signalling
507 pathways involved in the unfolded protein responses. This data suggested that by, itself, basal
508 autophagy was probably not sufficient to address efficiently the OVA peptide to the MHC class II
509 protein. Irradiation-induced autophagy may increase the density of OVA peptide at the cell surface and
510 improve the T cell stimulation. Since, as reported in several publications, it seems that the expression
511 of co-stimulatory proteins were unaffected by irradiation, only the irradiated DC were then able to
512 correctly dispense the two signals necessary for the induction of the adaptative immune response.
513 Another point to be investigated is whether DC irradiation is modulating cytokine secretion and
514 costimulatory receptor expression. Indeed, 0.05 Gy-irradiation DC enhanced the production of IL-2,
515 IL-12 and IFN- γ (Shigematsu et al., 2007). Furthermore, autophagy-mediated DC activation promoted
516 the expression of IFN- γ , IL-6, IL-12 and TNF cytokines and the APC function of DC. Inhibiting
517 autophagy in DC significantly attenuated cytokines production by CD4⁺ T cell (Morris et al., 2011).

518 We have developed several biological tools useful for further investigations. It will be necessary to
519 evaluate if the fusion antigen will be able to generate a T cell response *in vivo*. DC could be
520 differentiated *ex vivo* and transfected with our expression plasmid before being injected to C57BL6
521 mice. We could also analyse if this T cell response will be able *in vivo* to control the proliferation of

MHC-II presentation

522 our B16-F10 expressing OVA-ATG8 fusion proteins. Dying B16-OVA-ATG8 cells could be used as
 523 antigen donor cells or as autophagosome-derived vesicle (DRibbles) producer. Both cells or DRibbles
 524 will be used to immunize mice and the evaluation of the immune response they generate will be acted
 525 on the tumor growth. If all these investigations were successful, we must consider the better way to
 526 administrate the antigen. DNA-based vaccine could be a promising solution for pre-clinical
 527 investigations.

528 **4 References**

- 529 Adotévi, O., Dosset, M., Galaine, J., Beziaud, L., Godet, Y. and Borg, C., Targeting Antitumor CD4
 530 Helper T Cells with Universal Tumor-Reactive Helper Peptides Derived from Telomerase for
 531 Cancer Vaccine, *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, vol. **9**, no. 5, pp. 1073–77, May 1,
 532 2013. DOI: 10.4161/hv.23587
- 533 Andersen, A. N., Landsverk, O. J., Simonsen, A., Bogen, B., Corthay, A. and Øynebråten, I.,
 534 Coupling of HIV-1 Antigen to the Selective Autophagy Receptor SQSTM1/P62 Promotes T-
 535 Cell-Mediated Immunity, *Frontiers in Immunology*, vol. **7**, from
 536 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4861724/>, May 10, 2016. DOI:
 537 10.3389/fimmu.2016.00167
- 538 Berner, V., Liu, H., Zhou, Q., Alderson, K. L., Sun, K., Weiss, J. M., Back, T. C., et al., IFN-Gamma
 539 Mediates CD4+ T-Cell Loss and Impairs Secondary Antitumor Responses after Successful
 540 Initial Immunotherapy, *Nature Medicine*, vol. **13**, no. 3, pp. 354–60, March 2007. DOI:
 541 10.1038/nm1554
- 542 Blum, J. S., Wearsch, P. A. and Cresswell, P., Pathways of Antigen Processing, *Annual Review of*
 543 *Immunology*, vol. **31**, no. 1, pp. 443–73, March 21, 2013. DOI: 10.1146/annurev-immunol-
 544 032712-095910
- 545 Böhm, W., Thoma, S., Leithäuser, F., Möller, P., Schirmbeck, R. and Reimann, J., T Cell-Mediated,
 546 IFN-Gamma-Facilitated Rejection of Murine B16 Melanomas, *Journal of Immunology*
 547 (*Baltimore, Md.: 1950*), vol. **161**, no. 2, pp. 897–908, July 15, 1998.
- 548 Bos, R. and Sherman, L. A., CD4+ T Cell Help in the Tumor Milieu Is Required for Recruitment and
 549 Cytolytic Function of CD8+ T Lymphocytes, *Cancer Research*, vol. **70**, no. 21, pp. 8368–77,
 550 November 1, 2010. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-10-1322
- 551 Brazil, M. I., Weiss, S. and Stockinger, B., Excessive Degradation of Intracellular Protein in
 552 Macrophages Prevents Presentation in the Context of Major Histocompatibility Complex
 553 Class II Molecules, *European Journal of Immunology*, vol. **27**, no. 6, pp. 1506–14, June 1997.
 554 DOI: 10.1002/eji.1830270629
- 555 Broeke, T. ten, Wubbolts, R. and Stoorvogel, W., MHC Class II Antigen Presentation by Dendritic
 556 Cells Regulated through Endosomal Sorting, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*,
 557 vol. **5**, no. 12, accessed August 16, 2020, from
 558 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3839614/>, December 2013. DOI:
 559 10.1101/cshperspect.a016873
- 560 Cao, M.-D., Chen, Z.-D. and Xing, Y., Gamma Irradiation of Human Dendritic Cells Influences
 561 Proliferation and Cytokine Profile of T Cells in Autologous Mixed Lymphocyte Reaction,

MHC-II presentation

- 562 *Cell Biology International*, vol. **28**, no. 3, pp. 223–28, 2004. DOI:
563 10.1016/j.cellbi.2003.12.006
- 564 Chakrama, F. Z., Seguin-Py, S., Le Grand, J. N., Fraichard, A., Delage-Mourroux, R., Despouy, G.,
565 Perez, V., Jouvenot, M. and Boyer-Guittaut, M., GABARAPL1 (GEC1) Associates with
566 Autophagic Vesicles, *Autophagy*, vol. **6**, no. 4, pp. 495–505, May 2010. DOI:
567 10.4161/auto.6.4.11819
- 568 Chaurasia, M., Bhatt, A. N., Das, A., Dwarakanath, B. S. and Sharma, K., Radiation-Induced
569 Autophagy: Mechanisms and Consequences, *Free Radical Research*, vol. **50**, no. 3, pp. 273–
570 90, 2016. DOI: 10.3109/10715762.2015.1129534
- 571 Chaurasia, M., Gupta, S., Das, A., Dwarakanath, B. S., Simonsen, A. and Sharma, K., Radiation
572 Induces EIF2AK3/PERK and ERN1/IRE1 Mediated pro-Survival Autophagy, *Autophagy*,
573 vol. **15**, no. 8, pp. 1391–1406, 2019. DOI: 10.1080/15548627.2019.1582973
- 574 Crotzer, V. L. and Blum, J. S., Autophagy and Adaptive Immunity, *Immunology*, vol. **131**, no. 1, pp.
575 9–17, September 2010. DOI: 10.1111/j.1365-2567.2010.03321.x
- 576 Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Müller, M., Kreymborg, K., et al.,
577 Autophagy Promotes MHC Class II Presentation of Peptides from Intracellular Source
578 Proteins, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,
579 vol. **102**, no. 22, pp. 7922–27, May 31, 2005. DOI: 10.1073/pnas.0501190102
- 580 Diebold, S. S., Cotten, M., Koch, N. and Zenke, M., MHC Class II Presentation of Endogenously
581 Expressed Antigens by Transfected Dendritic Cells, *Gene Therapy*, vol. **8**, no. 6, pp. 487–93,
582 March 2001. DOI: 10.1038/sj.gt.3301433
- 583 Dörfel, D., Appel, S., Grünebach, F., Weck, M. M., Müller, M. R., Heine, A. and Brossart, P.,
584 Processing and Presentation of HLA Class I and II Epitopes by Dendritic Cells after
585 Transfection with in Vitro-Transcribed MUC1 RNA, *Blood*, vol. **105**, no. 8, pp. 3199–3205,
586 April 15, 2005. DOI: 10.1182/blood-2004-09-3556
- 587 Dosset, M., Godet, Y., Vauchy, C., Beziaud, L., Lone, Y. C., Sedlik, C., Liard, C., et al., Universal
588 Cancer Peptide-Based Therapeutic Vaccine Breaks Tolerance against Telomerase and
589 Eradicates Established Tumor, *Clinical Cancer Research*, vol. **18**, no. 22, pp. 6284–95,
590 November 15, 2012. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-12-0896
- 591 English, L., Chemali, M., Duron, J., Rondeau, C., Laplante, A., Gingras, D., Alexander, D., et al.,
592 Autophagy Enhances the Presentation of Endogenous Viral Antigens on MHC Class I
593 Molecules during HSV-1 Infection, *Nature Immunology*, vol. **10**, no. 5, pp. 480–87, May
594 2009. DOI: 10.1038/ni.1720
- 595 Feng, Y., He, D., Yao, Z. and Klionsky, D. J., The Machinery of Macroautophagy, *Cell Research*,
596 vol. **24**, no. 1, pp. 24–41, January 2014. DOI: 10.1038/cr.2013.168
- 597 Fonteneau, J. F., Brilot, F., Münz, C. and Gannagé, M., The Tumor Antigen NY-ESO-1 Mediates
598 Direct Recognition of Melanoma Cells by CD4+ T Cells after Intercellular Antigen Transfer,
599 *The Journal of Immunology*, vol. **196**, no. 1, pp. 64–71, January 1, 2016. DOI:
600 10.4049/jimmunol.1402664
- 601 Haabeth, O. A. W., Tveita, A. A., Fauskanger, M., Schjesvold, F., Lorvik, K. B., Hofgaard, P. O.,
602 Omholt, H., et al., How Do CD4(+) T Cells Detect and Eliminate Tumor Cells That Either
603 Lack or Express MHC Class II Molecules?, *Frontiers in Immunology*, vol. **5**, p. 174, 2014.
604 DOI: 10.3389/fimmu.2014.00174

MHC-II presentation

- 605 Huang, J., Wang, Q. J., Yang, S., Li, Y. F., El-Gamil, M., Rosenberg, S. A. and Robbins, P. F.,
606 Irradiation Enhances Human T Cell Function by Up-Regulating CD70 Expression on
607 Antigen-Presenting Cells in Vitro, *Journal of Immunotherapy (Hagerstown, Md. : 1997)*, vol.
608 **34**, no. 4, pp. 327–35, May 2011. DOI: 10.1097/CJI.0b013e318216983d
- 609 Hunder, N. N., Wallen, H., Cao, J., Hendricks, D. W., Reilly, J. Z., Rodmyre, R., Jungbluth, A.,
610 Gnjatic, S., Thompson, J. A. and Yee, C., Treatment of Metastatic Melanoma with
611 Autologous CD4+ T Cells against NY-ESO-1, *The New England Journal of Medicine*, vol.
612 **358**, no. 25, pp. 2698–2703, June 19, 2008. DOI: 10.1056/NEJMoa0800251
- 613 Hung, K., Hayashi, R., Lafond-Walker, A., Lowenstein, C., Pardoll, D. and Levitsky, H., The Central
614 Role of CD4+ T Cells in the Antitumor Immune Response, *The Journal of Experimental*
615 *Medicine*, vol. **188**, no. 12, pp. 2357–68, December 21, 1998.
- 616 Jacquet, M., Guittaut, M., Fraichard, A. and Despouy, G., The Functions of Atg8-Family Proteins in
617 Autophagy and Cancer: Linked or Unrelated?, *Autophagy*, vol. **0**, no. 0, pp. 1–13, April 7,
618 2020. DOI: 10.1080/15548627.2020.1749367
- 619 Jagannath, C., Lindsey, D. R., Dhandayuthapani, S., Xu, Y., Hunter, R. L. and Eissa, N. T.,
620 Autophagy Enhances the Efficacy of BCG Vaccine by Increasing Peptide Presentation in
621 Mouse Dendritic Cells, *Nature Medicine*, vol. **15**, no. 3, pp. 267–76, March 2009. DOI:
622 10.1038/nm.1928
- 623 Janssen, E. M., Lemmens, E. E., Wolfe, T., Christen, U., Herrath, M. G. von and Schoenberger, S. P.,
624 CD4+ T Cells Are Required for Secondary Expansion and Memory in CD8+ T Lymphocytes,
625 *Nature*, vol. **421**, no. 6925, pp. 852–56, February 20, 2003. DOI: 10.1038/nature01441
- 626 Jin, Y., Sun, C., Feng, L., Li, P., Xiao, L., Ren, Y., Wang, D., Li, C. and Chen, L., Regulation of SIV
627 Antigen-Specific CD4+ T Cellular Immunity via Autophagosome-Mediated MHC II
628 Molecule-Targeting Antigen Presentation in Mice, *PloS One*, vol. **9**, no. 3, p. e93143, 2014.
629 DOI: 10.1371/journal.pone.0093143
- 630 Joubert, P.-E. and Albert, M. L., Antigen Cross-Priming of Cell-Associated Proteins Is Enhanced by
631 Macroautophagy within the Antigen Donor Cell, *Frontiers in Immunology*, vol. **3**, p. 61,
632 2012. DOI: 10.3389/fimmu.2012.00061
- 633 Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y. and Yoshimori, T.,
634 LC3, GABARAP and GATE16 Localize to Autophagosomal Membrane Depending on Form-
635 II Formation, *Journal of Cell Science*, vol. **117**, no. Pt 13, pp. 2805–12, June 1, 2004. DOI:
636 10.1242/jcs.01131
- 637 Kimura, S., Noda, T. and Yoshimori, T., Dissection of the Autophagosome Maturation Process by a
638 Novel Reporter Protein, Tandem Fluorescent-Tagged LC3, *Autophagy*, vol. **3**, no. 5, pp. 452–
639 60, October 2007. DOI: 10.4161/auto.4451
- 640 Klionsky, D. J., Baehrecke, E. H., Brumell, J. H., Chu, C. T., Codogno, P., Cuervo, A. M., Debnath,
641 J., et al., A Comprehensive Glossary of Autophagy-Related Molecules and Processes (2nd
642 Edition), *Autophagy*, vol. **7**, no. 11, pp. 1273–94, November 1, 2011. DOI:
643 10.4161/auto.7.11.17661
- 644 Le Grand, J. N., Chakrama, F. Z., Seguin-Py, S., Fraichard, A., Delage-Mourroux, R., Jouvenot, M.
645 and Boyer-Guittaut, M., GABARAPL1 (GEC1): Original or Copycat?, *Autophagy*, vol. **7**, no.
646 10, pp. 1098–1107, October 2011. DOI: 10.4161/auto.7.10.15904

MHC-II presentation

- 647 Lee, H. K., Mattei, L. M., Steinberg, B. E., Alberts, P., Lee, Y. H., Chervonsky, A., Mizushima, N.,
648 Grinstein, S. and Iwasaki, A., In Vivo Requirement for Atg5 in Antigen Presentation by
649 Dendritic Cells, *Immunity*, vol. **32**, no. 2, pp. 227–39, February 26, 2010. DOI:
650 10.1016/j.immuni.2009.12.006
- 651 Li, B., Lei, Z., Lichty, B. D., Li, D., Zhang, G.-M., Feng, Z.-H., Wan, Y. and Huang, B., Autophagy
652 Facilitates Major Histocompatibility Complex Class I Expression Induced by IFN- γ in B16
653 Melanoma Cells, *Cancer Immunology, Immunotherapy*, vol. **59**, no. 2, p. 313, August 13,
654 2009. DOI: 10.1007/s00262-009-0752-1
- 655 Li, H., Li, Y., Jiao, J. and Hu, H.-M., Alpha-Alumina Nanoparticles Induce Efficient Autophagy-
656 Dependent Cross-Presentation and Potent Antitumour Response, *Nature Nanotechnology*,
657 vol. **6**, no. 10, pp. 645–50, September 18, 2011. DOI: 10.1038/nnano.2011.153
- 658 Li, P., Du, Q., Cao, Z., Guo, Z., Evankovich, J., Yan, W., Chang, Y., et al., Interferon- γ Induces
659 Autophagy with Growth Inhibition and Cell Death in Human Hepatocellular Carcinoma
660 (HCC) Cells through Interferon-Regulatory Factor-1 (IRF-1), *Cancer Letters*, vol. **314**, no. 2,
661 pp. 213–22, January 28, 2012. DOI: 10.1016/j.canlet.2011.09.031
- 662 Li, Y., Wang, L.-X., Pang, P., Cui, Z., Aung, S., Haley, D., Fox, B. A., Urba, W. J. and Hu, H.-M.,
663 Tumor-Derived Autophagosome Vaccine: Mechanism of Cross-Presentation and Therapeutic
664 Efficacy, *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for
665 Cancer Research*, vol. **17**, no. 22, pp. 7047–57, November 15, 2011. DOI: 10.1158/1078-
666 0432.CCR-11-0951
- 667 Li, Y., Wang, L.-X., Yang, G., Hao, F., Urba, W. J. and Hu, H.-M., Efficient Cross-Presentation
668 Depends on Autophagy in Tumor Cells, *Cancer Research*, vol. **68**, no. 17, pp. 6889–95,
669 September 1, 2008. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0161
- 670 Merrick, A., Errington, F., Milward, K., O'Donnell, D., Harrington, K., Bateman, A., Pandha, H., et
671 al., Immunosuppressive Effects of Radiation on Human Dendritic Cells: Reduced IL-12
672 Production on Activation and Impairment of Naïve T-Cell Priming, *British Journal of
673 Cancer*, vol. **92**, no. 8, pp. 1450–58, April 2005. DOI: 10.1038/sj.bjc.6602518
- 674 Morris, S., Swanson, M. S., Lieberman, A., Reed, M., Yue, Z., Lindell, D. M. and Lukacs, N. W.,
675 Autophagy-Mediated DC Activation Is Essential for Innate Cytokine Production and APC
676 Function with Respiratory Syncytial Virus Responses, *Journal of Immunology (Baltimore,
677 Md. : 1950)*, vol. **187**, no. 8, pp. 3953–61, October 15, 2011. DOI:
678 10.4049/jimmunol.1100524
- 679 Nakatogawa, H., Two Ubiquitin-like Conjugation Systems That Mediate Membrane Formation
680 during Autophagy, *Essays In Biochemistry*, vol. **55**, pp. 39–50, September 27, 2013. DOI:
681 10.1042/bse0550039
- 682 Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E. M., Pardoll, D. M., Bornkamm, G. W. and
683 Mautner, J., Major Histocompatibility Complex Class II-Restricted Presentation of a
684 Cytosolic Antigen by Autophagy, *European Journal of Immunology*, vol. **33**, no. 5, pp. 1250–
685 59, May 1, 2003. DOI: 10.1002/eji.200323730
- 686 Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T. and Münz, C.,
687 Endogenous MHC Class II Processing of a Viral Nuclear Antigen After Autophagy, *Science*,
688 vol. **307**, no. 5709, pp. 593–96, January 28, 2005. DOI: 10.1126/science.1104904
- 689 Pellerin, I., Vuillermoz, C., Jouvenot, M., Ordener, C., Royez, M. and Adessi, G. L., Identification
690 and Characterization of an Early Estrogen-Regulated RNA in Cultured Guinea-Pig

MHC-II presentation

- 691 Endometrial Cells, *Molecular and Cellular Endocrinology*, vol. **90**, no. 2, pp. R17-21,
692 January 1993.
- 693 Pieper, R., Christian, R. E., Gonzales, M. I., Nishimura, M. I., Gupta, G., Settlage, R. E.,
694 Shabanowitz, J., Rosenberg, S. A., Hunt, D. F. and Topalian, S. L., Biochemical
695 Identification of a Mutated Human Melanoma Antigen Recognized by CD4⁺ T Cells, *The*
696 *Journal of Experimental Medicine*, vol. **189**, no. 5, pp. 757–66, March 1, 1999.
- 697 Ray, S., Chhabra, A., Chakraborty, N. G., Hegde, U., Dorsky, D. I., Chodon, T., Euv, E. von, et al.,
698 MHC-I-Restricted Melanoma Antigen Specific TCR-Engineered Human CD4⁺ T Cells
699 Exhibit Multifunctional Effector and Helper Responses, in Vitro, *Clinical Immunology*
700 (*Orlando, Fla.*), vol. **136**, no. 3, pp. 338–47, September 2010. DOI:
701 10.1016/j.clim.2010.04.013
- 702 Riedel, A., Nimmerjahn, F., Burdach, S., Behrends, U., Bornkamm, G. W. and Mautner, J.,
703 Endogenous Presentation of a Nuclear Antigen on MHC Class II by Autophagy in the
704 Absence of CRM1-Mediated Nuclear Export, *European Journal of Immunology*, vol. **38**, no.
705 8, pp. 2090–95, August 2008. DOI: 10.1002/eji.200737900
- 706 Robbins, P. F., El-Gamil, M., Li, Y. F., Zeng, G., Dudley, M. and Rosenberg, S. A., Multiple HLA
707 Class II-Restricted Melanocyte Differentiation Antigens Are Recognized by Tumor-
708 Infiltrating Lymphocytes from a Patient with Melanoma, *Journal of Immunology (Baltimore,*
709 *Md. : 1950)*, vol. **169**, no. 10, pp. 6036–47, November 15, 2002.
- 710 Romao, S., Gasser, N., Becker, A. C., Guhl, B., Bajagic, M., Vanoaica, D., Ziegler, U., et al.,
711 Autophagy Proteins Stabilize Pathogen-Containing Phagosomes for Prolonged MHC II
712 Antigen Processing, *The Journal of Cell Biology*, vol. **203**, no. 5, pp. 757–66, December 9,
713 2013. DOI: 10.1083/jcb.201308173
- 714 Schmid, D., Pypaert, M. and Münz, C., MHC Class II Antigen Loading Compartments Continuously
715 Receive Input from Autophagosomes, *Immunity*, vol. **26**, no. 1, pp. 79–92, January 2007.
716 DOI: 10.1016/j.immuni.2006.10.018
- 717 Schnell, S., Young, J. W., Houghton, A. N. and Sadelain, M., Retrovirally Transduced Mouse
718 Dendritic Cells Require CD4⁺ T Cell Help to Elicit Antitumor Immunity: Implications for the
719 Clinical Use of Dendritic Cells, *The Journal of Immunology*, vol. **164**, no. 3, pp. 1243–50,
720 February 1, 2000. DOI: 10.4049/jimmunol.164.3.1243
- 721 Seglen, P. O. and Gordon, P. B., 3-Methyladenine: Specific Inhibitor of Autophagic/Lysosomal
722 Protein Degradation in Isolated Rat Hepatocytes, *Proceedings of the National Academy of*
723 *Sciences of the United States of America*, vol. **79**, no. 6, pp. 1889–92, March 1982. DOI:
724 10.1073/pnas.79.6.1889
- 725 Shigematsu, A., Adachi, Y., Koike-Kiryama, N., Suzuki, Y., Iwasaki, M., Koike, Y., Nakano, K.,
726 Mukaide, H., Imamura, M. and Ikehara, S., Effects of Low-Dose Irradiation on Enhancement
727 of Immunity by Dendritic Cells, *Journal of Radiation Research*, vol. **48**, no. 1, pp. 51–55,
728 January 2007. DOI: 10.1269/jrr.06048
- 729 Trombetta, E. S. and Mellman, I., Cell Biology of Antigen Processing in Vitro and in Vivo, *Annual*
730 *Review of Immunology*, vol. **23**, no. 1, pp. 975–1028, September 27, 2004. DOI:
731 10.1146/annurev.immunol.22.012703.104538
- 732 Twitty, C. G., Jensen, S. M., Hu, H.-M. and Fox, B. A., Tumor-Derived Autophagosome Vaccine:
733 Induction of Cross-Protective Immune Responses against Short-Lived Proteins through a

MHC-II presentation

734 P62-Dependent Mechanism, *Clinical Cancer Research*, vol. **17**, no. 20, pp. 6467–81, October
735 15, 2011. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-11-0812

736 Uhl, M., Kepp, O., Jusforgues-Saklani, H., Vicencio, J.-M., Kroemer, G. and Albert, M. L.,
737 Autophagy within the Antigen Donor Cell Facilitates Efficient Antigen Cross-Priming of
738 Virus-Specific CD8+ T Cells, *Cell Death and Differentiation*, vol. **16**, no. 7, pp. 991–1005,
739 July 2009. DOI: 10.1038/cdd.2009.8

740 **5 Figures legends**

741 **Figure 1: schematic presentation of the different constructs of OVA antigen included in this**
742 **study.** OVA was codon optimised and contains MHC-II and II epitope. OVA-ATG8 correspond to full
743 OVA fused to one ATG8 proteins (LC3B, GABARAP or GABARAPL1) to address OVA into
744 autophagosomes. OVA was fused to the N-ter of ATG8 protein to maintain ATG8 autophagosome
745 targeting. In OVA-Myc-ATG8 we added a Myc tag between OVA and ATG8 protein to increase
746 autophagosome targeting. 242OVA-Myc-ATG8 contains OVA amino acids (242-386) fused to the N-
747 terminus of ATG8 protein to maintain ATG8 autophagosome targeting.

748 **Figure 2: B16-F10 cell lines overexpressing OVA have high basal autophagic flux and autophagy**
749 **can be induce upon EBSS and rapamycin conditions. Gabarapl1 is highly expressed.** A) B16-F10
750 cell lines overexpressing OVA were treated with several autophagic inhibitors for 2 h: chloroquine
751 (CQ, 40 μ M); bafilomycine-A1 (Baf-A1, 100 nM) and ammonium chloride (NH₄Cl, 50 mM) to
752 determine autophagic flux. Autophagic flux was quantified by western blotting analysis of the of
753 LC3B-II protein. LC3B-II band intensities were normalized to β -actin. B). B16-F10 cell lines
754 overexpressing OVA were treated with rapamycin (Rap: 4 h, 10 μ M) in presence or in absence during
755 2 h of Baf-A1 (100 nM) (n=2). LC3B-II band intensities were normalized to β -actin. C) B16-F10 cell
756 lines overexpressing OVA were transfected with pTF vector (plasmid Tandem Fluorescent RFP-GFP-
757 LC3B) and then treated with EBSS in presence or in absence of autophagic inhibitors. Right panel: red
758 and yellow punctuations (= green + red punctuation) represent respectively autolysosomes and
759 autophagosomes. Quantification of red and yellow puncta was done with image J software. We used
760 One-way ANOVA: *: P<0,05; **: P<0,005; ***: P<0,001 (n=1 with more than 10 cells).

761 **Figure 3: B16-F10 cells treated with IFN- γ enhances MHC-I and II molecules presentation.**
762 **When loaded with OVA-II peptide (OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptides), B16-F10 cell lines can enhance CD4⁺ T**
763 **cell (OT-II) proliferation.** (A and B) B16 cell lines were treated with 100 ng/mL of IFN- γ for 72h to
764 increase expression of MHC-I and II molecules. The expression was monitored by flow cytometry. (C
765 and D) B16-F10 cell lines were pre-treated with 100 ng/mL of IFN- γ for 72 h and irradiated. Then,

MHC-II presentation

766 B16-F10 cells were pulsed with OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide (OVA-II, 10 µg/mL) for 3 h and wash before
 767 coculture. After 3 days of co-culture, the proliferation of CD3⁺CD4⁺ OT-II was measured by CFSE
 768 labelling using flow cytometry. T cells that have proliferate were CFSE negative and were expressed
 769 as a percentage of total CD3⁺CD4⁺T cells. D) Histogram of percentage of CD3⁺CD4⁺CFSE⁻ OT-II T
 770 cells that have proliferate (n=3).

771 **Figure 4: expression of OVA and OVA-ATG8 in stable cell lines using an anti-OVA and the**
 772 **different anti-ATG8 antibodies.** The different B16-F10 stable cell lines were treated with Bortezomib
 773 (25 nM) for 15 h or 2 h with Baf-A1 (Bafilomycine-A1). The lysates were analysed by western blotting.
 774 A) OVA protein expression was observed in B16-OVA clones 21 and 22 by western blotting using an
 775 anti-OVA (Millipore 1/10000). B) The fusion OVA-GABARAP (OVA-GP) protein was detected with
 776 an anti GABARAP-GABARAPL1 antibody by western blotting. C) The fusion OVA-LC3B protein
 777 was detected with an anti-LC3B (1/3000) antibody by western blotting. D) The fusion OVA-
 778 GABARAPL1 protein (OVA-GL1) was detected with an anti-GABARAPL1 (1/1000) antibody by
 779 western blotting.

780 **Figure 5: B16-F10 stable cell lines overexpressing OVA-ATG8 proteins elicit MHC-I-restricted**
 781 **OT-I CD8⁺ T cell proliferation but not an MHC-II-restricted OT-II CD4⁺ T cell proliferation.**
 782 B16-OVA 21 and B16-OVA-ATG8 cell line clones (B16 OVA-LC3B 30, B16-OVA-GABARAPL1 22,
 783 B16-OVA-GABARAP D) were cocultured during 3 days with OT-I T cells or OT-II T cells to study
 784 MHC-I and II-restricted T cell proliferation by CFSE assay. OT-I and OT-II T cell were extracted from
 785 C57BL6 OT-I and OT-II mice spleen, respectively, without CD8 and CD4 positive cellular sorting,
 786 respectively. Before, coculture, the different B16-F10 cell lines were pre-treated with 100 ng/mL of
 787 IFN-γ for 72 h to induce MHC-I and II molecule expression. A) The cellular proliferation of
 788 CD3⁺CD8⁺ OT-I (Top panel) and CD3⁺CD4⁺ OT-II (bottom panel) was measured by CFSE using flow
 789 cytometry using this gating strategy. T cells that have proliferated became CFSE negative and are
 790 expressed as a percentage of CD3⁺CD8⁺ T cells or CD3⁺CD4⁺ T cells. B) Cytometry result of OTI CD8⁺
 791 T cell proliferation representative of 3 independent experiment upon coculture with B16-F10 (negative
 792 control), the different B16-F10 cell lines overexpressing OVA, various chimeric OVA. As additional
 793 control, we used T cells only (medium), SL8 peptides (10 µgmL, OVA₂₅₇₋₂₆₄), CD3-CD28 antibodies
 794 (CD3-CD28). C) Percentage of OT-I CD8⁺ T cell that have proliferate after 3 days (n=1). D) Percentage
 795 of OT-I CD4⁺ T cell that have proliferate after 3 days of coculture at the same condition as B) but differ
 796 by positive control peptides used (OVA-II, OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptides (10 µg/mL)). D) means of triplicate

MHC-II presentation

797 values are shown \pm SD. One-way ANOVA, multiple comparison with positive control OVA-II. **:
 798 $P < 0.005$; ***: $P < 0.001$ and ****: $P < 0.0001$. Abbreviation: Medium (M): T cells only; SL8: OVA₂₅₇₋
 799 ₂₆₄ peptides; OVA-II: OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptides; CD3-CD28: T cells incubated with CD3 and CD28
 800 antibodies.

801 **Figure 6: the different OVA-Myc-ATG8 fused proteins reduced the degradation of**
 802 **OVALBUMIN by the proteasome and target OVALBUMIN to autophagosomes but not**
 803 **242OVA-Myc-ATG8 fused proteins.** A) DNA plasmids encoding OVA-Myc-ATG8 were used to
 804 transiently transfect B16-F10 cells. Twenty-four h after transfection, the cells were untreated (=Ctrl)
 805 or treated with 25 nM of Bortezomib (Brz), an inhibitor of the proteasome for 15 h. They were also
 806 treated with 100 nM of Bafilomycin-A1 (Baf-A1), an inhibitor of autophagic flux for 4 h. The lysates
 807 were analysed by western blotting using an anti-OVALBUMIN (Santa Cruz, 1/10000) antibody.
 808 Labelling with an anti- β -actin antibody was used to normalized band intensities. The experiment was
 809 performed three times, and the results were similar. B) Quantification of OVA-Myc-ATG8 band
 810 intensities normalized to β -actin and control. C) DNA plasmids encoding 242OVA-Myc-ATG8
 811 (242OMATG8) were used to transiently transfect B16-F10 cells. Twenty-four h after transfection, the
 812 cells were untreated or treated with 25 nM of Bortezomib (Brz), an inhibitor of the proteasome for 16
 813 h. They were also treated with NH₄Cl (50 mM) an inhibitor of autophagic flux for 4 h. D) Results of
 814 OVA, 242OML, 242OMGP and 242OMGL1 proteins band intensities normalized to stain free and
 815 B16-F10 242OMGP control. Error bars represent \pm SD (n=3). Statistic test: unpaired t-test. *:
 816 $P < 0.05$; **: $P < 0.005$.

817 **Figure 7: coculture of B16-F10, transiently transfected by DNA plasmids encoding OVA-Myc-**
 818 **ATG8 or 242OVA-Myc-ATG8 activate CD8⁺ T cell OT-I proliferation.** B16-F10 cells were
 819 transiently transfected by DNA plasmids encoding OVA-Myc ATG8 (OVA, OVA-Myc-LC3B (OML),
 820 OVA-Myc-GABARAP (OMGP), OVA-Myc-GABARAPL1 (OMGL1)) and 242OMyc-ATG8
 821 (242OML, 242OMGP, 242OMGL1) as presented in Fig. 1. The resulting different B16-F10 cell lines
 822 were pre-treated with 100 ng/mL of IFN γ for 72 h to increase MHC-I and II molecules expression at
 823 the cell surface. Then, B16-F10 cells were transfected and 24 h after transfection, B16-F10 were
 824 irradiated and co-cultured with CD8⁺ OT-I or OT-II T cells for 3 days. The proliferation of CD3⁺ CD8⁺
 825 OT-I or CD3⁺ CD4⁺ OT-II T cells were measured by CFSE assay using flow cytometry. A) Flow
 826 cytometry results of the proliferation of CD3⁺ CD8⁺ OT-I T cells. CD8 T cell population was defined

MHC-II presentation

827 as CD3⁺CD8⁺CFSE⁺ or CFSE⁻. T cell that have proliferated were CFSE negative and were expressed
 828 in percentage of CD3⁺CD8⁺T cells. T cell in coculture with B16-F10 or in incubation with RPMI 1640
 829 medium were negative control. Two positive controls were used: T cell in 1) incubated with SL8
 830 peptides (OVA₂₅₇₋₂₆₄ peptide) (10 µg/mL) and in 2) coculture with B16-F10 loaded during 3 h with
 831 SL8 peptides and then wash before coculture (=B16-F10 + SL8). B) Histogram percentage of CD8⁺
 832 OT-I proliferation C) Means Percentage of CD3⁺CD4⁺ OT-II T cells that have proliferated. CD4⁺ T cell
 833 population was defined as CD3⁺CD4⁺CFSE⁺. The same control as in A) were used but with OVA-II
 834 peptides (OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptide). Means percentage of CD4⁺ OT-II T cells that have proliferated was
 835 shown in quadruplicate. Error bars represent ± SD.

836 **Figure 8: dendritic cells have basal autophagic flux and autophagy can be induce using EBSS**
 837 **and rapamycin. Moreover, bmDC expressed GABARAP and GABARAPL1 proteins.** BmDC
 838 were treated with EBSS or rapamycin during 4 h as autophagic inducer (10 µM, 4h) in the presence or
 839 not during 2 h of different autophagic inhibitors: chloroquine (CQ, 40 µM); bafilomycine-A1 (Baf-A1,
 840 100 nM) et ammonium chloride (NH₄Cl, 50 mM). A) Cells lysates were analyzed by western blotting
 841 using anti-LC3B and anti-actine antibodies on 12 % TGX gel. B) Autophagic flux was quantified by
 842 western blotting analysis of LC3B-II protein bans intensities. LC3B-II band intensities were
 843 normalized to stain free band using Biorad stain free technologies. One-way ANOVA *: P<0,05; **: P<0,005;
 844 ***: P<0,001. The western blot is representative of 7 independent experiments. Error bars
 845 represent ± SD. C) The expression of GABARAP and GABARAPL1 proteins were analyzed by
 846 western blotting on 12 % TGX gel using an anti-GABARAP-GABARAPL1 antibodies.

847 **Figure 9: the bmDC transiently transfected and overexpressing OVA-Myc-ATG8 proteins**
 848 **elicited OT-II CD4⁺ T cell proliferation as well as OT-I CD8⁺ T cells.** The bmDC (C57BL/6N, H-
 849 2^b) differentiated *in vitro* upon GMCSF and IL-4 for 6 days. At day 7, bmDC were transiently
 850 transfected with DNA plasmids encoding OVA or OVA-Myc ATG8 (OVA, OVA-Myc-LC3B (OML),
 851 OVA-Myc-GABARAP (OMGP) and OVA-Myc-GABARAPL1 (OMGL1)) using JetPEI-Macrophage
 852 kit. At day 8, bmDC were irradiated and co-cultured with CD4⁺ OT-II T or CD8⁺ T cells to compare
 853 T cell proliferation using CFSE labelling. A) OT-II CD4⁺ T cell were extracted from OT-II mice spleen
 854 without CD4 positive cellular sorting. The proliferation of CD3⁺CD4⁺ OT-II T cells was measured by
 855 CFSE using flow cytometry. T cells that have proliferated became CFSE negative and are expressed
 856 as a percentage of CD3⁺CD4⁺T cells. T cells in coculture with bmDC were the negative control. Two
 857 positive controls were used: T cell directly stimulated with OVA-II peptides (10 µg/mL) and incubated

MHC-II presentation

858 with DC pulsed with OVA-II peptide (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) during 3 h before co-culture. In order to inhibit
 859 autophagy bmDC were treated with 3-MA (inhibitor of the initiation of autophagy, 3 mM) during 16
 860 h, at day 7 or cotransfected at 7 with si *Atg5*. B) Histogram representative of 5 independent experiments
 861 (n=6, Error bars represent \pm SD) using one-way ANOVA multiple comparisons test (****: $P < 0,0001$).
 862 Experiment with si Ctrl and si *Atg5* were conducted only one time. * represents the differences between
 863 the overexpressing bmDC compared to 3-MA treatment and # represents the difference between bmDC
 864 overexpressing OVA and bmDC overexpressing OVA-Myc-ATG8s. C) OT-I CD8⁺ T cell were
 865 extracted from OT-I mice spleen without CD8 positive cellular sorting. The proliferation of CD3⁺CD8⁺
 866 OT-I T cells was measured by CFSE using flow cytometry. As in A) we used the same negative control
 867 and two positive controls were used: T cell directly stimulated with SL8 peptides (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and
 868 incubated with DC pulsed with SL8 peptide (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) during 3 h before co-culture. DC were treated
 869 with 3-MA during 16 h, at day 7. Error bars represent \pm SD.

870 **Figure S1: IFN- γ treatment did not induced autophagy in B6-F10 cell lines.** B16-F10 cell lines
 871 were treated with 100 ng/mL or 150 ng/mL of IFN- γ in presence or absence of Baf-A1 (100 nM) to
 872 determine autophagic flux. Cells lysates were analyzed by western blotting using anti-LC3B and anti-
 873 actine antibodies on 12 % TGX gel. Error bars represent \pm SD.

874 **Figure S2: when loaded with OVA-II peptide (OVA₃₂₃₋₃₃₉ peptides), B16-OVA-ATG8 can
 875 enhance CD4⁺ T cell (OT-II) proliferation.** A) The different B16 cell lines were pre-treated with 100
 876 ng/mL of IFN- γ for 72 H to increase MHC-II presentation, irradiated and then pulsed with OVA₃₂₃₋₃₃₉
 877 peptide (OVA-II, 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) for 3 h and wash before coculture. After 3 days of co-culture, the
 878 proliferation of CD3⁺CD4⁺ OT-II was measured by CFSE labelling using flow cytometry. T cells that
 879 have proliferate were CFSE negative and were expressed as a percentage of total CD3⁺CD4⁺T cells.
 880 B) Histogram of percentage of CD3⁺CD4⁺CFSE⁻ OT-II T cells that have proliferate. C) and D) The
 881 different B16 cell lines were treated with 100 ng/mL of IFN- γ for 72 h to increase expression of MHC-
 882 I and II molecules. The expression was monitored by flow cytometry. Error bars represent \pm SD.

883 **6 Conflict of Interest**

884 *The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial*
 885 *relationships that could be construed as a potential conflict of interest.*

886 **7 Author Contributions**

887 Conceptualization: O.A., P.A. and R.D.-M.; investigation: L.F., T.B.; validation and original draft
 888 writing: L.F., A.P. and R.D.-M.; review and editing: O.A. and M.G.

MHC-II presentation

889 **8 Funding**

890 Leïla Fonderflick was supported by a fellowship from the “Ministère de l’Enseignement Supérieur,
891 de la Recherche et de l’Innovation (France)”. This work was supported by funding from institutional
892 grants from INSERM, EFS, and Univ. Bourgogne Franche-Comté.

893

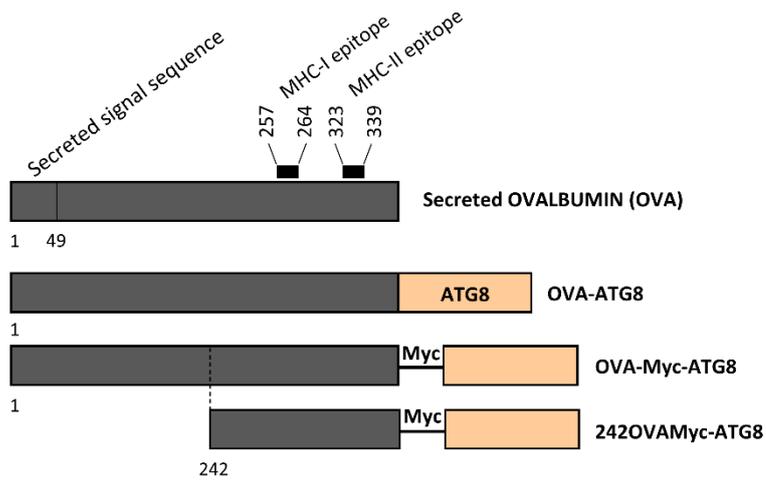


Fig. 1

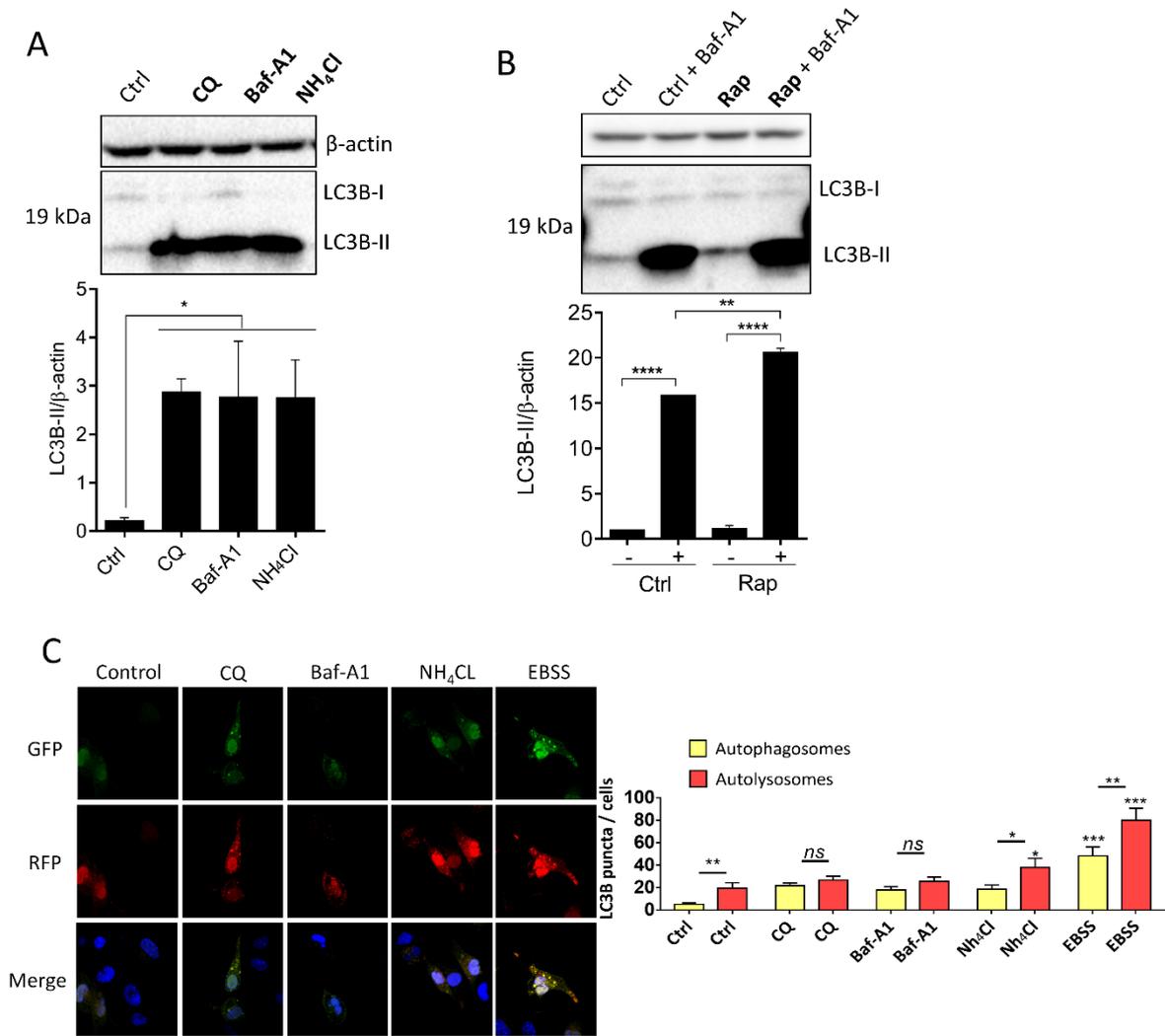


Fig. 2

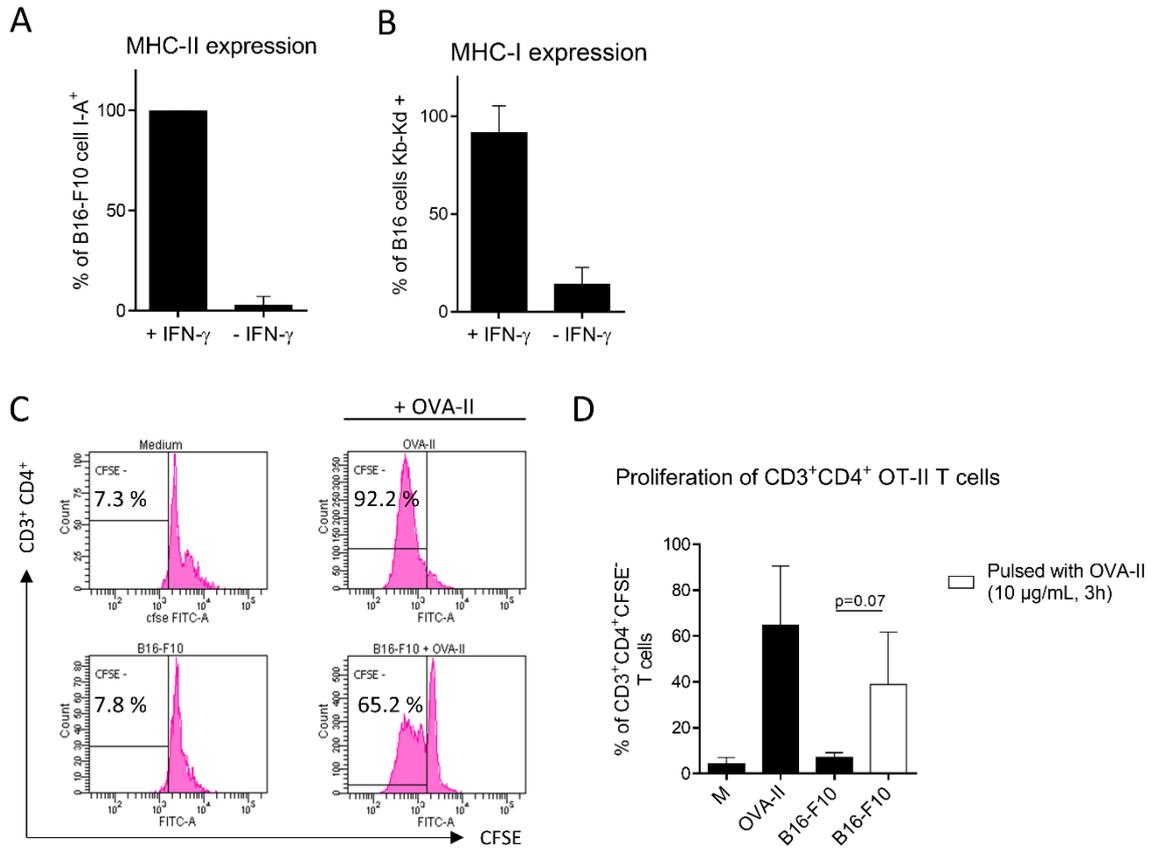


Fig. 3

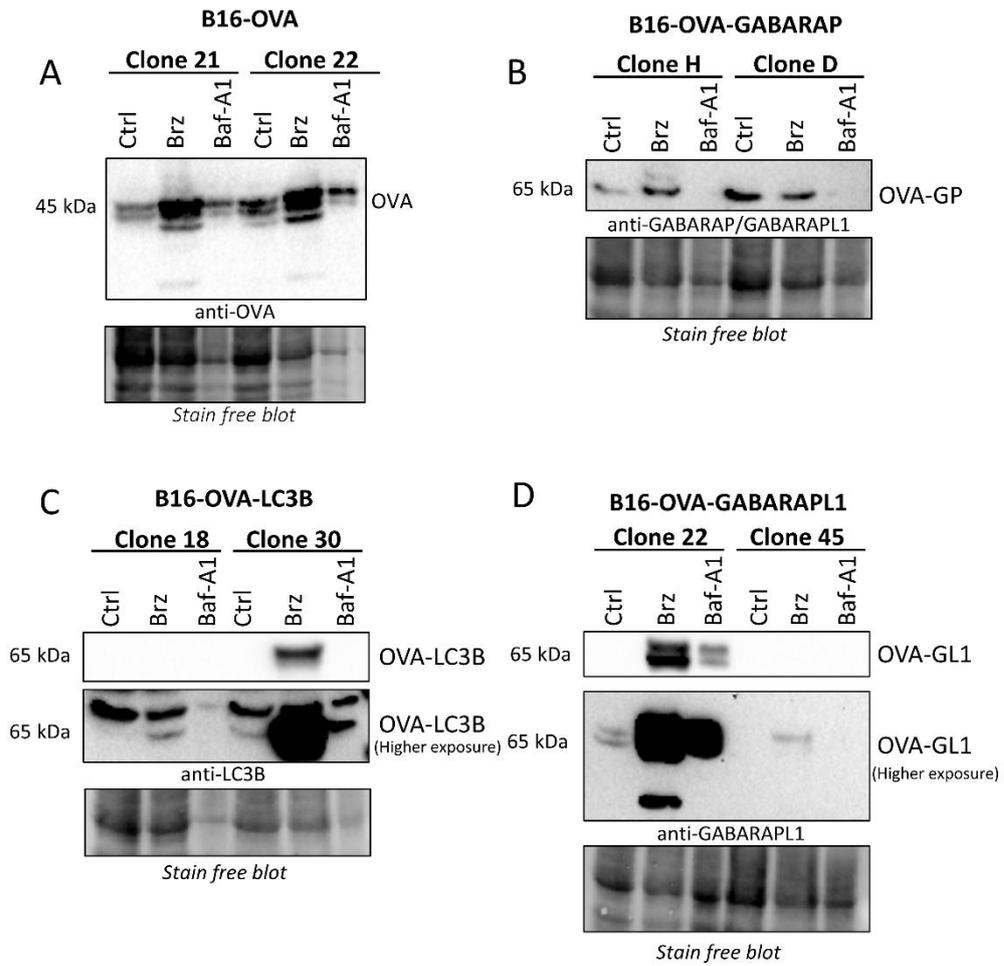


Fig. 4

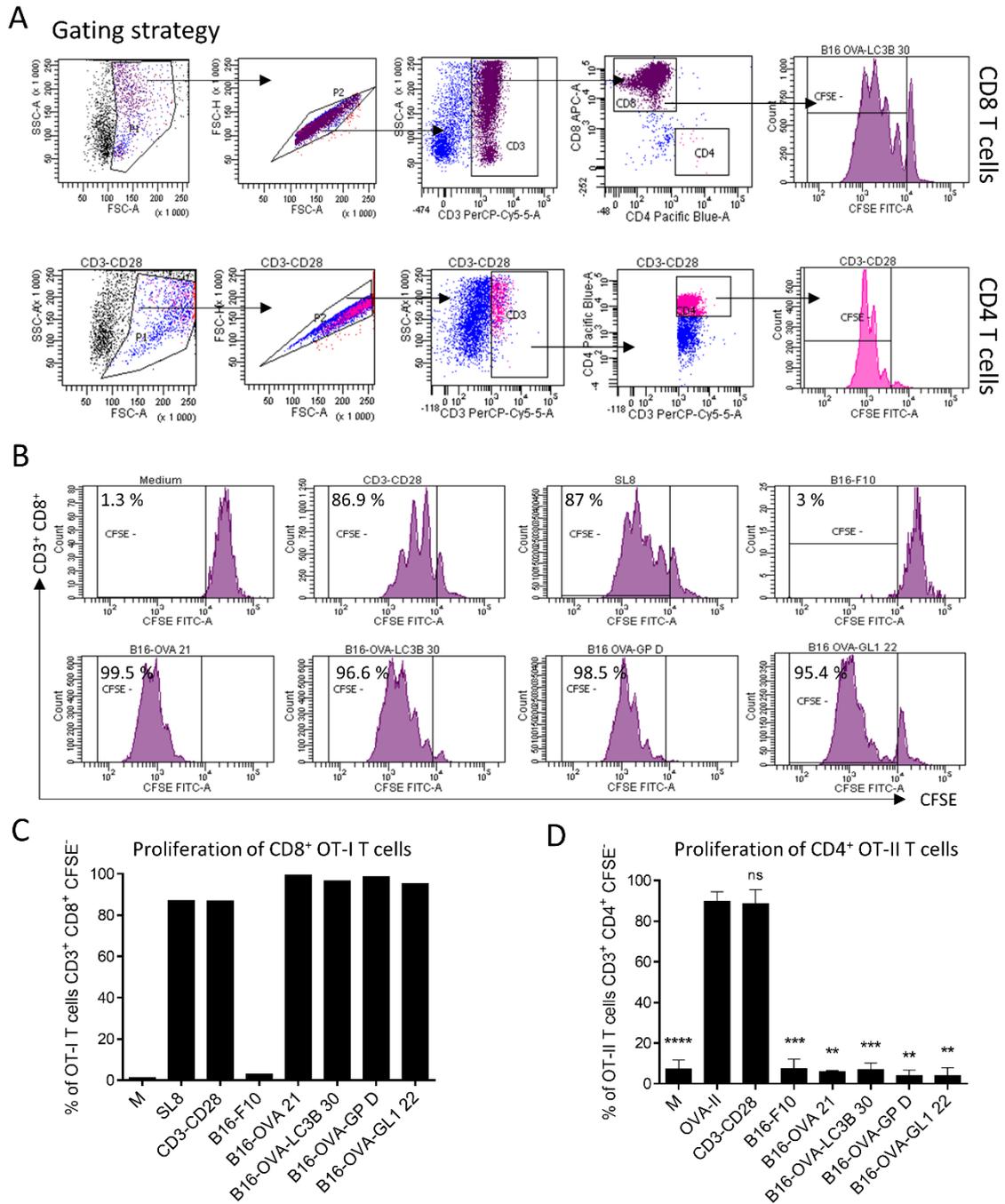


Fig. 5

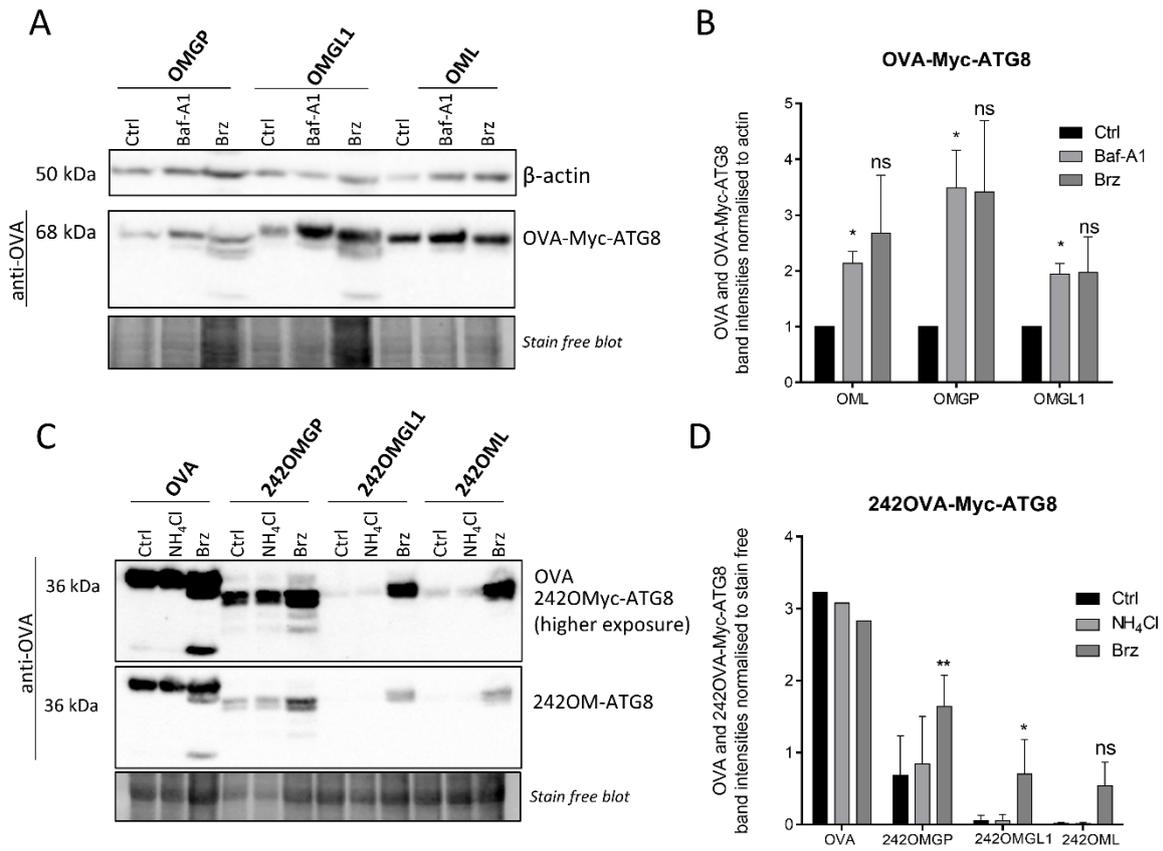


Fig. 6

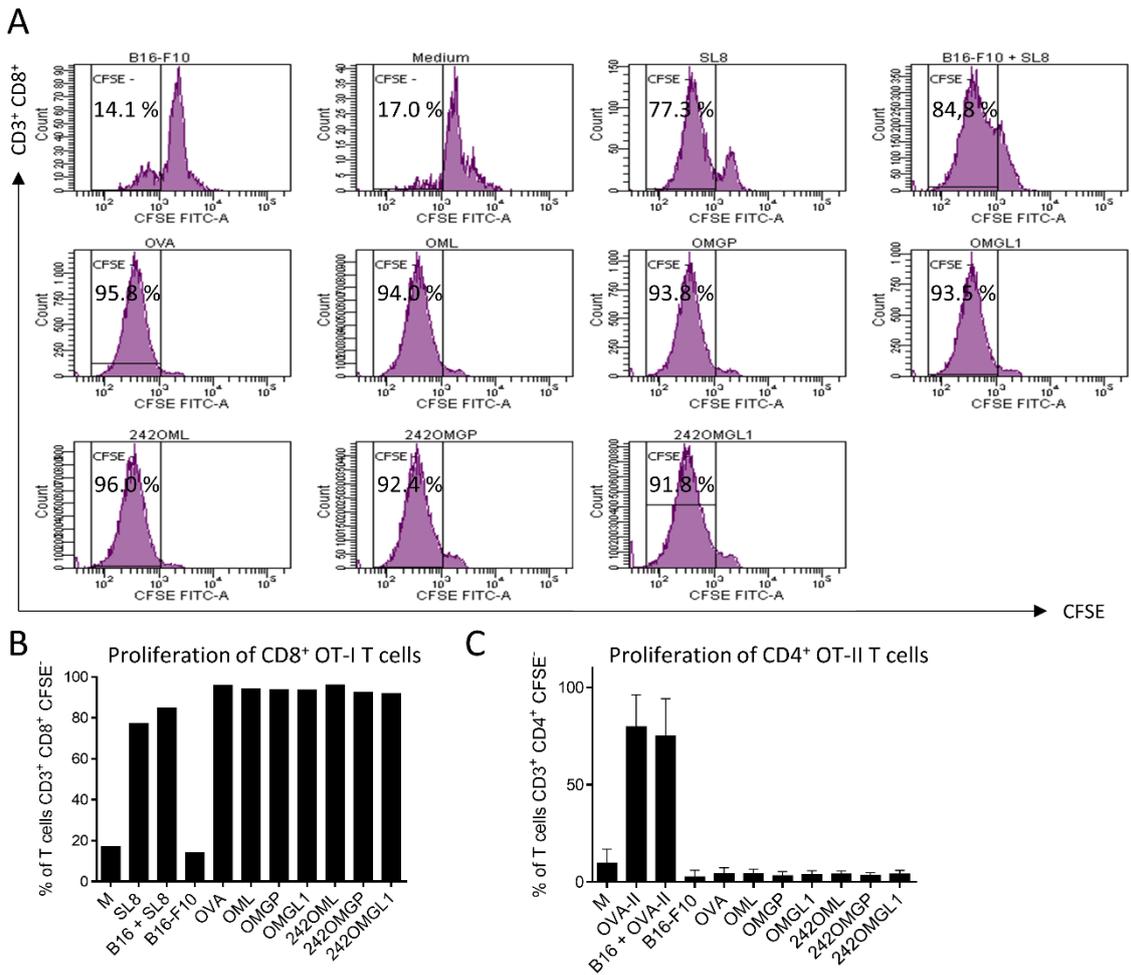


Fig. 7

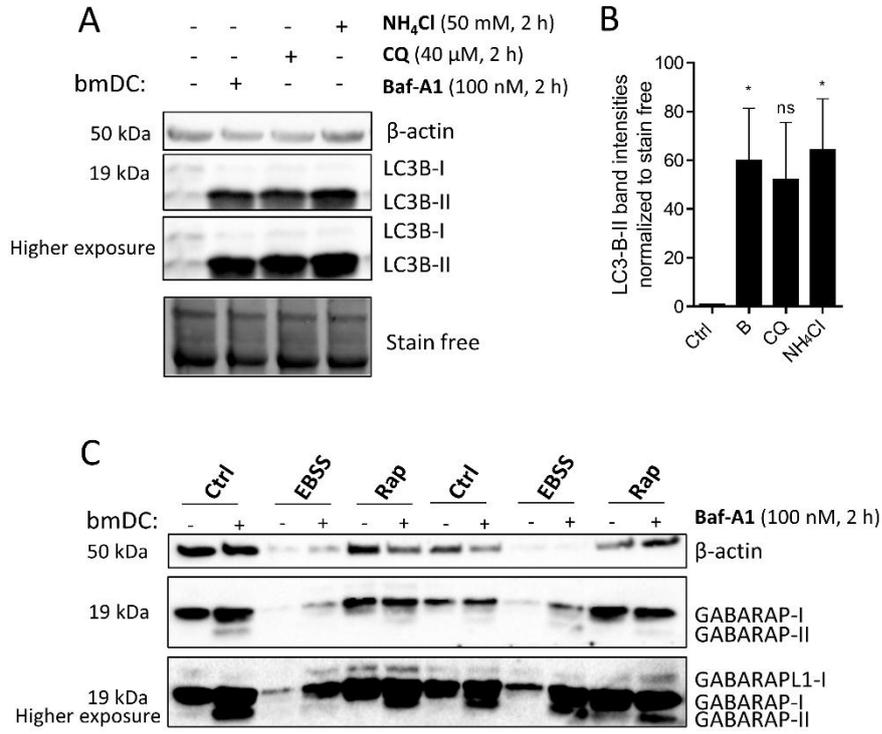


Fig. 8

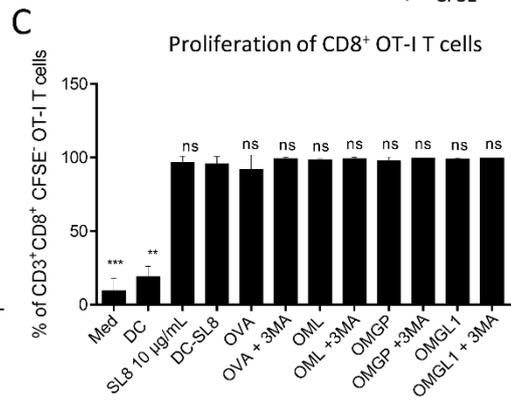
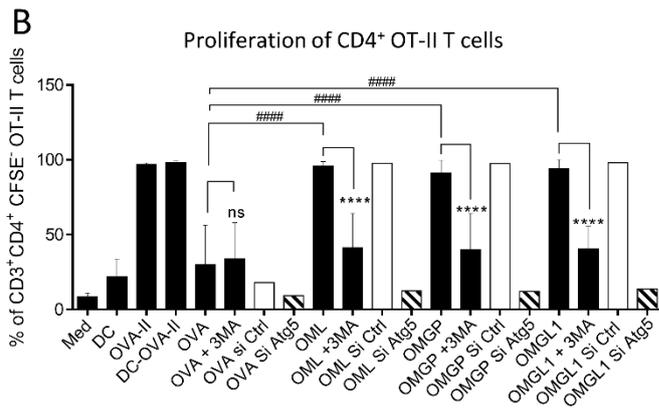
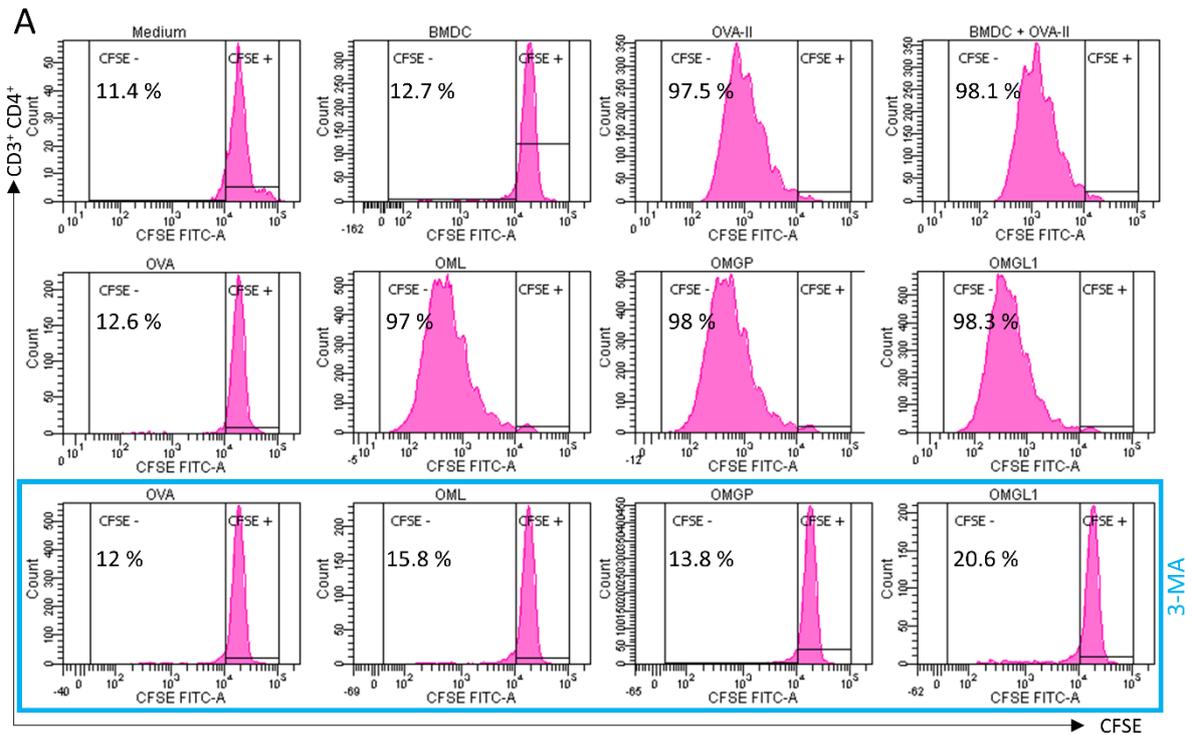


Fig. 9

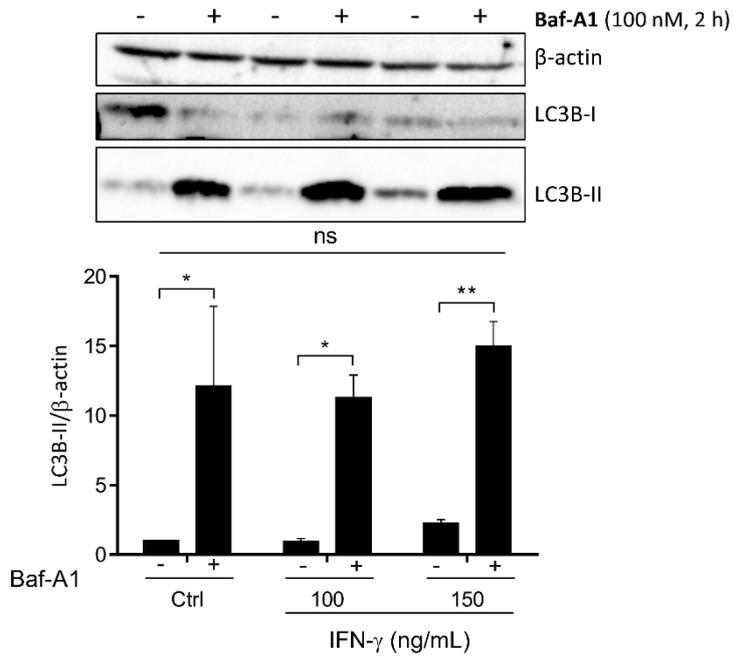


Fig. S1

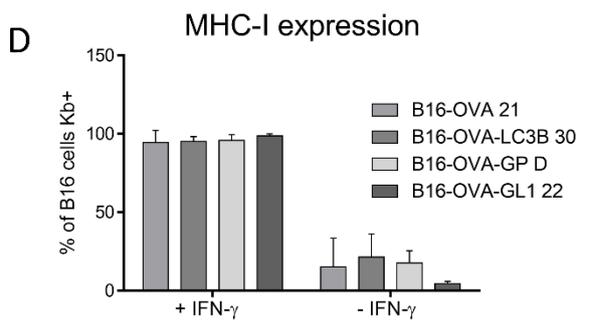
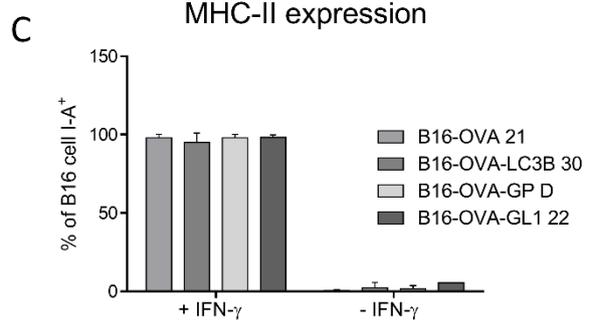
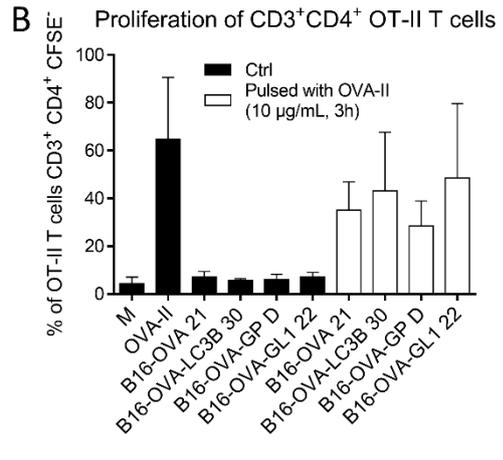
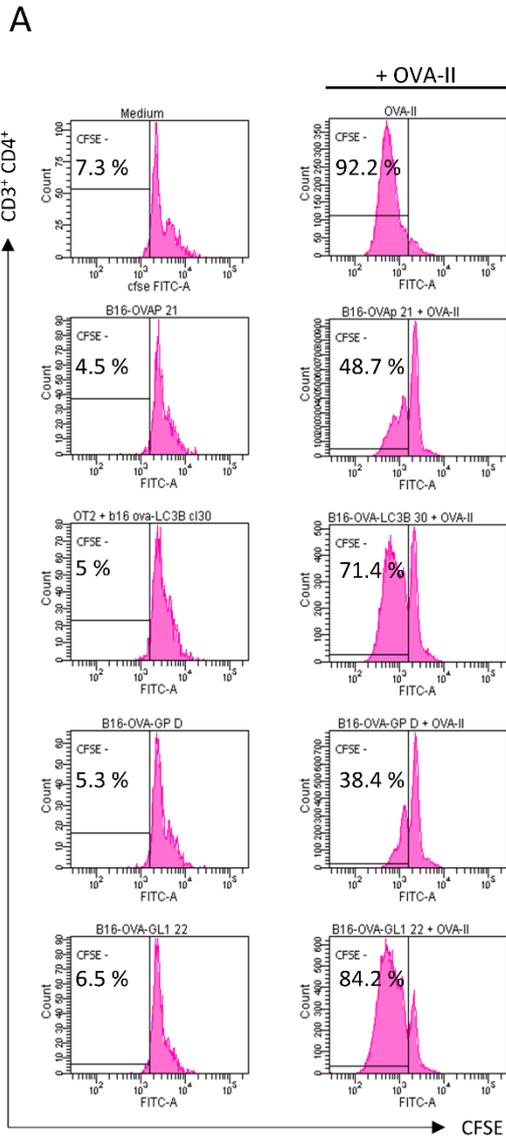


Fig. S2

1.2. Résultats complémentaires

- **L'expression des différentes protéines de fusion OVA- Myc-ATG8 dans les cellules dendritiques non irradiées ne permet pas d'activer la prolifération des LT CD4⁺ OT-II**

Dans l'article précédent, nous avons pu montrer que les cellules dendritiques surexprimant l'antigène OVA fusionné aux protéines ATG8 (OVA-Myc-ATG8) activaient davantage la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ OT-II que ceux surexprimant seulement l'antigène OVA. Dans cette expérience, les cellules dendritiques avaient été transfectées en utilisant le kit de transfection JetPEI-macrophage (Polyplus). Ce kit permet l'entrée de l'ADN dans les cellules dendritiques grâce au polymère cationique (PEI) qui se fixe à l'ADN chargé négativement. De plus, le PEI est lié à un mannose, capable de se fixer au récepteur mannose présent à la surface des cellules dendritiques améliorant l'efficacité de transfection. Après la transfection, les cellules dendritiques ont été irradiées avant la co-culture avec les lymphocytes T. Le même protocole a été initialement appliqué aux cellules dendritiques que celui utilisé pour les cellules B16-F10. L'irradiation de ces cellules était nécessaire pour ralentir leur prolifération normalement très rapide. Les données de la littérature concernant le rôle de l'irradiation sur la présentation d'antigènes par les molécules du CMH-II sont discordantes. Dans certain cas, l'irradiation des cellules présentatrices d'antigènes favorise la prolifération des lymphocytes T *in vitro* (Huang *et al*, 2011). Dans un autre cas, elle est décrite comme délétère en réduisant l'expression des protéines de costimulation (CD80 et CD86) et la sécrétion de cytokines par les cellules dendritiques *in vitro* (Cao *et al*, 2004). Ainsi, il s'est avéré dans notre cas que l'irradiation des bmDC favorisait *in vitro* la prolifération des LT CD4⁺. En effet, en absence d'irradiation, les LT CD4⁺ OT-II ne prolifèrent pas lorsqu'ils sont mis en co-culture avec les cellules dendritiques surexprimant les antigènes OVA-Myc-ATG8, 242OVA-Myc-ATG8 ou OVA seul (Figure 22A). De plus, l'inhibition de l'autophagie dans les cellules dendritiques (3-MA) ne diminue pas davantage la prolifération des LT confirmant que les LT n'avaient effectivement pas proliféré dans les conditions contrôles (figure 22A).

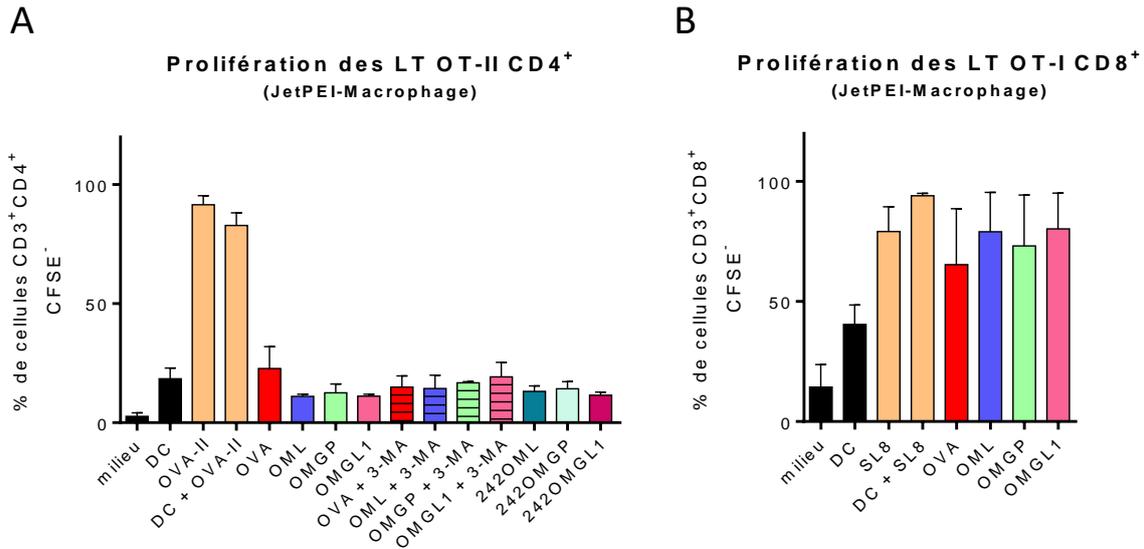


Figure 22 : La surexpression des antigènes OVA-Myc-ATG8 ou 242OVA-Myc-ATG8 dans les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (DC) n'active pas la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ (OT-II) mais active la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ (OT-I). (A et B) Les cellules dendritiques utilisées pour la co-culture avec les lymphocytes T (LT) ont été différenciées *in vitro* pendant 6 jours avant d'être transfectées le 7^{ème} jour à l'aide du kit JetPEI-Macrophage. Les cellules dendritiques ont été transfectées par des plasmides codant les antigènes OVALBUMINE (OVA), OVA-Myc-LC3B (OML), OVA-Myc-GABARAP (OMGP), OVA-Myc-GABARAPL1 (OMGL1), 242OVA-Myc-LC3B (242OML), 242OVA-Myc-GABARAP (242OMGP) ou 242OVA-Myc-GABARAPL1 (242OMGL1). Au 8^{ème} jour, les DC ont été mises en co-culture pendant 5 jours avec les LT CD4⁺ provenant de souris OT-II (A) ou les LT CD8⁺ provenant de souris OT-I (B) la prolifération des LT a été étudiée en cytométrie en flux (grâce à un marquage CFSE). Les LT ayant proliféré sont CFSE négatifs et sont exprimés en pourcentage de LT CD3⁺CD4⁺CFSE⁻ (A) ou en pourcentage de LT CD3⁺CD8⁺CFSE⁻ (B). (A) Les contrôles positifs ont été réalisés en incubant les LT CD4⁺ directement avec le peptide de OVA restreint aux molécules du CMH-II (OVA-II, OVA₃₂₃₋₃₃₉), ou incubés avec des DC préalablement chargées pendant 3 h avec ce même peptide. (B) Les mêmes contrôles positifs ont été réalisés qu'en A) mais avec le peptide OVA restreint aux CMH-I (SL8, OVA₂₅₇₋₂₆₄). Les barres d'erreurs sont présentées en \pm SEM. (A) Dans les conditions OVA et OVA-Myc-ATG8, n=5 ; dans la condition + 3-MA n=2 ; Dans la condition 242OATG8 n=4. (B) L'expérience a été répétée 2 fois.

- **La surexpression de OVA et des protéines de fusion OVA-Myc-ATG8 dans les cellules dendritiques non irradiées active la prolifération des LT CD8⁺ OT-I**

En parallèle des expériences de co-culture des cellules dendritiques avec les LT provenant de souris OT-II, des co-cultures ont été réalisées avec des LT provenant de souris OT-I. L'étude de la prolifération des LT CD8⁺ spécifiques du peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ permet de confirmer que les antigènes OVA sont exprimés par les cellule dendritiques. En effet, s'ils sont exprimés par la cellule alors ils sont endogènes et peuvent donc être apprêtés par la voie classique de présentation des peptides par les molécules du CMH-I. Ainsi, la co-culture des cellules dendritiques surexprimant les antigènes OVA, OVA-Myc-ATG8 avec les LT CD8⁺ OT-I entraine l'activation des LT CD8⁺ (Figure 22B). Ces résultats suggèrent que le niveau d'expression des antigènes OVA devrait être suffisamment élevé dans les cellules dendritiques pour permettre la prolifération des LT CD4⁺ OT-II.

- **La transfection par le JetPEI-Macrophage permet la maturation des cellules dendritiques**

La maturation des cellules dendritiques est importante pour l'activation des LT. Les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles. Les cellules dendritiques sont d'abord immatures et se caractérisent par une forte capacité de capture et d'apprêtement des antigènes. Puis, les cytokines pro-inflammatoires (comme le TNF- α ou l'IFN- γ) et des DAMP (cellules mortes, pathogènes...) entraînent la maturation et la migration de ces cellules dendritiques vers les organes lymphoïdes secondaires où elles peuvent rencontrer des lymphocytes T. Lors de cette étape les cellules dendritiques acquièrent un phénotype mature caractérisé par l'expression des protéines de costimulation CD80 et CD86, qui s'accompagne d'un changement de leurs fonctions. Les cellules dendritiques matures perdent ainsi leur capacité de capture d'antigènes et se spécialisent dans l'activation des lymphocytes T naïfs. Les cellules dendritiques matures présentent, aux lymphocytes T naïfs, l'antigène au niveau de leur complexe [protéine du CMH:peptide] constituant le premier signal d'activation des LT (Cella *et al*, 1997). Les LT ont ensuite besoin d'un second signal d'activation qui est apporté grâce à la liaison des protéines de costimulation CD80 et CD86 exprimées par les DC matures au récepteur CD28 présent sur les LT. La maturation des cellules dendritiques permet justement d'augmenter l'expression à la membrane plasmique de ces deux protéines de costimulation.

Dans notre étude, les cellules dendritiques murines ont été différenciées *in vitro* à partir des progéniteurs de moelle osseuse en utilisant les cytokines GM-CSF et l'IL-4. Cette étape permet d'augmenter l'expression des protéines du CMH-II à la membrane des cellules dendritiques pour augmenter le niveau d'activation des LT CD4⁺. Les cellules dendritiques ont été cultivées *in vitro* pendant 6 jours en présence des différentes cytokines. L'expression des molécules de costimulation a été recherchée, par cytométrie en flux sur les cellules dendritiques caractérisées par la double expression des marqueurs de surfaces CD11c et CMH-II, à l'issue de la différenciation des cellules dendritiques (J6) et 24 h après la transfection (J8). Les résultats de cytométrie montrent que la culture primaire s'est enrichie en cellules dendritiques (CD11c⁺CMH-II⁺) entre le 6^{ème} et 8^{ème} jour. De plus, après la transfection par le JetPEI-Macrophage, on observe une augmentation de l'expression des protéines de costimulation CD80 et CD86 par rapport au jour 6 (Figure 23). Dans nos conditions expérimentales, les cellules dendritiques que nous avons différenciées ne présentent pas de défauts de maturation qui pourraient éventuellement expliquer l'absence de prolifération des lymphocytes T CD4⁺ OT-II.

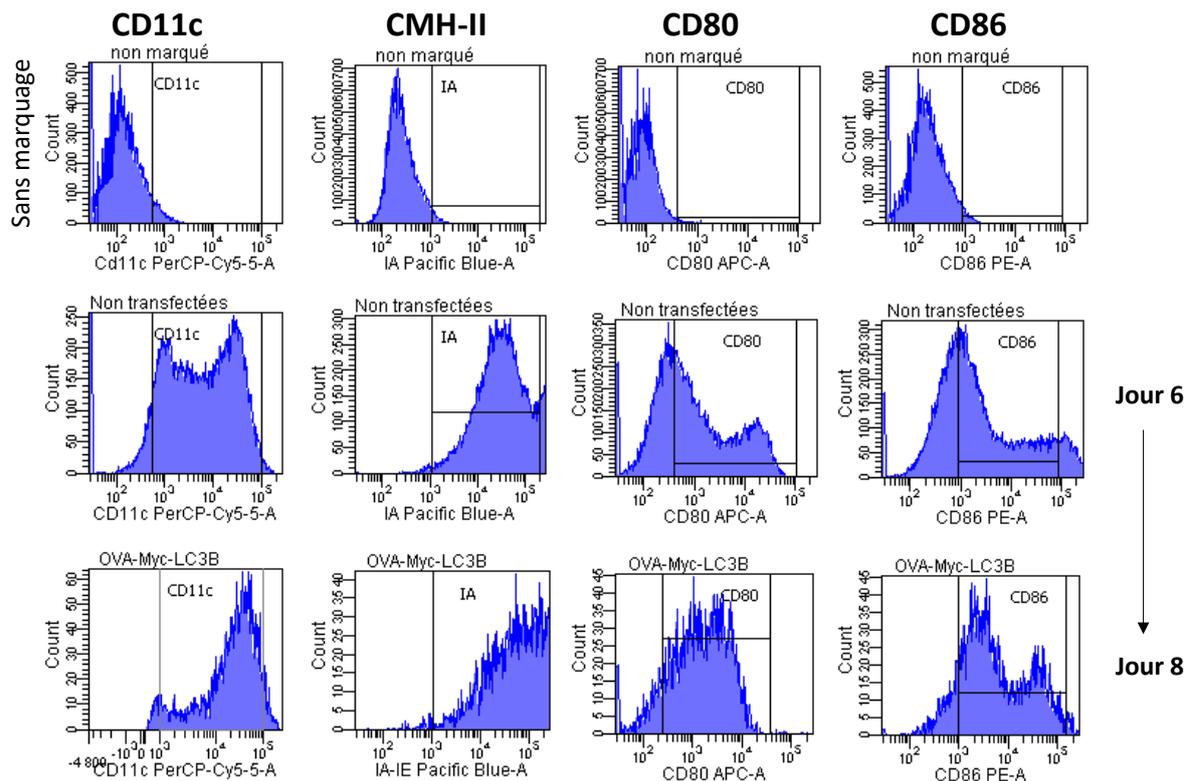


Figure 23 : La transfection des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse par le kit JetPEI-Macrophage entraîne leur maturation. Après 6 jours de différenciation *in vitro*, les cellules dendritiques ont été ensemencées et au 7^{ème} jour, les cellules dendritiques ont été transfectées avec le plasmide d'expression de OVA-Myc-LC3B à l'aide des réactifs du kit JetPEI-Macrophage. Au 6^{ème} et au 8^{ème} jour de différenciation, l'expression des molécules du CMH-II IA, CD11c, CD80 et CD86 a été étudiée par cytométrie en flux. Les cellules dendritiques se caractérisent par l'expression des doubles marqueurs CD11c et protéines du CMH-II. Lorsque les cellules dendritiques deviennent matures, l'expression des molécules du CMH-II augmente, ainsi que l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86.

- **L'utilisation de l'électroporation permet d'augmenter l'efficacité de transfection des cellules dendritiques**

La seconde hypothèse qui pourrait expliquer l'absence de prolifération des LT CD4⁺ est une faible efficacité de transfection des cellules dendritiques par la méthode JetPEI-Macrophage. Pour estimer cette efficacité, les cellules ont été transfectées par un mélange d'un plasmide d'expression des protéines de fusion OVA-ATG8 et d'un plasmide d'expression de GFP (pmax-GFP). Après transfection, l'expression de la protéine GFP est difficilement détectable en microscopie à épifluorescence et en cytométrie en flux (résultats non montrés). Nous avons donc entrepris d'utiliser une nouvelle méthode de transfection afin d'améliorer l'efficacité de transfection. Parmi plusieurs méthodes testées, nous avons opté pour l'électroporation à l'aide de l'appareil Amaxa Nucleofector qui a été développé et commercialisé pour permettre la transfection de cellules primaires. Le principe de cette méthode repose sur l'application d'un courant électrique sur les cellules dans un tampon adapté. Cette méthode de transfection permet d'avoir une efficacité de transfection d'environ 30 % (pourcentage de cellules GFP

positives) (Figure 24A). Nous avons également testé plusieurs tampons de transfection alternatif (tampon du kit cellules dendritiques (Amaxa), le tampon 1S (Chicaybam *et al*, 2013) et le tampon 1SM (Chicaybam *et al*, 2013) et deux programmes d'électroporation (Y-001 et AN-001). La nucléofection par les différents tampons présente une efficacité de transfection similaire mais, l'utilisation du tampon 1SM avec les programmes Y-001 ou AN-001 permet en plus d'augmenter le niveau d'expression de GFP présente dans les cellules GFP positives. Finalement, nous avons fait le choix d'utiliser le programme AN-001 avec le tampon 1SM car les cellules dendritiques étaient plus viables (Figure 24A et B).

Cependant, cette méthode de transfection ne permet pas, comme le JetPEI-Macrophage d'assurer la maturation des cellules dendritiques. Cette maturation a été obtenue en utilisant du lipopolysaccharides (LPS). Des données de la littérature indique que la maturation des cellules dendritiques est plus difficile si elle est faite après la transfection par électroporation (Lenz *et al*, 2003). Nous avons donc fait le choix d'incuber les cellules dendritiques avec le LPS avant l'électroporation.

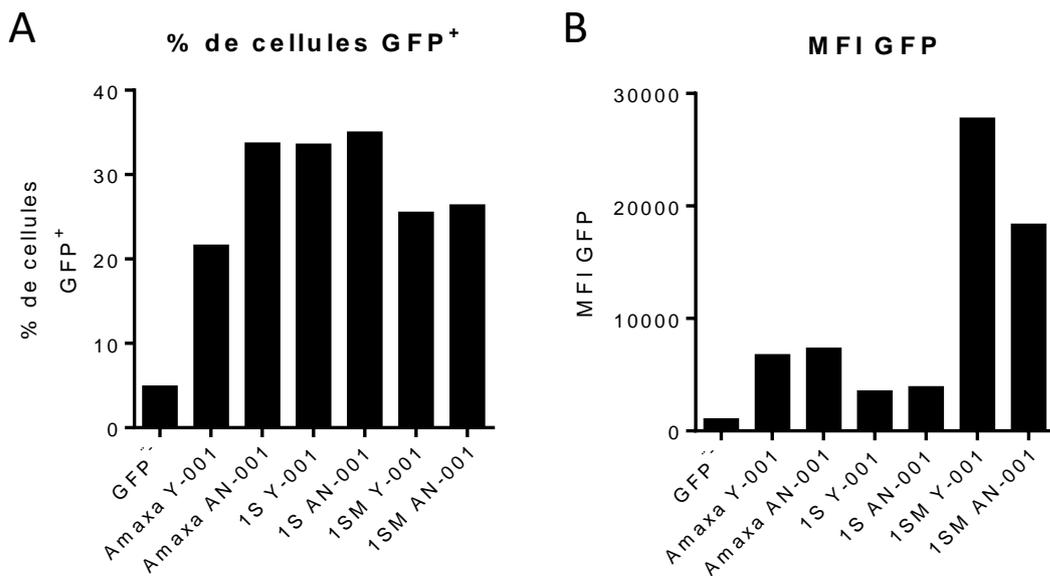


Figure 24 : Les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (DC) peuvent être électroporées. Les DC ont été différenciées *in vitro*, puis traitées par du lipopolysaccharide (LPS, 1 µg/mL, 16 h) afin d'induire leur maturation. Les cellules ont ensuite été électroporées en présence du plasmide (pmax-GFP, Amaxa) à l'aide de l'appareil nucleofector (Amaxa). Différents tampons de transfection ont été utilisés (Tampon du kit de nucléofection (Amaxa), le tampon 1S et le tampon 1SM). L'efficacité de transfection a été étudiée par cytométrie en flux en recherchant le pourcentage de cellules dendritiques (CD11c⁺CMH-II) GFP positives (A) et la moyenne des fluorescences de la GFP (MFI) (B).

- **La surexpression de OVA et de OVA-Myc-ATG8 dans les cellules dendritiques par électroporation (à J9) active la prolifération des LT CD8⁺ OT-I**

Les cellules dendritiques ont été électroporées au 9^{ème} jour de différenciation après 16 h de traitement avec du LPS (1 µg/mL). Au jour 9, 79% des cellules dendritiques exprimaient les marqueurs CD11c⁺ et CMH-II (Figure 25A). Au cours de cette expérience, le pourcentage de cellules dendritiques exprimant les protéines CD80 et CD86 avait significativement augmenté en présence de LPS, ainsi que l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) des protéines de costimulation indiquant que les cellules dendritiques étaient matures (Figure 25B et C). Les cellules dendritiques ont ensuite été mises en co-culture avec les T CD8⁺ OT-I pendant 4 jours afin d'étudier la présentation du peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ sur les molécules du CMH-I des cellules dendritiques. La prolifération des LT CD8⁺ a été étudiée par cytométrie en flux et les résultats montrent que les cellules dendritiques surexprimant les antigènes OVA ou OVA-Myc-ATG8 activent de façon similaire la prolifération des LT CD8⁺ (environ 80 % des LT sont CFSE⁻) (Figure 26A, B et C). Cette prolifération est la même que dans la condition contrôle où les LT CD8⁺ avaient été cultivés avec des cellules dendritiques préalablement incubées pendant 3 h avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SL8) (contrôle positif) (Figure 26A, B et C). De plus, le blocage de l'autophagie par le 3-MA ne modifiait pas la prolifération des LT CD8⁺ cultivés avec les cellules dendritiques surexprimant l'antigène OVA ou OVA-Myc-LC3B. Cependant, la prolifération des LT CD8⁺ était significativement diminuée de presque de moitié lorsque les cellules dendritiques surexprimaient les antigènes OVA-Myc-GABARAP et OVA-Myc-GABARAPL1 en présence de 3-MA (Figure 26A et B). Ces données suggèrent que les antigènes OVA/OVA-Myc-LC3B pourraient être différemment apprêtés des antigènes OVA-Myc-GABARAP/OVA-Myc-GABARAPL1 dans les cellules dendritiques.

Par ailleurs, les données supplémentaires obtenues ont suggéré qu'en prétraitant les cellules dendritiques par le bortézomib (un inhibiteur du protéasome), la prolifération des LT CD8⁺ OT-I induite par les DC surexprimant l'antigène OVA ou OVA-myc-ATG8 était réduite (Figure 26C et D). Ces résultats indiquaient que les antigènes OVA ou OVA-Myc-ATG8 étaient majoritairement dégradés par le protéasome et apprêtés par la voie classique du CMH-I. Cependant un traitement à la rapamycine, un inducteur de l'autophagie, induisait également une diminution de la prolifération des cellules T lorsqu'elles étaient incubées avec les cellules dendritiques. Ces résultats pourraient indiquer que l'induction de l'autophagie diminuait également l'apprêtement et la présentation d'antigène par les protéines du CMH-I. En effet, les données de la littérature indiquent que les molécules du CMH-I à la membrane plasmique des cellules dendritiques sont recyclées et dégradées par la voie autophagique (Loi *et al*, 2016). Ainsi, l'induction de l'autophagie diminuerait le pourcentage de molécules de CMH-I à la

membrane plasmique des cellules dendritiques réduisant ainsi la prolifération des LT CD8⁺ OT-I. Aussi, d'autres données de littérature indiquent que la rapamycine aurait un effet tolérogène sur les cellules dendritiques, c'est-à-dire que les cellules dendritiques traitées par la rapamycine exprimeraient moins de molécules du CMH et de protéines de costimulation. Il serait ainsi, plus difficile pour les cellules dendritiques d'activer les LT *in vitro* (Fischer *et al*, 2009).

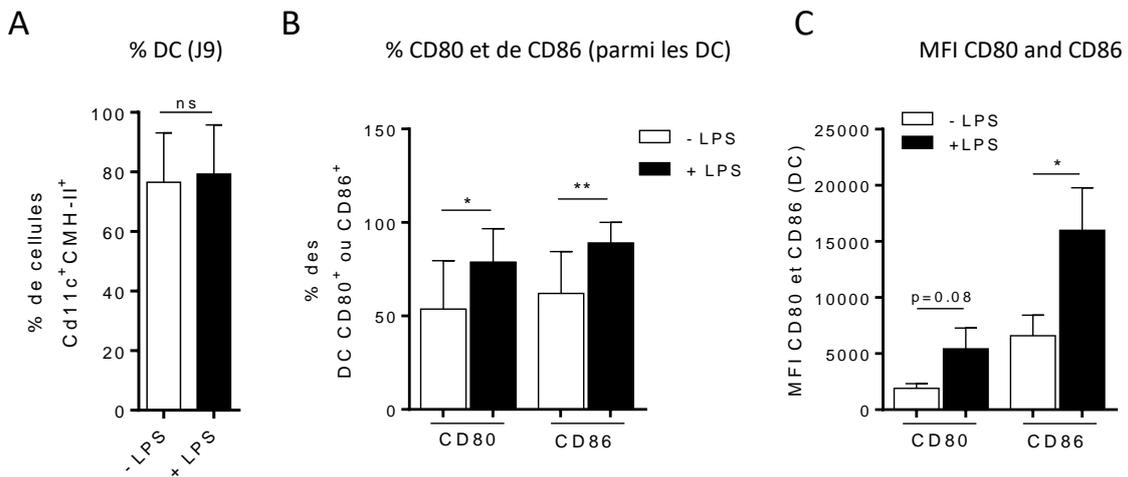


Figure 25 : Le pourcentage et l'expression des protéines de costimulation ont été recherchés par cytométrie en flux sur les cellules dendritiques (DC) différenciées *in vitro* pendant 9 jours. Les DC ont été différenciées *in vitro* à partir de moelle osseuse de souris C57BL/6N. Les DC ont été traitées au 8^{ème} jour par du LPS (1 µg/mL, 16 h) avant d'étudier par cytométrie en flux le pourcentage de DC (CD11c⁺ molécules de CMH-II⁺) (A). Parmi ces DC, nous avons recherché l'expression des protéines de costimulation CD80 et CD86 (B), ainsi que leur intensité moyenne de fluorescence (MFI) (C). Les barres d'erreurs sont exprimées en SEM avec n=8. Le test statistique est un test de Student : P * < 0,05 ; P** < 0,005.

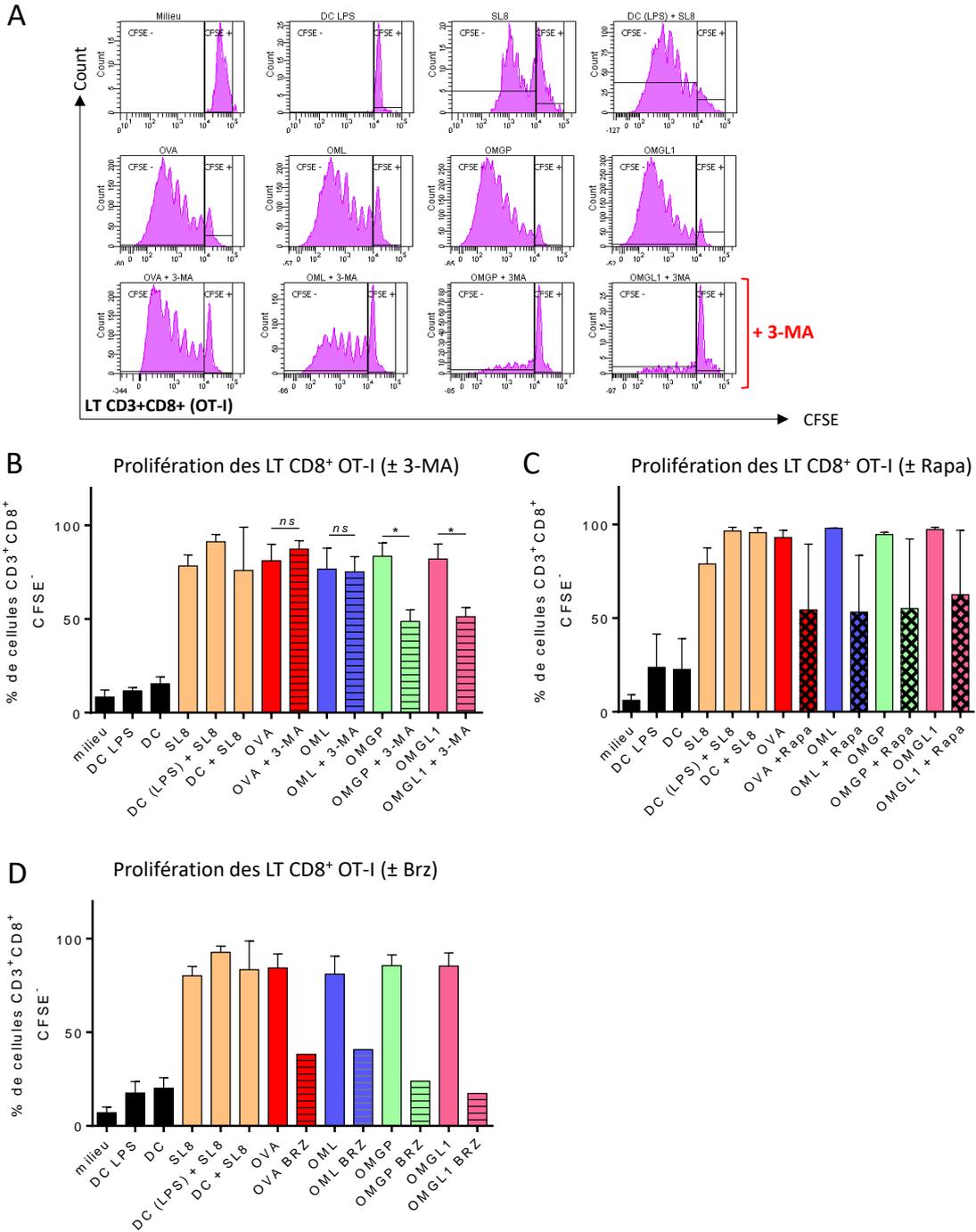


Figure 26 : La surexpression des antigènes OVA ou OVA-Myc-ATG8 dans les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (DC) permet l'activation de la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ (OT-I). (A, B, C et D) Les DC ont été différenciées *in vitro* pendant 8 jours. Puis le LPS a été ajouté (16h, 1 µg/mL) avant que les cellules soient transfectées le 9^{ème} jour par électroporation avec des plasmides codant les antigènes OVA, OVA-Myc-LC3B (OML), OVA-Myc-GABARAP (OMGP) et OVA-Myc-GABARAPL1 (OMGL1). Au 10^{ème} jour, les DC ont été mises en co-culture pendant 4 jours avec les LT CD8⁺ OT-I (H-2^b). La prolifération des LT CD8⁺ a été étudiée par cytométrie en flux par la technique du CFSE. Les LT ayant proliféré sont CFSE négatifs et la prolifération est exprimée en pourcentage de cellules CD3⁺CD8⁺CFSE⁻. Les contrôles positifs ont été réalisés soit **i**) en incubant directement les LT CD8⁺ (OT-I) avec le peptide OVA restreint au CMH-I (SL8, OVA₂₅₇₋₂₆₄), ou soit **ii**) en pré-incubant les DC (± LPS) pendant 3 h avec le peptide SL8 avant d'être co-cultivées avec les LT CD8⁺ OT-I. (A) et (B) Les DC ont été prétraitées ou non par le 3-méthyladénine (3-MA, 16 h, 3 mM) afin de bloquer l'autophagie (n=4). (C) L'autophagie a été induite par la rapamycine (Rapa, 16 h, 100 nM) (n=2). (D) Les DC ont traitées par un inhibiteur du protéasome (bortézomib = BRZ, 25 nM, 16 h) (n=1 pour le BRZ et n=5 sans BRZ). Les barres d'erreurs sont présentées en ± SEM et l'analyse statistique a été réalisée par one-way ANOVA. P < 0,05.

- **La surexpression par électroporation (à J9) de OVA et de OVA-Myc-ATG8 dans les cellules dendritiques n'active la prolifération des LT CD4⁺ OT-II**

Afin de déterminer si cette nouvelle méthode de transfection améliorerait la réponse des LT CD4⁺ OT-II, nous avons réalisé des expériences avec les LT CD4⁺ OT-II. Les résultats montrent que la prolifération des LT CD4⁺ n'est pas activée lorsque ces lymphocytes sont mis en co-culture avec des cellules dendritiques quel que soit l'antigène surexprimé (Figure 27A, B, C et D). En effet, ces LT ne prolifèrent pas significativement plus que ceux mis en co-culture avec des cellules dendritiques n'exprimant aucun antigène (Figure 27A et B). Le traitement des cellules dendritiques surexprimant les différents antigènes OVA par la rapamycine ou le bortézomib ne permet pas de modifier la prolifération des LT CD4⁺ OT-II (Figure 27C et D).

La prolifération des LT CD4⁺ OT-II n'est donc toujours pas activée malgré l'amélioration de l'efficacité de la transfection avec l'électroporation et de la maturation des cellules dendritiques. Pour tenter d'améliorer l'activation des LT CD4⁺, nous avons également réalisé les mêmes expériences, mais sur des cellules dendritiques électroporées au 6^{ème} jour après le traitement au LPS. Pour que les peptides soient présentés par les molécules du CMH-II, il faut que les molécules du CMH-II et les peptides se rencontrent dans un même compartiment après leur apprêtement. Or, l'expression des molécules de CMH-II, a lieu bien avant le 9^{ème} jour ; jour correspondant à l'électroporation et donc à la synthèse/apprêtement de l'antigène. En transfectant les cellules plus tôt, les antigènes OVA-Myc-ATG8 pourraient être plus précocement apprêtés et donc peut-être davantage présentés par les molécules du CMH-II.

Au 6^{ème} jour, la population cellulaire dérivée de moelle osseuse est composée en moyenne d'environ 70 % de cellules dendritiques (Figure 28A). Parmi ces cellules dendritiques, une forte proportion exprime les molécules de costimulation CD80 et CD86 dont l'expression peut être significativement augmentée par l'ajout de LPS (Figure 28B). Dans ces conditions d'électroporation, les cellules dendritiques expriment également plus de protéines de costimulation à la membrane plasmique comme l'indique l'augmentation de l'intensité moyenne de fluorescence (MFI) (Figure 28C).

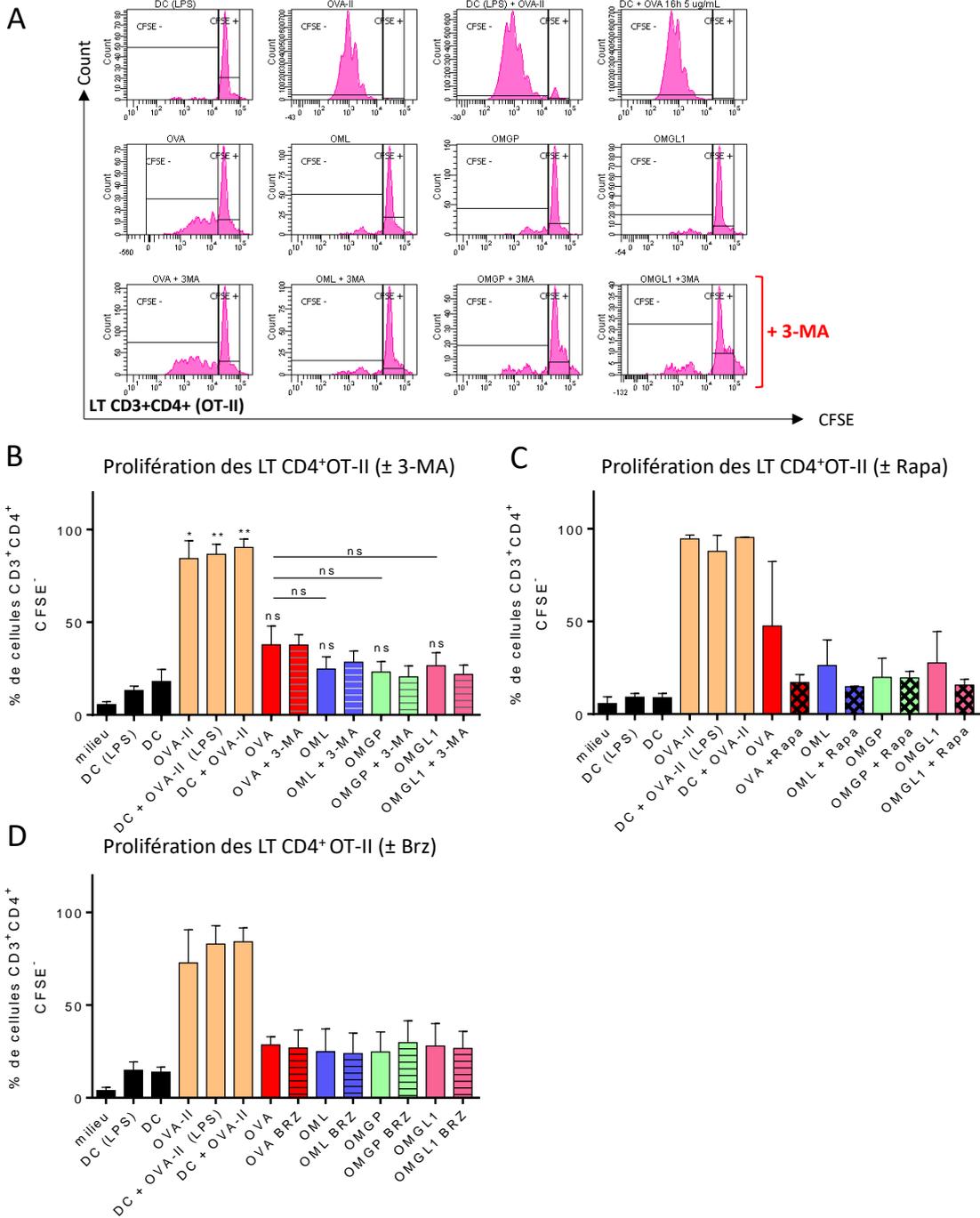


Figure 27 : La surexpression des antigènes OVA, OVA-Myc-ATG8 dans les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (DC) active la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ (OT-II). (A, B, C et D) Les cellules dendritiques utilisées pour la co-culture avec les lymphocytes T (LT) ont été différenciées *in vitro* pendant 8 jours. Puis le LPS a été ajouté dans le milieu de culture (16h, 1 µg/mL) avant la transfection par électroporation au 9^{ème} jour de différenciation. Les DC ont été transfectées par les plasmides codant les antigènes OVA, OVA-Myc-LC3B (OML) et OVA-Myc-GABARAP (OMGP), OVA-Myc-GABARAPL1 (OMGL1). Au 10^{ème} jour, les DC ont été mises en co-culture pendant 4 jours avec les LT CD4⁺ OT-II (H-2^b). La prolifération des LT CD4⁺ a été étudiée par cytométrie en flux (CFSE). Les cellules ayant proliféré sont CFSE négative et les résultats sont exprimés en pourcentage de cellules CD3⁺CD4⁺CFSE⁻. Les contrôles positifs ont été réalisés soit **i**) en incubant directement les LT CD4⁺ (OT-II) avec le peptide OVA restreint au CMH-I (SL8, OVA₃₂₃₋₃₃₉), ou soit **ii**) en pré-incubant les DC (± LPS) pendant 3 h avec le peptide OVA-II avant d'être co-cultivées avec les LT CD4⁺ OT-II. **(A)** et **(B)** Les DC ont été pré-traitées ou non par le 3-méthyladénine (3-MA, 16 h, 3 mM) afin de bloquer l'autophagie (n=6). **(C)** L'autophagie a été induite par la rapamycine (Rapa, 16 h, 100 nM) mais avec le peptide OVA restreint au CMH-I (n=2). **(D)** Les DC ont été traitées par un inhibiteur du protéasome (bortézomib = BRZ, 25 nM, 16 h) (n=3). Les barres d'erreurs sont présentées en ± SEM et l'analyse statistique a été réalisée par one-way ANOVA. P * < 0,05, P ** < 0,005, ns= non significatif.

- **La surexpression par électroporation (J6) de OVA et de OVA-Myc-ATG8 dans les cellules dendritiques n'active pas la prolifération des LT CD4⁺ OT-II**

La surexpression des antigènes OVA-Myc-ATG8 ou 242OVA-Myc-ATG8 dans des cellules dendritiques, électroporées au 6^{ème} jour, n'a pas permis d'améliorer la présentation des peptides pour induire la prolifération des LT CD4⁺ OT-II, après 4 jours de co-culture (Figure 29A et D). Ces résultats vont en effet, à l'encontre de l'hypothèse formulée précédemment, que les cellules dendritiques électroporées prématurément (OVA-Myc-ATG8) présenteraient plus le peptide OVA par les molécules du CMH-II. De plus, l'inhibition de l'autophagie par le 3-MA ou par inhibition de l'expression de ATG5 (siRNA *Atg5*) ne modifie pas la prolifération des LT CD4⁺ OT-II mis en co-culture (Figure 29A et B). De plus, l'induction de l'autophagie par la rapamycine n'améliore pas la présentation de l'antigène OVA fusionné aux protéines ATG8 par les cellules dendritiques (Figure 29C).

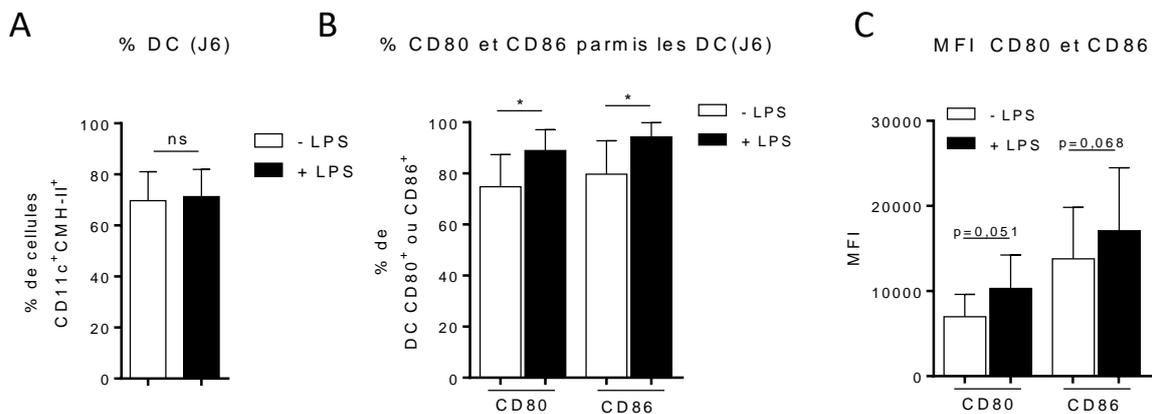


Figure 28 : Le pourcentage et l'expression des protéines de costimulation ont été recherchés par cytométrie en flux sur les cellules dendritiques (DC) différenciées *in vitro* pendant 6 jours. Les cellules dendritiques ont été différenciées *in vitro* et traitées au 5^{ème} jour par le LPS (1 µg/mL, 16 h). **A)** Le pourcentage de DC (CD11c⁺ molécules du CMH-II⁺) dans la culture primaire a été étudiée par cytométrie en flux. Parmi ces DC, l'état de maturation des DC a été vérifié par l'analyse de l'expression des protéines de costimulation CD80 et CD86 (**B**), ainsi que la mesure des moyennes de fluorescence (MFI) (**C**). Les barres d'erreurs sont exprimées en SEM avec n=6. Les analyses statistiques ont été réalisées avec un t test : P * < 0,05.

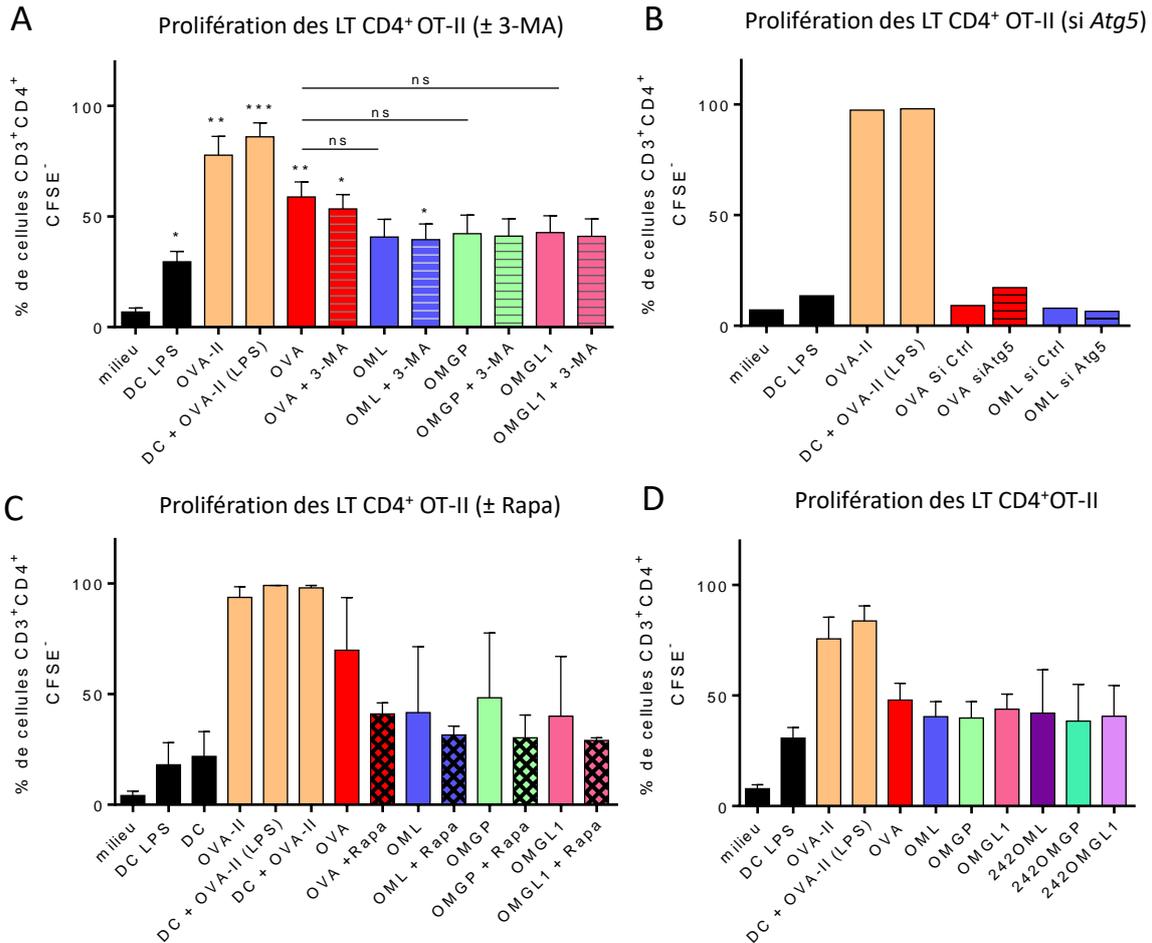


Figure 29 : La surexpression des antigènes OVA, OVA-Myc-ATG8 dans les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (DC) active la prolifération des lymphocytes T CD4⁺ (OT-II). (A, B, C et D) Les cellules dendritiques utilisées pour la co-culture avec les lymphocytes T (LT) ont été différenciées *in vitro* pendant 5 jours. Puis du LPS a été ajoutées (16h, 1 µg/mL) avant que les cellules soient transfectées le 6^{ème} jour par électroporation par des plasmides codant les antigènes OVALBUMINE (OVA), OVA-Myc-LC3B (OML) et OVA-Myc-GABARAP (OMGP), OVA-Myc-GABARAPL1 (OMGL1, 242OVA-Myc-LC3B (242OML), 242OVA-Myc-GABARAP (242OMGP) ou 242OVA-Myc -GABARAPL1 (242OMGL1). Au 7^{ème} jour, les DC ont été mises en co-culture pendant 4 jours avec les LT CD4⁺ provenant de souris OT-II (H-2^b). La prolifération des LT CD4⁺ a été étudiée par cytométrie en flux par la technique du CFSE. Les cellules ayant proliféré sont CFSE négatives et sont exprimées en pourcentage de cellules CD3⁺CD4⁺CFSE⁻. Les contrôles positifs ont été réalisés soit **i**) en incubant directement les LT CD4⁺ (OT-II) avec le peptide OVA restreint au CMH-II (OVA-II, OVA₃₂₃₋₃₃₉), ou soit **ii**) en pré-incubant les DC (± LPS) pendant 3 h avec le peptide OVA-II avant d'être co-cultivées avec les LT CD4⁺ OT-II. (A) Les DC ont été prétraitées ou non par le 3-méthyladénine (3-MA, 16 h, 3 mM) afin de bloquer l'autophagie (n=7). (B) Les DC ont été co-transfectées par des siRNA Contrôle (si Ctrl) et des siRNA Atg5 (si Atg5) (100 nM) afin de bloquer l'autophagie dans ces cellules (n=1). (C) L'autophagie a été induite par la rapamycine (Rapa, 16 h, 100 nM) (n=2). (D) n=5. Les barres d'erreurs sont présentées en ± SEM et l'analyse statistique a été réalisé par one-way ANOVA. P * < 0,05, P ** < 0,005, ns= non significatif.

- **La surexpression, par électroporation à J6, des antigènes OVA-Myc-ATG8 ou OVA seul dans des cellules dendritiques induit la même prolifération des lymphocytes T CD8⁺ OT-I**

En parallèle des études de co-culture avec les LT CD4⁺ OT-II, les cellules dendritiques surexprimant les différentes versions de l'antigène OVA (électroporées à J6) ont également été cultivées avec les LT CD8⁺ OT-I. Dans ces conditions, les LT CD8⁺ OT-I ont fortement proliféré lorsqu'ils ont été incubés pendant 4 jours avec des cellules dendritiques surexprimant l'antigène OVA, les antigènes OVA-Myc-ATG8 ou les antigènes 242OVA-Myc-ATG8 (Figure 30A et D). Lorsque l'autophagie des DC surexprimant OVA ou OVA-Myc-ATG8 a été inhibée par le 3-MA, la prolifération des LT CD8⁺ n'a pas été pas modifiée (Figure 30A). Ces données sont en contradiction avec les résultats obtenus lorsque les cellules dendritiques étaient électroporées à J9 et qu'elles surexprimaient OVA-Myc-GABARAP/OVA-Myc-GABARAPL1 (3-MA) (Figure 24A et B). Cependant, nous avons également entrepris d'inhiber l'autophagie par interférence ARN avec des siRNA *Atg5*. Les résultats préliminaires semblent indiquer que l'inhibition de l'autophagie dans les cellules dendritiques surexprimant l'antigène OVA-Myc-LC3B diminue la prolifération des LT CD8⁺ (Figure 30B). La surexpression de OVA dans les cellules dendritiques n'exprimant plus *Atg5* semble au contraire augmenter la prolifération des LT CD8⁺ OT-I (Figure 30B). Cette dernière donnée est en accord avec la littérature qui montre que l'inhibition de l'autophagie par des siRNA *Atg5*. Aussi, l'activation de l'autophagie par la rapamycine dans les cellules dendritiques surexprimant les antigènes OVA diminue la prolifération des LT CD8⁺ *in vitro* ce qui est en accord avec les résultats obtenus avec les DC transfectées au 9^{ème} jour (Figure 30C et 26C).

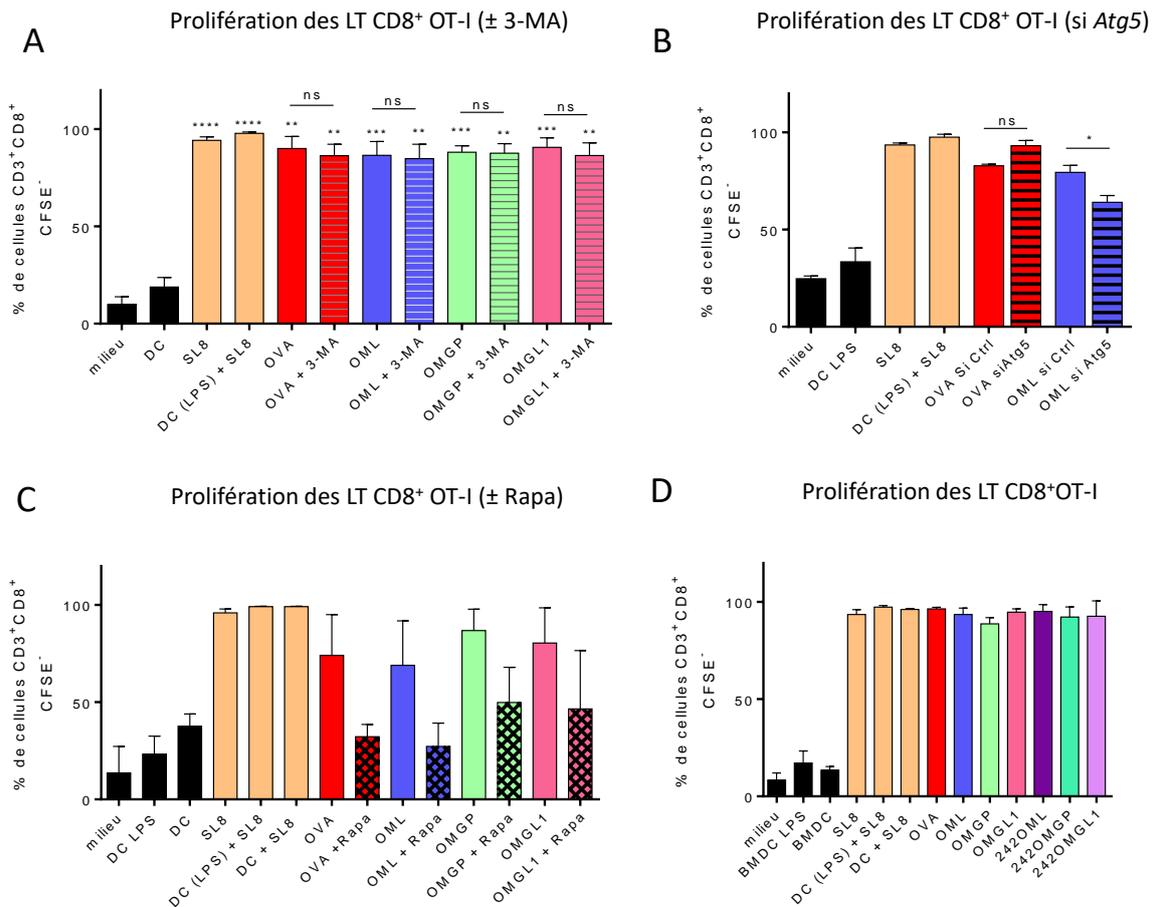


Figure 30 : La surexpression des antigènes OVA, OVA-Myc-ATG8 dans les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (DC) active la prolifération des lymphocytes T CD8⁺ (OT-I). (A, B, C et D) Les cellules dendritiques utilisées pour la co-culture avec les lymphocytes T (LT) ont été différenciées *in vitro* pendant 5 jours. Puis du LPS a été ajouté (16h, 1 µg/mL) avant que les cellules soient transfectées le 6^{ème} jour par électroporation par des plasmides codant les antigènes OVALBUMINE (OVA), OVA-Myc-LC3B (OML) et OVA-Myc-GABARAP (OMGP), OVA-Myc-GABARAPL1 (OMGL1), 242OVA-Myc-LC3B (242OVL), 242OVA-Myc-GABARAP (242OMGP) ou 242OVA-Myc-GABARAPL1 (242OMGL1). Au 7^{ème} jour, les DC ont été mises en co-culture pendant 4 jours avec les LT CD8⁺ provenant de souris OT-I (H-2^b). La prolifération des LT CD8⁺ a été étudiée par cytométrie en flux par la technique du CFSE. Les cellules ayant proliférées sont CFSE négative et sont exprimées en pourcentage de cellules CD3⁺CD8⁺CFSE⁻. Les contrôles positifs ont été réalisés soit **i**) en incubant directement les LT CD8⁺ (OT-I) avec le peptide OVA restreint au CMH-II (SL8, OVA₂₅₇₋₂₆₄), ou soit **ii**) en pré-incubant les DC (± LPS) pendant 3 h avec le peptide SL8 avant d'être co-cultivées avec les LT CD8⁺ OT-I. **A**) Les DC ont été pré-traitées ou non par le 3-méthyladénine (3-MA, 16 h, 3 mM) afin de bloquer l'autophagie (n=7). **B**) Les DC ont été co-transfectées par des si Ctrl et des si *Atg5* (100 nM) afin de bloquer l'autophagie dans ces cellules (n=2). **C**) L'autophagie a été induite par la rapamycine (Rapa) (16 h, 100 nM) (n=2). **D**) n=5. Les barres d'erreurs sont présentées en ± SEM et l'analyse statistique a été réalisée par one-way ANOVA. P * < 0,05, P ** < 0,005, P *** < 0,001, P **** < 0,0001, ns= non significatif.

2. Etude de l'impact de l'invalidation de GABARAPL1 dans les cellules B16-OVA : sur la présentation de l'antigène OVA par les molécules du CMH-I et II et dans la croissance tumorale dans des souris immunocompétentes

Au début de ce projet de cette thèse, nous nous sommes aussi intéressés à l'étude du rôle de GABARAPL1, dans l'autophagie et dans la croissance tumorale, dans la présentation d'antigène et dans la reconnaissance par le système immunitaire de tumeur invalidée par le gène *Gabarapl1*.

Le gène *GEC1/GABARAPL1* a été initialement identifié chez le cochon d'Inde (*Cavia porcellus*) au sein de notre laboratoire en 1993 et décrit comme positivement régulé par les estrogènes (Pellerin *et al*, 1993). Il a ensuite été décrit comme impliqué dans le transport du récepteur GABA_A et comme pouvant interagir par son extrémité N-terminal avec la tubuline (Mansuy *et al*, 2004). Puis, le rôle de cette protéine dans l'autophagie a été démontré dans notre équipe au début des années 2010 (Chakrama, *et al*, 2010). GABARAPL1 présente un fort pourcentage d'identité avec les protéines GABARAP et GABARAPL2 (Le Grand *et al*, 2011). Effectivement, ces 3 protéines appartiennent à la sous-famille GABARAP, elle-même appartenant à la famille ATG8. Comme nous l'avons précisé dans l'introduction, les protéines de la famille ATG8 participent à la voie autophagique et peuvent s'ancrer à la membrane de l'autophagosome suite à la conjugaison au PE (Chakrama *et al*, 2010; Kabeya *et al*, 2004). Ainsi, les protéines de la famille ATG8 sont clivées en aval d'une glycine en position C-terminale avant d'être conjuguées au PE. Au cours du processus autophagique, la sous-famille GABARAP participerait plutôt aux événements de fermeture de l'autophagosome et de fusion de l'autophagosome avec le lysosome (Weidberg *et al*, 2010; Nguyen *et al*, 2016; Jatana *et al*, 2020).

Notre équipe s'est ensuite intéressée au rôle de GABARAPL1 dans le cancer. En effet, une perte d'expression de *GABARAPL1* a été mise en évidence dans des tissus tumoraux par rapport aux tissus sains dans une étude de 2003 (Nemos *et al*, 2003). D'autres études de notre équipe montrent que l'expression de *GABARAPL1* est un facteur de bon pronostic chez des patientes atteintes de cancer du sein (Berthier *et al*, 2010). *In vitro*, la perte de l'expression de GABARAPL1 dans des cellules tumorales de cancer du sein MDA-MB-436 est associée à une augmentation du phénotype cancéreux avec une augmentation de la prolifération cellulaire, de la formation de colonies et de l'invasion. Le flux autophagique est également réduit dans ces cellules (Boyer-Guittaut *et al*, 2014). Les fonctions suppressives de GABARAPL1 dans les tumeurs seraient indépendantes de sa conjugaison aux vésicules autophagiques *in vivo* dans des souris immunodéprimées. En effet, les cellules MCF-7 surexprimant GABARAPL1 ou le mutant de GABARAPL1-G116A ne pouvant plus se lier aux autophagosomes, présentent une

croissance tumorale plus faible comparativement aux cellules MCF-7 contrôles (Poillet-Perez *et al*, 2017). Cependant *in vitro*, dans les mêmes cellules, seules les lignées surexprimant GABARAPL1 sont capables de limiter la prolifération cellulaire (Poillet-Perez *et al*, 2017). Ces travaux suggèrent que GABARAPL1 pourrait avoir un rôle au niveau des étapes précoces de l'autophagie mais indépendamment de sa localisation au niveau des autophagosomes.

L'autophagie étant impliquée dans l'immunité antitumorale, nous nous sommes demandé si GABARAPL1 pouvait avoir un rôle dans la reconnaissance et l'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire. Notre étude s'est subdivisée en deux axes avec une étude *in vitro* et une étude *in vivo* chez la souris. *In vitro*, nous avons étudié l'effet de l'absence d'expression de GABARAPL1 sur le flux autophagique et sur la prolifération cellulaire. *In vivo*, nous avons étudié les conséquences de la perte de GABARAPL1 sur la croissance tumorale dans des souris immunodéficientes et immunocompétentes. Les expériences menées dans des souris compétentes ont permis d'étudier l'implication du système immunitaire dans l'immunosurveillance et l'élimination des cellules tumorales.

Cette étude a été menée dans la lignée cellulaire murines B16-F10 (H-2^b) issues d'un mélanome et surexprimant l'antigène OVALBUMINE (B16-OVA). L'expression de *Gabarapl1* a été invalidée dans ce modèle cellulaire par la technologie CRISPR-Cas9. Pour réaliser les croissances tumorales, nous avons utilisé des souris C57BL/6N (H-2^b) afin d'avoir le même fond génétique que les lignées cellulaires B16-F10. Les études *in vitro* ont permis de montrer que :

- **L'invalidation de *Gabarapl1* dans les lignées B16-OVA diminue le flux autophagique basal et induit**
- **L'invalidation de *Gabarapl1* dans les lignées B16-OVA ne modifie pas la prolifération cellulaire *in vitro***

Les études *in vivo* de croissance tumorale dans des souris immunodéficientes et immunocompétentes ont permis de montrer que :

- **L'invalidation de *Gabarapl1* ne modifie pas la croissance tumorale *in vivo* dans des souris SCID immunodéficientes en lymphocytes T et B**
- **Mais, l'invalidation de *Gabarapl1* augmente la croissance tumorale dans les souris C57BL/6N immunocompétentes**

Ces résultats suggèrent l'implication du système immunitaire dans la différence de croissance observée entre le groupe de souris immunodéficientes et immunocompétentes. Les souris immunodéficientes ne possèdent pas de lymphocytes B, T et de cellules NK suggérant l'implication de l'un de ces sous-types immunitaires dans la différence observée. L'implication du système immunitaire a donc été recherchée en étudiant les populations lymphocytaires

infiltrant les tumeurs (lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺). Nous avons également regardé si les lymphocytes infiltrant les tumeurs étaient encore fonctionnels. Enfin, nous avons étudié l'expression des molécules du CMH-I, CMH-II et PD-L1 à la surface des cellules tumorales *in vivo*. Une plus faible expression des molécules du CMH peut être associée à une moins bonne reconnaissance et à l'élimination des cellules tumorales par le système immunitaire. L'expression du marqueur de surface PD-L1 à la surface des cellules tumorales a été détectée. Son expression peut être modulée par la présence de cytokines dans l'environnement tumorale (IFN- γ par exemple). PD-L1 est reconnu par le récepteur PD1 présent à la surface des LT et entraîne leur inactivation (Ostrand-Rosenberg *et al*, 2014). Les résultats ont montré que :

- **Les lymphocytes infiltrants les tumeurs sont les mêmes entre les groupes**
- **Les lymphocytes infiltrant les tumeurs ne présentent pas de différences de fonctionnalité entre les groupes**
- ***In vivo*, il n'existe pas de différence d'expression à la surface des cellules tumorales des molécules du CMH-I, CMH-II et de PD-L1**
- ***In vitro*, l'invalidation de *Gabarapl1* ne modifie pas la présentation des peptides dérivés de l'antigène OVA par les molécules du CMH de classe I et II**

- **Modèle d'invalidation de *Gabarapl1* dans les cellules B16-F10 surexprimant la protéine OVA (B16-OVA)**

Nous avons d'abord observé l'expression des protéines GABARAP et GABARAPL1 dans les cellules B16-OVA qui constituaient notre modèle d'étude. Les cellules B16-OVA sont des cellules murines issues d'un mélanome de souris C57BL/6N et elles expriment fortement les protéines GABARAP et GABARAPL1 au niveau basal. L'expression de la protéine GABARAPL1 dans diverses lignées cellulaires étudiées au laboratoire (par exemple les lignées MCF-7, MDA-MB-436, A549) n'est généralement visible que lorsque que l'on traite par un inhibiteur du protéasome, comme le bortézomib. Cette protéine semble donc être fortement exprimée dans le modèle cellulaire B16-OVA. Par ailleurs, nous pouvons observer les formes II des protéines GABARAP et GABARAPL1 en présence de l'inhibiteur autophagique, le NH₄Cl ce qui montre leur participation à la voie autophagique (Figure 31B).

Pour comprendre le rôle de GABARAPL1 dans la croissance tumorale, l'autophagie et la présentation d'antigène, nous avons entrepris d'éteindre l'expression de cette protéine dans les cellules B16-OVA. L'expression de la protéine GABARAPL1 a été invalidée par la technologie CRISPR-Cas9 dans les cellules B16-OVA en utilisant un ARN guide ciblant l'exon 2 du gène *Gabarapl1* (Figure 31A). Trois clones cellulaires différents ont été obtenus : C2, C4 et C10. Le contrôle nommé Ctrl correspond à la transfection des cellules B16-OVA par le plasmide CRISPR-Cas9 sans ARN guide. L'absence d'expression de la protéine a été vérifiée par western blotting dans l'ensemble des clones (Figure 31B). Aucune expression de la protéine GABARAPL1 n'a pu être détectée dans le clone C10. Cependant, une faible expression a pu être détectée dans les clones C2 et C4 (Figure 31B). L'étude de l'ADN génomique par séquençage de la partie du gène correspondant à la séquence cible de l'ARN guide a montré que tous les allèles du gène *Gabarapl1* ne sont pas mutés pour les clones C2 et C4 (résultats non montrés). L'expression des ARNm a également été étudiée et seul le clone C10 présente une diminution significative d'expression de l'ARNm de *Gabarapl1* (Figure 31C).

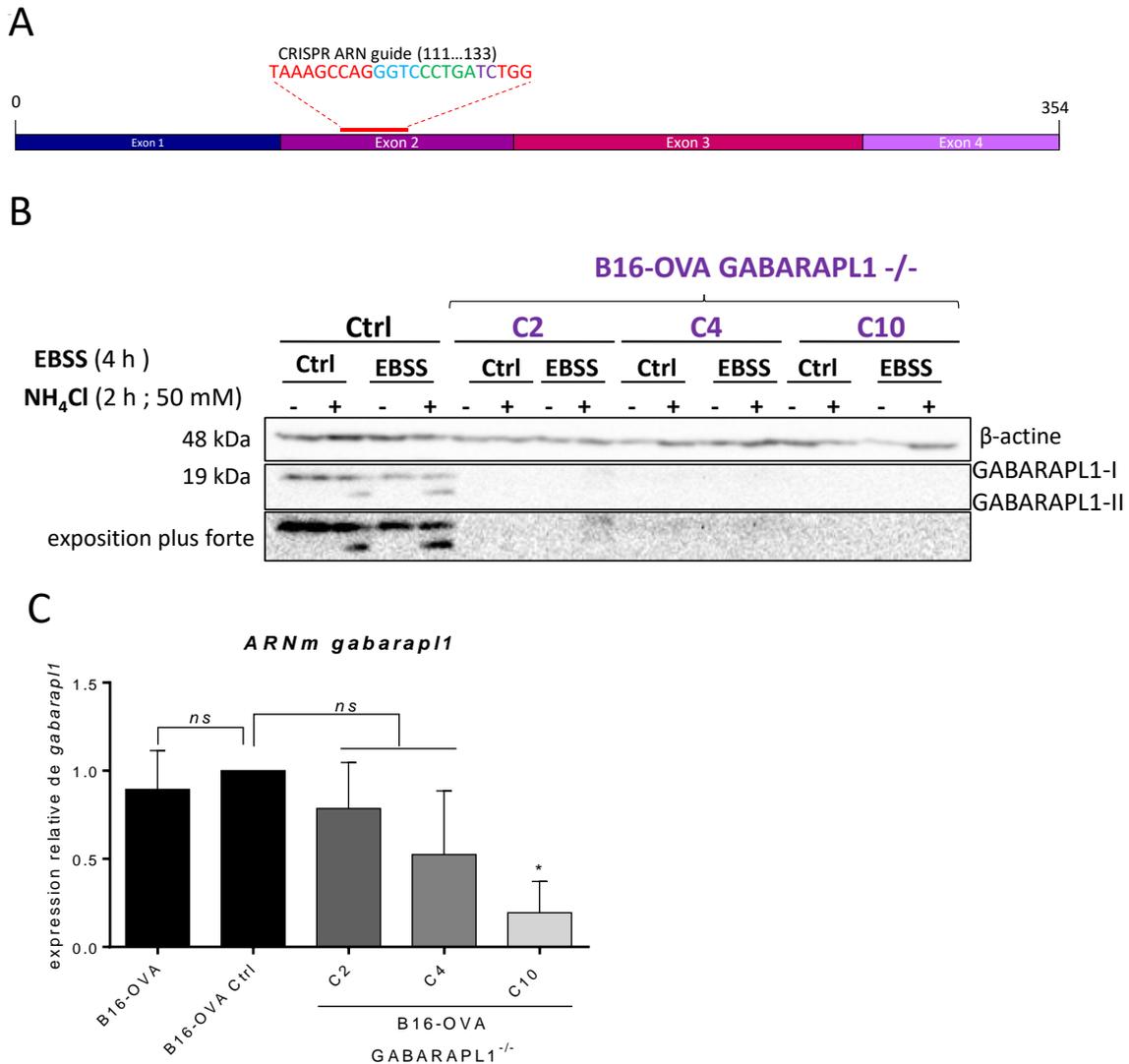


Figure 31 : L'expression de GABARAPL1 a été invalidée dans les lignées de mélanome murin B16-OVA surexprimant l'antigène OVALBUMINE (B16-OVA). **A)** L'expression de GABARAPL1 a été invalidée en utilisant la technologie CRISPR-Cas9 avec un plasmide contenant un ARN guide, ciblant l'exon 2 du gène Gabarapl1 chez *Mus musculus*. Pour le clone contrôle, les cellules B16-OVA ont été transfectées par le plasmide CRISPR-Cas9 sans ARN guide. **B)** Trois clones B16-OVA GABARAPL1^{-/-} ont été sélectionnés par western blotting et un clone contrôle (Ctrl) polyclonal a été gardé. Dans les cellules B16-OVA, l'autophagie a été induite par privation en nutriments en utilisant l'EBSS et bloquée par le chlorure d'ammonium (NH₄Cl). L'expression de la protéine GABARAPL1 a été étudiée en utilisant un anticorps spécifique de GABARAPL1 (ProteinTech). En présence de NH₄Cl, les formes II de GABARAPL1 sont visibles. **C)** L'expression relative du messager Gabarapl1 a été étudiée en RT-qPCR par la méthode du $\Delta\Delta C_t$ à partir des ARN totaux extraits des cellules B16-OVA non traitées. Le graphique est représentatif de 2 expériences indépendantes \pm SD. Unpaired T-test : * $P < 0,05$.

- ***Les flux autophagiques basal et induit sont diminués dans les lignées ayant perdu l'expression de GABARAPL1***

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de l'invalidation de GABARAPL1 sur le flux autophagique dans les cellules B16-OVA qui présentaient de base une forte expression de celle-ci. Le flux autophagique basal a été étudié par western blotting en étudiant le marqueur protéique LC3B-II et en bloquant l'autophagie à l'aide de l'inhibiteur lysosomal NH₄Cl (50 mM pendant 2 h). Ainsi, nos résultats ont montré que le flux autophagique basal était diminué dans les cellules B16-OVA GABARAPL1^{-/-} clones C2, C4 et C10 car LC3B-II s'accumulait moins en présence de l'inhibiteur par rapport aux cellules B16-OVA contrôles (Figure 32A et B). La protéine GABARAPL1 étant surexprimée dans ces cellules, l'extinction de son expression semble avoir un fort impact sur le flux autophagique basal. Nous avons ensuite étudié l'effet de l'invalidation de *Gabarapl1* sur le flux autophagique induit. Nous n'avons pas été en mesure de le déterminer par western blotting en utilisant marqueur LC3B (Figure 32A et C). Nous avons donc utilisé la fluorescence. Les cellules ont été transfectées par le plasmide ptf-LC3B pour déterminer le nombre d'autophagosomes et d'autolysosomes. L'induction de l'autophagie par privation en nutriments (EBSS) n'augmentait pas le nombre d'autolysosomes et d'autophagosomes dans les clones C4 et C10 comparativement au clone contrôle (Figure 32D). Ces résultats suggèrent que GABARAPL1 est nécessaire à l'induction de l'autophagie dans les cellules B16-OVA. Pour la suite de nos travaux, nous avons choisi de garder les clones C4 et C10 dont l'expression de GABARAPL1 est la plus affaiblie.

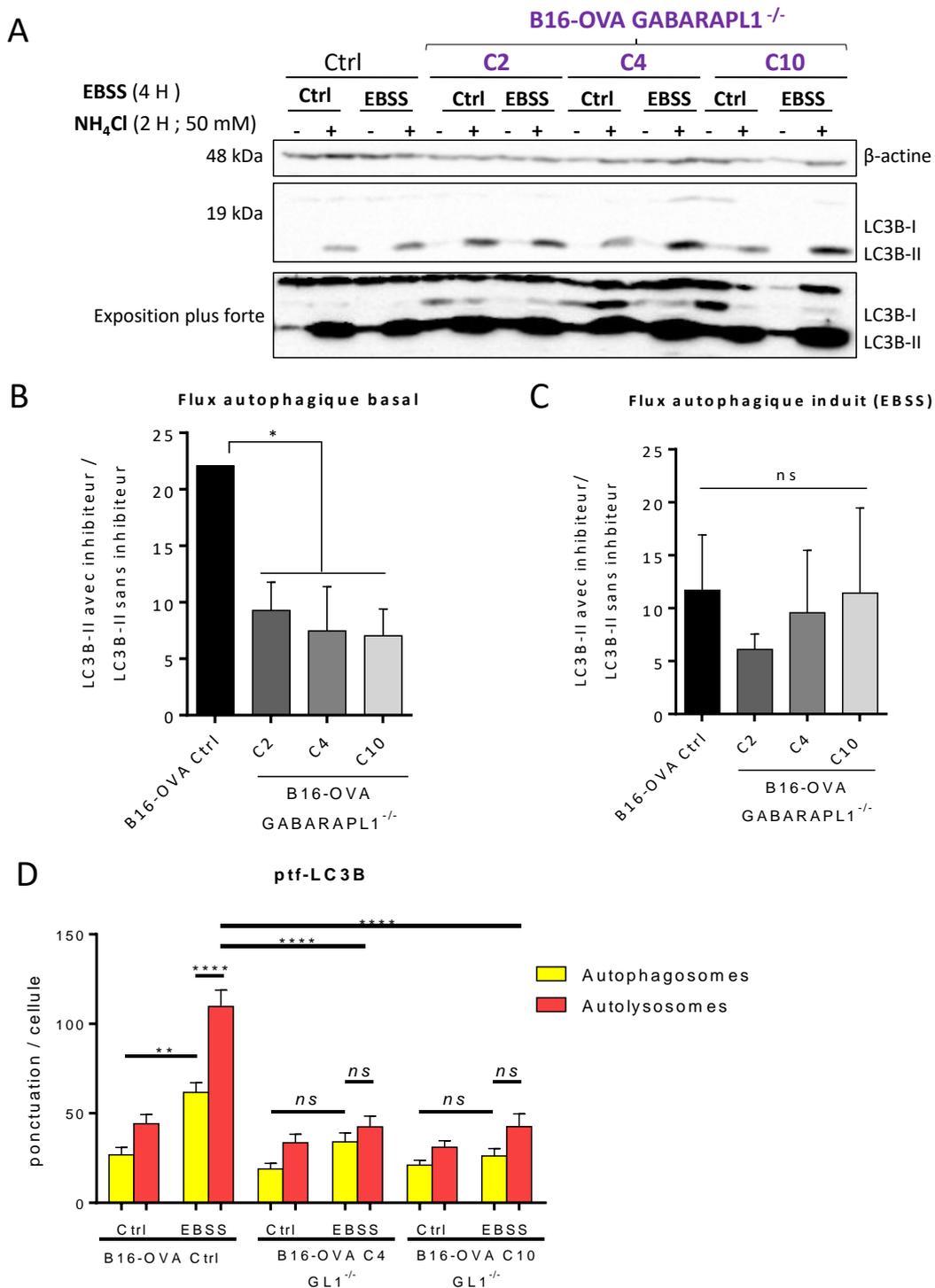


Figure 32 : Le flux autophagique basal ou induit est diminué dans les 3 clones invalidés pour *Gabarap11*. (A) Toutes les lignées cellulaires B16-OVA ont été traitées pendant 4 h à l'EBSS pour induire l'autophagie en présence ou non d'un inhibiteur de la fusion autophagosome-lysosome (NH₄Cl, 50 mM, 2 h). Tous les lysats cellulaires ont été analysés par western blotting (gel SDS-PAGE 12 %). (B) Le flux autophagique basal est présenté sous forme d'histogrammes en mesurant le ratio de l'intensité des bandes de LC3B-II avec un inhibiteur sur LC3B-II sans inhibiteur. (C) Le flux autophagique induit à l'EBSS a été quantifié comme pour B. (B et C) Les graphiques sont représentatifs de 3 expériences. ± SD. One-way ANOVA *: P<0,05. (D) Les lignées B16-OVA Ctrl et B16-OVA GABARAPL1^{-/-} ont été transfectées par le vecteur plasmidique ptf-LC3B (plasmid tandem fluorescent RFP-GFP-LC3B), puis traitées à l'EBSS pour induire l'autophagie. Le graphique représente la quantification du nombre d'autophagosomes (jaune = vert + rouge) et d'autolysosomes (rouge) déterminés à l'aide du logiciel image J à partir des images de microscopie confocale ± SEM. One-way ANOVA. *: P<0,05 ; **: P<0,005 ; ***: P<0,001 ; ****: P<0,0001.

- ***L'extinction de Gabarapl1 ne modifie pas la croissance des cellules B16-OVA in vitro et in vivo dans des souris immunodéficientes***

Nous avons ensuite étudié l'effet de l'inactivation de *Gabarapl1* sur la croissance tumorale. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à la croissance *in vitro* des lignées B16-OVA ctrl et des cellules B16-OVA GABARAPL1^{-/-} C4 et C10. La croissance cellulaire *in vitro* a été suivie pendant 4 jours par un test XTT et ne montre pas de différence significative de croissance entre les cellules B16-OVA Ctrl et les clones C4/C10 (Figure 33C). Nous avons ensuite étudié la croissance de ces différents clones *in vivo* dans le modèle de souris immunodéficiente SCID (Severe Combined ImmunoDeficiency). Ces souris n'ont pas de lymphocytes T et B fonctionnels et l'activité des autres cellules hématopoïétiques est normale (Bosma & Carroll, 1991). Dans un souci de réduction du nombre d'animaux, seul le clone C10, le plus éteint pour *Gabarapl1*, a été utilisé dans ces expériences *in vivo* et aussi parce qu'il n'y avait pas de différence significative de prolifération *in vitro* entre C4 ou C10 et le contrôle. Les deux expériences de croissance (5-6 souris par groupe) menées dans les souris SCID ne permettent pas de mettre en évidence une différence significative de croissance entre les cellules B16-OVA, B16-OVA Ctrl et le clone C10 (Figure 33A et B).

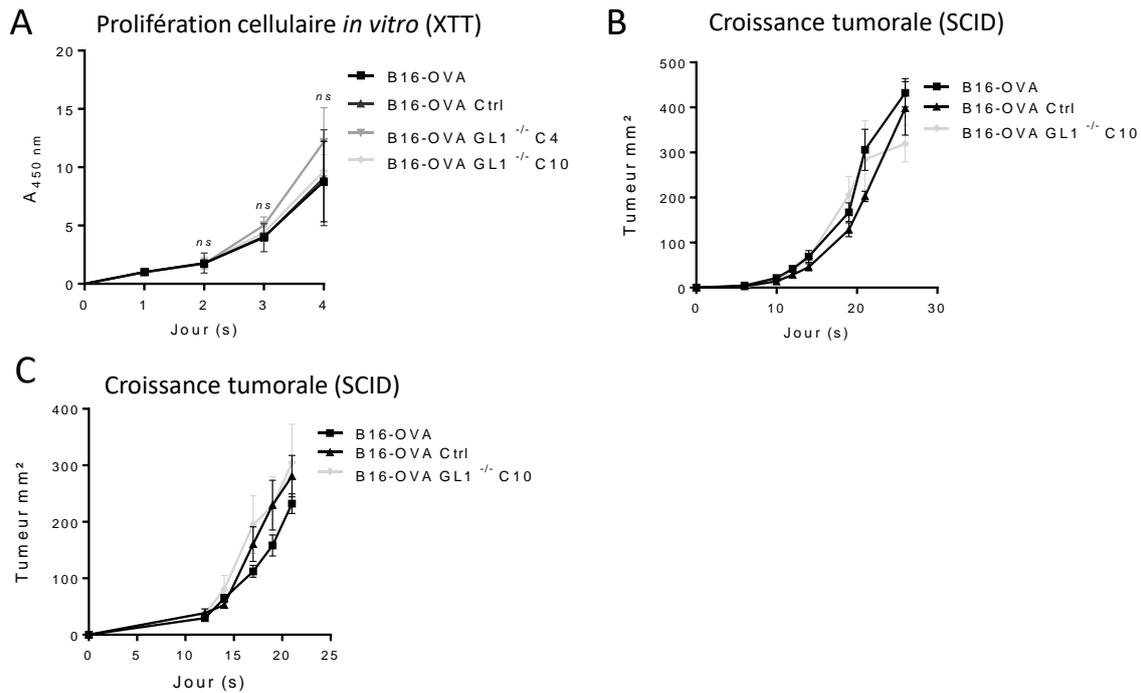


Figure 33 : Les cellules B16-OVA, B16-OVA Ctrl et B16-OVA GABARAPL1^{-/-} (GL1^{-/-}) C4 and C10 prolifèrent de la même façon *in vitro* et *in vivo* dans des souris SCID immunodéficientes. (A) Etude de la prolifération *in vitro* des lignées B16-OVA, B16-OVA Ctrl, B16-OVA GL1^{-/-} sur 4 jours en utilisant un test XTT. Les barres d'erreur sont exprimées en \pm SD. (B) Les cellules B16-OVA, B16-OVA Ctrl et le clone B16-OVA GL1^{-/-} C10 dont l'expression de Gabarapl1 est la plus éteinte ont été injectées en sous-cutané sur le flanc droit des souris SCID femelles immunodéficientes. Les tumeurs primaires déficientes ou non pour l'autophagie ont été mesurées à l'aide d'un pied à coulisse (6 souris/groupe \pm SEM). (C) Les croissances tumorales ont été réalisées dans des souris SCID mâles (5 souris/groupe) avec les mêmes lignées cellulaires qu'en B.

- ***Mais, l'extinction de Gabarapl1 augmente la croissance des cellules B16-OVA dans les souris immunocompétentes C57BL/6N***

Nous avons vu précédemment que l'extinction de *Gabarapl1* n'avait aucun impact sur la prolifération des cellules B16-OVA *in vitro* et *in vivo* dans des souris immunodéficientes. Nous nous sommes donc demandé si le système immunitaire pouvait avoir un impact sur la croissance des cellules B16-OVA *in vivo* dans le modèle de souris immunocompétentes C57BL/6N. Nous avons émis l'hypothèse que la perte de *Gabarapl1* dans les cellules B16-OVA pourrait être corrélée à une diminution de l'expression des molécules du CMH en surface des cellules, donc à une moins bonne reconnaissance de celles-ci par le système immunitaire et à une plus forte croissance tumorale. Les cellules B16-OVA Ctrl et les cellules B16-OVA GABARAPL1^{-/-} C4 et C10 ont été injectées dans des souris C57BL/6N (5-7 souris par groupe). Le suivi de la croissance tumorale a été réalisé pendant environ 19 à 25 jours. A l'issue de 4 expériences, nous avons pu montrer que la prolifération des lignées C4 et C10 était significativement plus rapide que la lignée ctrl et la lignée B16-OVA sauvage (Figure 34A, B et C). Le suivi de la croissance du clone C2 dans ces souris a été réalisé 2 fois et ne présente pas de différence avec la croissance du groupe Ctrl. Ce résultat peut être relié à la persistance de l'expression de la protéine GABARAPL1 et à l'expression des ARNm aussi forte que dans les cellules B16-OVA Ctrl (Figure 34A et B). A la suite de ces 4 expériences, nous pouvons supposer que le système immunitaire ralentissait la croissance des cellules B16-OVA Ctrl et des cellules B16-OVA tandis que celle des cellules B16-OVA GABARAPL1^{-/-}, clones C4 et C10 semblait peu impactée. Tout se passe comme si les cellules B16-OVA GABARAPL1^{-/-} clone C4 et C10 étaient invisibles au système immunitaire. En effet, les courbes de croissance des clones C4 et C10 étaient similaires entre les souris SCID et les C57BL/6N. Au contraire, la croissance des lignées B16-OVA contrôle et sauvage était ralentie dans les souris immunocompétentes, en comparaison à la croissance de ces cellules dans les souris SCID. Les lymphocytes T et/ou B pourraient être impliqués dans cette différence de croissance car ce sont les deux populations absentes des souris SCID.

Le système immunitaire semble être impliqué dans cette différence de croissance tumorale. Nous nous sommes donc interrogés sur la réponse immunitaire des lymphocytes T contre les tumeurs. Pour cela, nous avons étudié la représentation des LT CD4⁺ et CD8⁺ provenant des tumeurs réséquées. A partir des tumeurs de la deuxième série d'expériences de croissance tumorale (souris injectées par les clones B16-OVA Ctrl et B16-OVA C10 (Figure 34B), nous avons extrait les lymphocytes infiltrant les tumeurs (TILs, tumor infiltrating lymphocytes) pour déterminer le pourcentage de lymphocytes T CD4⁺, T CD8⁺ et T Reg parmi les cellules CD3⁺. Lors de cette expérience, nous avons montré que les lymphocytes T CD8 sont plus représentés

dans les TILs issus des tumeurs du groupe C10 (résultats non montrés). Mais nous n'avons pas pu rapporter ce pourcentage à un nombre de lymphocytes infiltrant par mm² car nous n'avons pas comptabilisé le nombre total de TILs. Ce résultat apparaît surprenant car la vocation des lymphocytes T CD8⁺ est de tuer par cytotoxicité les cellules tumorales. Nous aurions alors pu imaginer au contraire une diminution de leur nombre. Lors de la résection des tumeurs, nous avons également étudié l'expression des protéines du CMH-I et II des cellules B16-OVA provenant des tumeurs. En effet, dans les cellules B16-OVA ayant perdu l'expression de *Gabarapl1*, le flux autophagique est diminué ce qui pourrait entraîner une modification de l'apprêtement antigénique par cette voie et conduire à une diminution de l'expression des molécules du CMH-II. Par ailleurs, la protéine GABARAPL1 pourrait être, comme GABARAP, impliquée dans le trafic vésiculaire et l'adressage des récepteurs à la membrane plasmique (Wang *et al*, 1999). La perte de son expression pourrait conduire à perturber l'expression de ces 2 marqueurs à la surface. Au contraire, l'expression de ces protéines pourrait être modifiée du fait de l'apparition d'un environnement inflammatoire dans la tumeur. En effet, la présence d'IFN- γ dans l'environnement tumoral pourrait augmenter l'expression des molécules du CMH-I et II et de cellules B16-OVA positives pour ces molécules (Li *et al*, 2009a). Nous n'avons pas observé de différences significatives entre les cellules B16-OVA contrôle et les cellules B16-OVA GABARAPL1^{-/-} C10 (résultats non montrés). Une simple tendance semble montrer qu'il y a un peu moins de molécules du CMH-II à la surface des cellules dans le groupe C10 (MFI CMH-II).

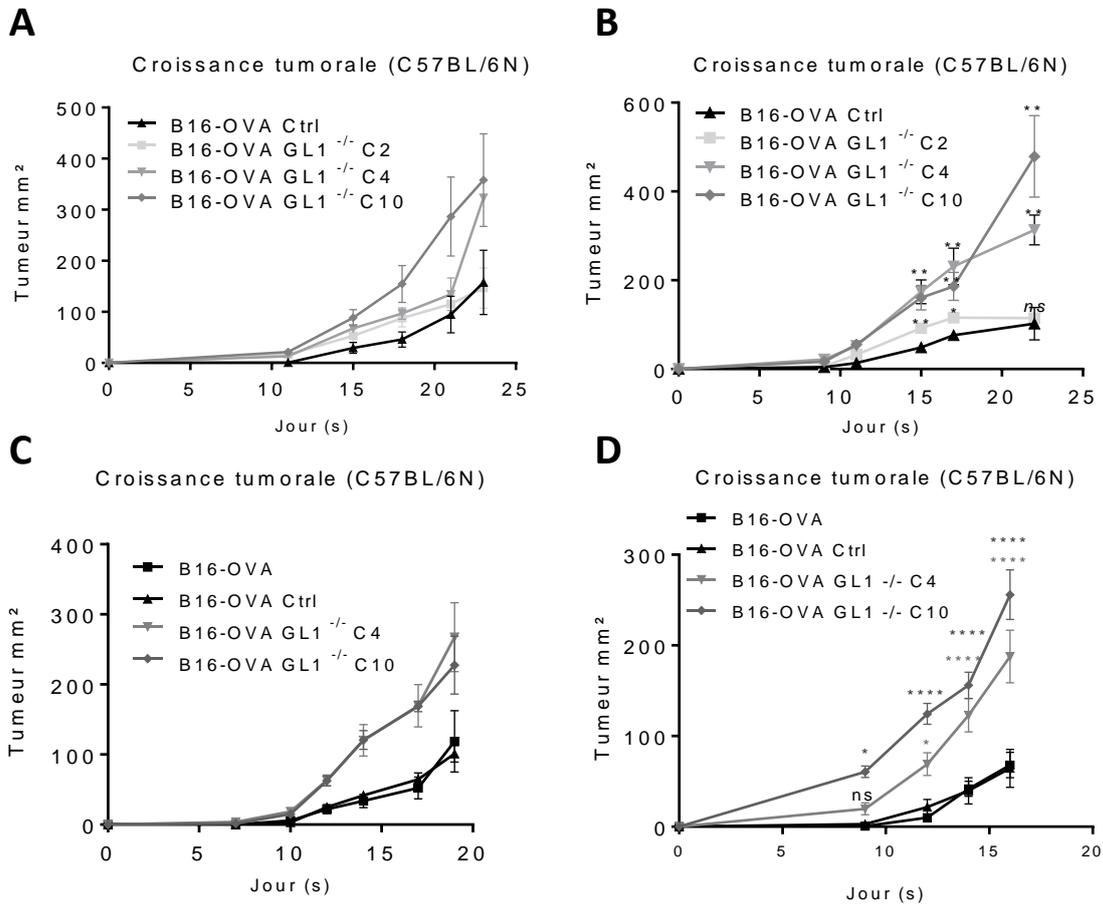


Figure 34 : La croissance tumorale des cellules B16-OVA GABARAPL1^{-/-} clones C4 et C10 est plus élevée dans les souris C57BL/6N que dans les cellules B16-OVA Ctrl. A) Croissance tumorale primaire de différentes lignées de cellules B16-OVA déficientes en autophagie. Les différentes cellules B16-OVA ont été injectées en sous cutané sur le flanc droit des souris C57BL/6N femelles immunocompétentes (5 souris par groupes). (B), (C), en (D). Expériences similaires de croissance tumorale dans des souris C57BL/6N (7 souris/groupe). ANOVA : * : P<0,05 ; ** : P<0,005 ; * P<0,001 ; **** P<0,001. Les barres d'erreurs sont représentées en \pm SEM.**

- ***Il ne semble pas y avoir de différence de fonctionnalité des lymphocytes T CD4 et CD8 infiltrant les tumeurs concernant l'expression de PD1 et TIM3***

Nous avons poursuivi les études sur la caractérisation des différents sous-types de cellules immunitaires et sur la fonctionnalité des lymphocytes infiltrant les tumeurs à J19 (Figure 34C). Les TILs ont été extraits, comptés puis analysés par cytométrie en flux en utilisant les marqueurs de surfaces CD3, CD4 et CD8. La quantité de TILs a tout d'abord été rapportée à la surface de la tumeur en mm². Aucune différence significative entre les différentes tumeurs n'a pu être mesurée. Les lymphocytes CD3⁺CD4⁺ et CD3⁺ CD8⁺ ont été ensuite analysés du point de vue de leur fonctionnalité. Ainsi l'expression de TIM3⁺ et du « check-point » inhibiteur PD1⁺ a été mesurée sur les lymphocytes infiltrant les tumeurs. En effet, l'expression de TIM3 est associée à une plus faible prolifération cellulaire des LT et à une diminution de la sécrétion de perforine et de granzyme B par ces cellules. La protéine PD1, elle, est un récepteur membranaire qui régule négativement la réponse immunitaire en inhibant l'activité des lymphocytes T.

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence significative de fonctionnalité entre les LT extraits des tumeurs des groupes B16-OVA/Ctrl ou des groupes B16-OVA C4/C10 (Figure 35). L'absence d'expression de GABARAPL1 dans les cellules tumorales ne semble donc pas modifier l'infiltration immunitaire des tumeurs par des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, ni modifier l'expression des marqueurs de fonctionnalités tels que PD1 et TIM3.

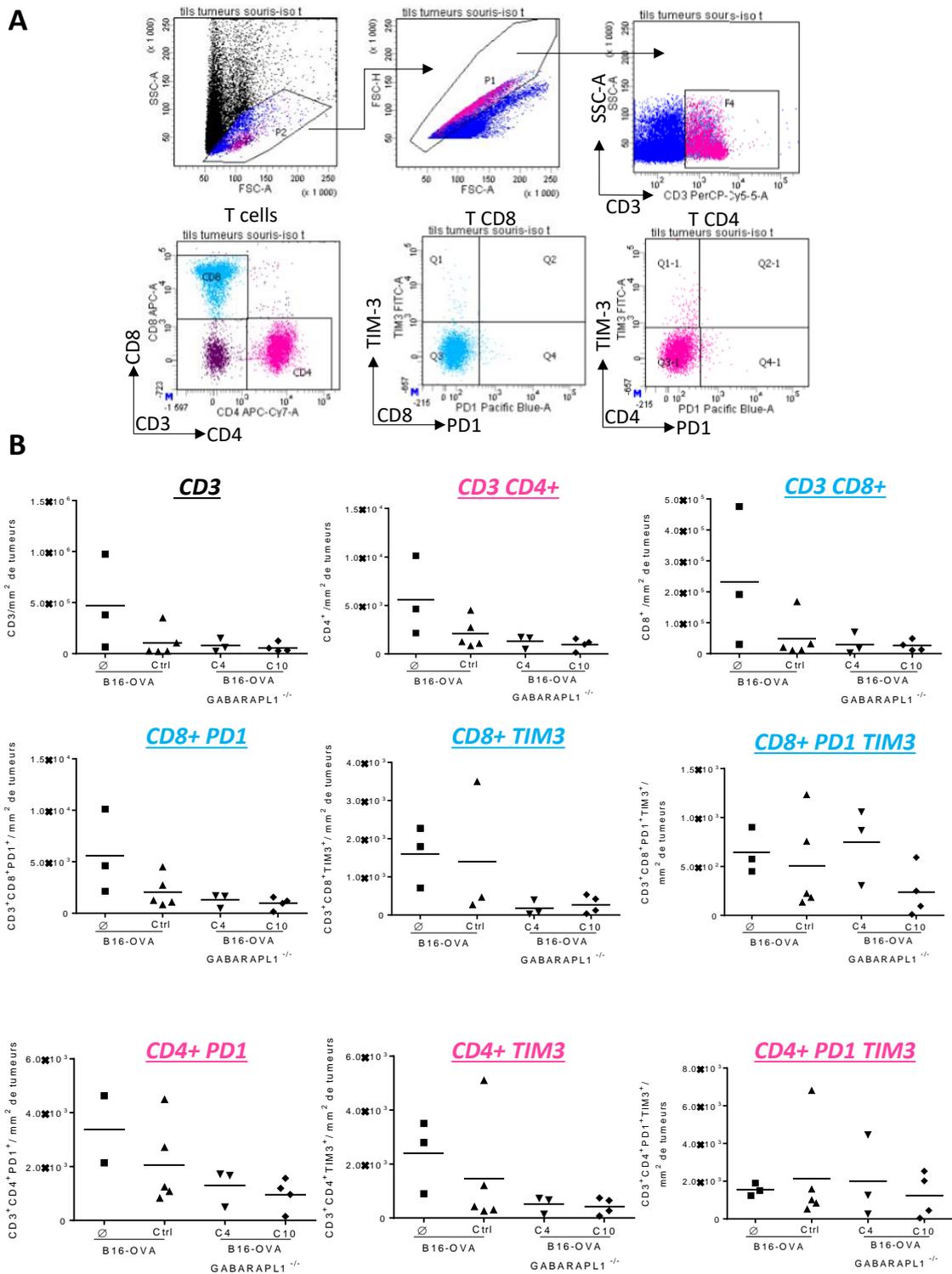


Figure 35 : Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ infiltrants les tumeurs (TILs) ne présentent pas de différence de fonctionnalité entre ceux extraits des tumeurs B16-OVA Ctrl et ceux extraits des tumeurs B16-OVA GABARAPL1^{-/-}. Les différentes lignées B16-OVA ont été injectées en sous-cutané dans les souris C57BL/6N et la croissance a été arrêtée au 19^{ème} jour. A la fin de la croissance, les tumeurs ont été réséquées, dissociées mécaniquement et les TILs extraits. Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ ont ensuite été marqués par des anticorps et analysés par cytométrie en flux. **(A)** Stratégie de « gating » en cytométrie en flux pour étudier la fonctionnalité des populations lymphocytaires T (LT) CD4⁺ et CD8⁺. La fonctionnalité des LT CD4⁺ et CD8⁺ a été recherchée en étudiant l'expression des marqueurs de surface TIM3 et PD1. **(B)** Les pourcentages de TILs CD4⁺ et CD8⁺ par mm² de tumeurs sont présentés, ainsi que le pourcentage par mm² de tumeurs des TILs exprimant les marqueurs TIM3, PD1 ou TIM3/PD1. Chaque point représente les résultats obtenus pour chaque tumeur de souris. One-way ANOVA : non significatif.

- ***L'environnement tumoral des cellules B16-OVA GABARAPL1^{-/-} n'est pas plus immunosuppresseur que celui des cellules B16-OVA contrôle lors de la croissance tumorale***

Nous avons également regardé si l'environnement tumoral était plus immunosuppresseur dans les tumeurs issues des groupes C4 et C10 ce qui pourrait expliquer cette différence de croissance. Pour cela, nous avons recherché la présence de cellules immunosuppressives comme les MDSC (Myeloid-derived suppressor cells). Les MDSC sont décrites comme réprimant la réponse immunitaire des T et sont caractérisées par l'expression des marqueurs de surface Cd11b⁺ et Gr-1⁺ (Youn *et al*, 2008). Une sous-population de MDSC dite « high » exprime fortement les marqueurs CD11b et Gr-1. Il s'agit des MDSC granulocytaires. Les autres sont monocytaires. Nous avons recherché parmi les MDSC celles exprimant également PD-L1 car les MDSC PD-L1⁺ sont souvent retrouvées dans les TILs (Iwata *et al*, 2016). Une différence d'infiltration tumorale par les MDSC monocytaires (M-MDSC, CD11b⁺Gr-1⁺PD-L1⁺) et les MDSC granulocytaires (Gr-MDSC, CD11b^{high}Gr-1^{high}PD-L1⁺) a été recherchée dans les différents types de tumeurs (Figure 36A). Mais, aucune différence significative entre les groupes n'a été enregistrée (Figure 36B). Nous ne pouvons donc pas impliquer les MDSC dans cette différence de croissance. Dans toutes nos études de croissance, nous avons parfois analysé un nombre insuffisant de tumeurs car des souris n'avaient pas survécu. Dans d'autres cas, les tumeurs se nécroisaient avant le 19^{ème} jour de croissance et les souris ont été sacrifiées. Dans les prochaines expériences de croissance, il faudrait augmenter le nombre de souris pour conserver le jour du sacrifice, un nombre suffisant de souris vivantes. Cela nous permettra, peut-être d'obtenir des résultats significatifs avec moins de répétitions et moins de souris au total.

- ***L'expression des molécules du CMH-I et II et de PD-L1 in vivo n'est pas différente entre les groupes***

Enfin, nous avons, dans cette seconde expérience, analysé l'expression en surface du CMH de classe I, II et de PD-L1 des différentes lignées B16-OVA provenant des tumeurs reséquées. Les molécules du CMH de classe I et II portant des peptides antigéniques sont reconnues par les TCR des lymphocytes T CD8⁺ et CD4⁺. Ils permettent ainsi la surveillance par le système immunitaire des cellules considérées comme du non-soi et leur élimination. Ainsi, une diminution de l'expression de surface des molécules CMH-I (ou du CMH-II) des cellules B16-OVA conduit à une moins bonne détection et élimination de ces cellules tumorales. Aussi, nous avons étudié l'expression de PD-L1 car les cellules tumorales peuvent échapper aux attaques du système immunitaire en exprimant à leur surface la protéine PD-L1. PD-L1 agit

alors en se fixant sur les récepteurs PD1 ou B7-1 des lymphocytes T conduisant à leur inactivation (Ostrand-Rosenberg *et al*, 2014).

Dans cette expérience nous n'avons pas encore été en mesure de détecter une différence d'expression significative des molécules du CMH-I, -II et PD-L1 à la surface entre les cellules B16-OVA ctrl et les clones C4/C10 provenant des tumeurs (Figure 37A, B et C). Nous observons encore cependant une légère tendance à la diminution de l'expression des molécules du CMH-II dans le clone C4 et C10 (MFI CMH-II, Figure 37A).

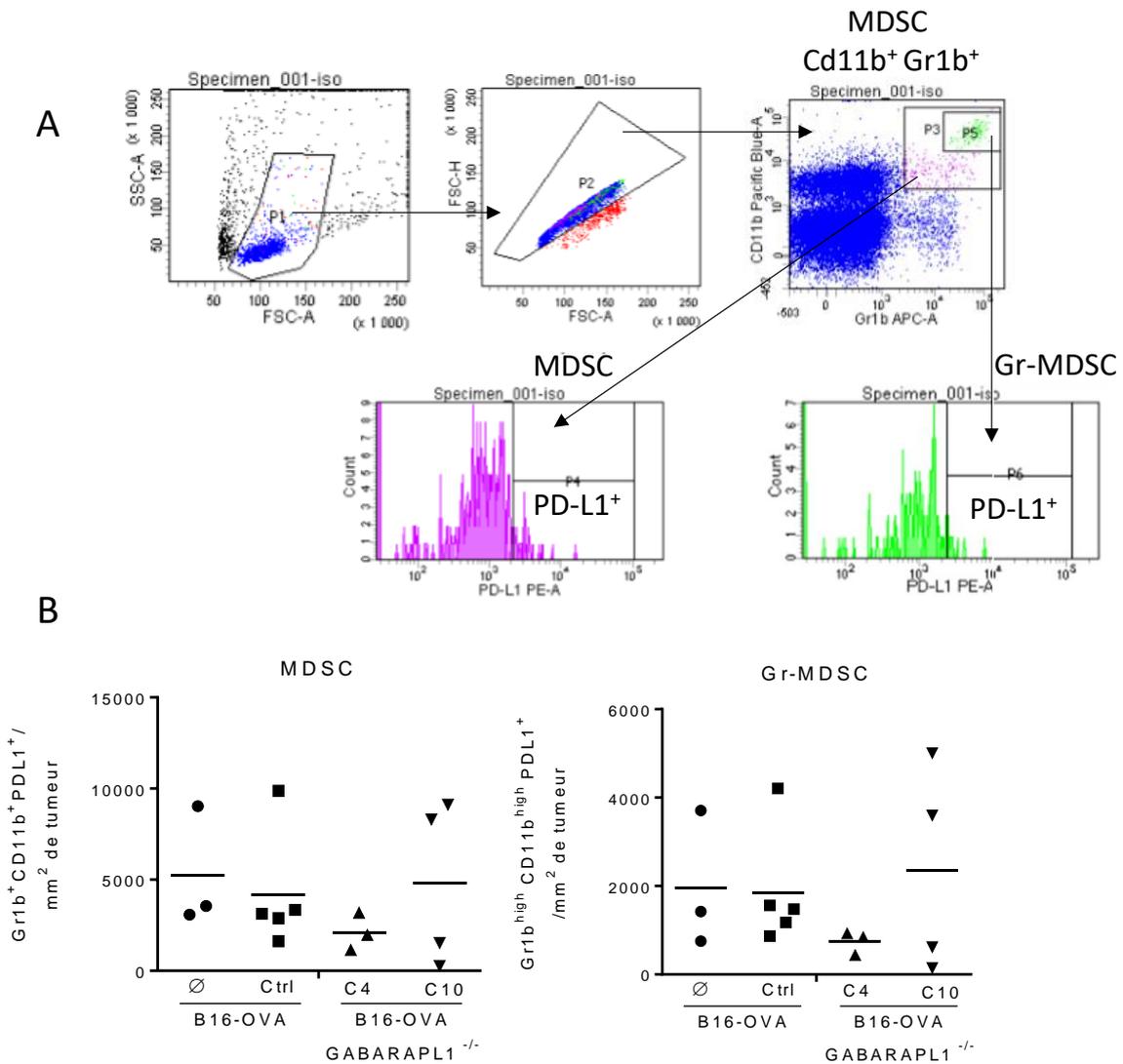


Figure 36 : Les MDSC et les MDSC granulocytaires (Gr-MDSC) infiltrant les tumeurs ne diffèrent pas entre les groupes de tumeurs exprimant ou n'exprimant pas GABARAPL1. Les différentes lignées B16-OVA ont été injectées en sous-cutané dans les souris C57BL/6N et les tumeurs ont été réséquées au 19^{ème} jour de croissance. (A) Stratégie de « gating » en cytométrie en flux pour étudier pour définir les populations de MDSC (CD11b⁺Gr-1⁺PD-L1⁺) et les Gr-MDSC (CD11b^{high}Gr-1^{high}PD-L1⁺). (B) Pourcentage des MDSC et des Gr-MDSC actives infiltrant les différentes tumeurs par mm² dans les souris C57BL/6N. One-way ANOVA : non significatif.

- ***Les cellules B16-OVA, B16-OVA Ctrl, B16-OVA GABARAPL1^{-/-} (C4 et C10) activent de la même manière les lymphocytes T CD8 OT-I in vitro***

À la suite de la différence de croissance tumorale entre les cellules B16-OVA Ctrl et les cellules B16-OVA GABARAPL1^{-/-}, nous avons voulu regarder si les lymphocytes T CD8⁺ OT-I étaient capables de reconnaître de la même façon les différentes lignées B16-OVA. Des expériences *in vitro* ont été réalisées pour étudier l'activation des cellules T CD8⁺ OT-I. Pour cela, les cellules B16-OVA exprimant ou non GABARAPL1 ont été mises en co-culture avec les lymphocytes OT-I. Les cellules B16-OVA et B16-OVA GABARAPL1^{-/-} ont été prétraitées sur la nuit par de l'IFN- γ pour activer l'expression des protéines du CMH-I. Les cellules ont ensuite été irradiées pour bloquer leur prolifération, puis elles ont été mises en co-culture avec des lymphocytes OT-I en présence d'un inhibiteur de la sécrétion des cytokines, la bréfeldine A. Nous avons effectué un marquage intracellulaire de l'IFN- γ , afin d'étudier en cytométrie en flux sa production par les lymphocytes T CD8⁺. Nos résultats ont montré que les lymphocytes T CD8⁺ étaient activés par les 3 types cellulaires mais nous n'avons pas observé de différence significative dans la présentation du peptide OVA par les différents clones B16-OVA ou B16-OVA GABARAPL1^{-/-} (Figure 38A et C). Nous avons également étudié la prolifération des LT CD8⁺ par cytométrie en marquant les LT aux CFSE. Les résultats montrent qu'il n'existe, comme précédemment, aucune différence significative entre les groupes exprimant ou non GABARAPL1 (Figure 38B et D).

- ***Conclusion sur les résultats complémentaire de la délétion de Gabarapl1 dans les lignées B16-OVA***

Nous avons montré qu'il existe une différence de croissance entre les cellules B16-OVA et les cellules B16-OVA GABARAPL1^{-/-} *in vivo*. En effet, Les cellules B16-OVA ayant perdu l'expression de GABARAPL1 prolifèrent plus vite *in vivo* dans des souris immunocompétentes et il n'y a pas de différence *in vitro* ou *in vivo* dans des souris immunodéficientes. Ce résultat important suggère l'implication du système immunitaire dans cette différence de croissance *in vivo*. Les cellules B16-OVA GABARAPL1^{-/-} semblent moins immunogènes. Cependant le mécanisme immunitaire impliqué n'a pas encore été identifié. Nous n'avons pas pu démontrer l'implication des lymphocytes T CD4⁺, CD8⁺, des Treg et des cellules MDSC qui pourrait expliquer cette différence de croissance entre les groupes. La déplétion des LT CD4⁺ et CD8⁺ dans les souris C57BL/6N portant les tumeurs pourrait être réalisée afin de confirmer que ces populations lymphocytaires sont impliquées dans la différence de croissance tumorale observées dans les différents groupes. De plus, pour totalement exclure l'implication des lymphocytes T dans la différence de croissance observée, il faudrait regarder le statut

fonctionnel d'activation des lymphocytes T. Pour cela, nous souhaitons analyser l'expression du marqueur mémoire de surface d'activation CD44 qui témoigne de l'activation des cellules T et qui persiste chez les cellules mémoires effectrices. En effet, il se pourrait que les lymphocytes T CD4 et CD8 extraits des tumeurs C4/C10 n'expriment pas d'avantage de PD1 et TIM3 car ils n'ont pas été activés. De même, pour étudier l'activation des lymphocytes infiltrant les tumeurs, nous souhaitons quantifier l'expression intracellulaire des cytokines inflammatoires tels que l'IFN- γ ou le TNF α en bloquant leur sécrétion par la bréfeldine A. Enfin, la sécrétion de Granzyme B pourrait être également analysée pour estimer l'activation des lymphocytes T effecteur CD8 cytotoxiques. Si notre hypothèse est juste alors les lymphocytes infiltrant les tumeurs B16-OVA GABARAPL1^{-/-} devraient être moins activés.

De plus, nous n'avons pas pu mettre en évidence de différence d'expression des molécules de CMH-I et II à la surface des cellules B16-OVA *in vitro* et *in vivo*. Les lignées B16-F10 expriment de base peu de ces molécules à cause de la régulation négative, ou l'absence d'expression de plusieurs acteurs de la voie d'apprêtement et de présentation par les molécules du CMH-I (Seliger *et al*, 2001). C'est l'expression d'IFN- γ *in vitro* ou *in vivo* qui permet cette augmentation d'expression (Seliger *et al*, 2001). Ainsi, peut-être faudrait-il *in vitro* utiliser des faibles concentrations de l'ordre de 5 à 10 ng/mL, plutôt que les 100 ng/mL utilisés pour visualiser une différence entre les groupes. Pour les expériences *in vivo*, il faudrait éventuellement réaliser une cinétique (à 5, 10, 15 et 20 jours) avant de réséquer les tumeurs B16-OVA et d'observer par cytométrie en flux l'expression des molécules CMH-I et II. En effet, aux alentours du 20^{ème} jour de croissance les tumeurs B16-OVA et B16-OVA GABARAPL1^{-/-} ont déjà probablement complètement échappé au système immunitaire. Ainsi, une différence entre les groupes pourrait difficilement être mise en évidence. En effet, Li et collaborateurs ont suivi l'expression des molécules du CMH-I et de l'IFN- γ dans des tumeurs B16 au 5^{ème}, 10^{ème} et au 25^{ème} jour. Leurs données suggèrent que les cellules B16 expriment très fortement les molécules du CMH-I lorsque la croissance tumorale atteint 5 ou 15 jours (Li *et al*, 2009a). Ce pourcentage de cellules positives pour les molécules du CMH-I diminue ensuite drastiquement au 25^{ème} jour. La quantité d'IFN- γ dosée dans les tumeurs (RT-PCR et ELISA) suit l'expression du CMH-I des cellules B16 (Li *et al*, 2009a). Ces données, nous poussent à croire que l'étude des tumeurs B16-OVA que nous avons réalisée, ne peuvent pas nous donner de réponses car elles ont été réalisées trop tard.

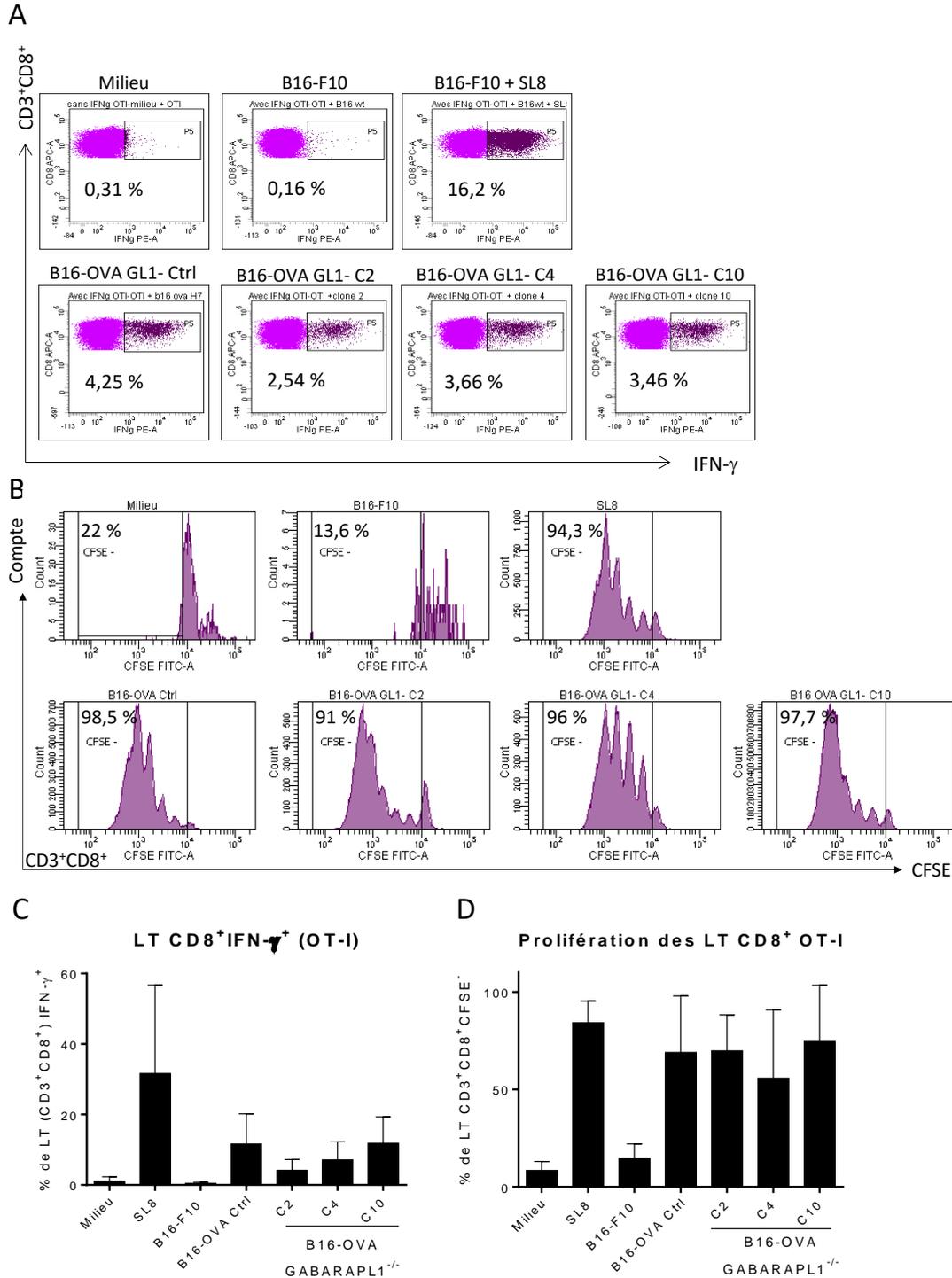


Figure 38 : Les cellules B16-OVA Ctrl et B16-OVA GABARAPL1^{-/-} (GL1- C2, C4 et C10) activent de la même façon la prolifération des LT CD8⁺ OT-I et leur sécrétion d'IFN- γ . Les différentes lignées B16-OVA ont été prétraitées pendant 24 h par de l'IFN- γ (100 ng/mL) pour augmenter l'expression des protéines du CMH-I, puis irradiées le jour de la co-culture. (A et C) Les lignées B16-OVA ont été co-cultivées pendant 16 h avec des LT CD8⁺ OT-I prétraités par le réactif Golgiplug afin d'inhiber la sécrétion d'IFN- γ . L'activation des LT CD3⁺CD8⁺ a été mesurée par cytométrie en flux en mesurant la production d'IFN- γ par un marquage intracellulaire. (C) Moyenne du pourcentage d'IFN- γ dans les LT CD8⁺ OT-I (n=4) \pm SD. (B et D) Les lignées B16-OVA ont été co-cultivées pendant 3 jours avec des LT CD8⁺ OT-I marqués au CFSE pour suivre leur prolifération en cytométrie en flux. (D) Pourcentage moyen de la prolifération des LT CD8⁺ OT-I mis en co-culture avec les différentes lignées B16-OVA (n=3) \pm SD. (A-D) Contrôles positifs : les cellules B16-F10 ont été incubées pendant 3 h avec le peptide OVA₂₅₇₋₂₆₄ (SL8).

3. Etude du rôle de la protéine autophagique ATG9A dans le cancer du sein

Les données du laboratoire ont permis de mettre en évidence que l'expression de GABARAPL1 était diminuée dans certains cancers et que cette diminution pouvait être associée à des modifications épigénétiques chez ces patients (Hervouet *et al*, 2015). La thématique du laboratoire a évolué vers la recherche d'autres gènes de l'autophagie dont l'expression pourrait être régulée dans le cancer du sein. Six gènes ont été sélectionnés : ATG9A, ATG9B, BECLIN1, LC3B, NIX et p62 en fonction de leur rôle dans l'autophagie ou de leur description dans la littérature. La quantification de l'expression de ces 6 gènes a été réalisée sur une cohorte de 47 patientes atteintes de cancer du sein en dosant les ARNm codant ces protéines dans les échantillons de tissus cancéreux puis comparés au tissu sain adjacent de la tumeur. Parmi l'ensemble des résultats obtenus, une différence d'expression significative d'ATG9A a été trouvée dans les tissus cancéreux par rapport au tissu sain adjacent. L'inclusion dans la cohorte d'autres patients a permis de montrer que ATG9A était surexprimée dans les cancers du sein triple négatifs (Claude-Taupin *et al*, 2018).

Le rôle de la protéine ATG9A a donc été étudié au sein du laboratoire dans la lignée triple négative MDA-MB-436 pour déterminer son implication dans le flux autophagique et dans le phénotype cancéreux *in vitro* et *in vivo*. L'expression d'Atg9A a été éteinte dans cette lignée par l'utilisation de shRNA. Il a été montré que l'absence d'expression de ATG9A dans les lignées cellulaires MDA-MA-436 inhibait le phénotype cancéreux (Claude-Taupin *et al*, 2018). L'ensemble des résultats a donné lieu à une publication à laquelle j'ai participé en contribuant à l'évaluation des croissances tumorales dans des souris SCID (**Publication II**).

Publication II

“ATG9A is overexpressed in triple negative breast cancer and its *in vitro* extinction leads to the inhibition of pro-cancer phenotypes”

Aurore Claude-Taupin, **Leïla Fonderflick**, Thierry Gauthier, Laura Mansi, Jean-René Pallandre, Christophe Borg, Valérie Perez, Franck Monnien, Marie-Paule Algros, Marc Vigneron, Régis Delage-Mourroux, Michaël Boyer-Guittaut and Eric Hervouet

Cells, 2018

Article

ATG9A Is Overexpressed in Triple Negative Breast Cancer and Its In Vitro Extinction Leads to the Inhibition of Pro-Cancer Phenotypes

Aurore Claude-Taupin ¹, Leïla Fonderflick ¹, Thierry Gauthier ¹, Laura Mansi ¹, Jean-René Pallandre ¹, Christophe Borg ¹, Valérie Perez ¹, Franck Monnier ², Marie-Paule Algros ², Marc Vigneron ^{3,4}, Pascale Adami ¹, Régis Delage-Mourroux ¹, Paul Peixoto ^{1,5}, Michaël Herfs ⁶, Michaël Boyer-Guittaut ^{1,7} and Eric Hervouet ^{1,4,7,*} 

¹ INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, University Bourgogne Franche-Comté F-25000 Besançon, France; taupin.aurore@gmail.com (A.C.-T.); leila.fonderflick@orange.fr (L.F.); thierry.gauthier59@hotmail.fr (T.G.); mansi.laura@gmail.com (L.M.); jean-rene.pallandre@efs.sante.fr (J.-R.P.); christophe.borg@efs.sante.fr (C.B.); valerie.perez@univ-fcomte.fr (V.P.); pascale.adami@univ-fcomte.fr (P.A.); regis.delage-mourroux@univ-fcomte.fr (R.D.-M.); paul.peixoto@univ-fcomte.fr (P.P.); michael.boyer-guittaut@univ-fcomte.fr (M.B.-G.)

² Department of Pathology, University Hospital of Besançon, F-25000 Besançon, France; fmonnier@chu-besancon.fr (F.M.); mp1algros@chu-besancon.fr (M.-P.A.)

³ Team Replisome Dynamics and Cancer. UMR7242 Biotechnologie et Signalisation Cellulaire, CNRS-University Strasbourg, F-67412 Illkirch, France; marc.vigneron@unistra.fr

⁴ Ecole Supérieure de Biotechnologie de Strasbourg, University Strasbourg, CNRS, UMR 7242, F-67412 Illkirch, France

⁵ EPIGENEXP platform, University of Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

⁶ Boratory of Experimental Pathology, GIGA-Cancer, University of Liege, B-4000 Liege, Belgium; m.herfs@ulg.ac.be

⁷ DimaCell platform, Univ. Bourgogne Franche-Comté, F-25000 Besançon, France

* Correspondence: eric.hervouet@univ-fcomte.fr; Tel.: +33-81666542

Received: 21 September 2018; Accepted: 29 November 2018; Published: 6 December 2018



Abstract: Early detection and targeted treatments have led to a significant decrease in mortality linked to breast cancer (BC), however, important issues need to be addressed in the future. One of them will be to find new triple negative breast cancer (TNBC) therapeutic strategies, since none are currently efficiently targeting this subtype of BC. Since numerous studies have reported the possibility of targeting the autophagy pathway to treat or limit cancer progression, we analyzed the expression of six autophagy genes (*ATG9A*, *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *NIX* and *P62/SQSTM1*) in breast cancer tissue, and compared their expression with healthy adjacent tissue. In our study, we observed an increase in *ATG9A* mRNA expression in TNBC samples from our breast cancer cohort. We also showed that this increase of the transcript was confirmed at the protein level on paraffin-embedded tissues. To corroborate these in vivo data, we designed shRNA- and CRISPR/Cas9-driven inhibition of *ATG9A* expression in the triple negative breast cancer cell line MDA-MB-436, in order to determine its role in the regulation of cancer phenotypes. We found that *ATG9A* inhibition led to an inhibition of in vitro cancer features, suggesting that *ATG9A* can be considered as a new marker of TNBC and might be considered in the future as a target to develop new specific TNBC therapies.

Keywords: *ATG9A*; autophagy; triple negative breast cancer; MDA-MB-436; shRNA; CRISPR/Cas9

1. Introduction

Breast cancer (BC) is one of the three most commonly diagnosed cancers in women. In 2018, 266,120 new cases of female invasive BC were diagnosed in the United States [1]. Thanks to earlier detection and the development of specific targeted treatments, mortality has declined by about 30% over the past two decades [2]. Nevertheless, the American Cancer Society still estimated 41,400 deaths linked to breast cancer in the United States in 2018 [1], rendering it a major health problem. Triple negative breast cancer (TNBC) represent approximately 10% of BCs and is defined as tumors lacking estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) expression (ER⁻, PR⁻, HER2⁻). TNBC presents with a poor prognosis mainly because of the limited treatment options. In fact, no specific therapy targeting TNBC is currently available, and cytotoxic chemotherapy remains the current treatment strategy [3].

During the course of development of new therapeutic options for the treatment of BC, numerous studies have reported the possibility of targeting the autophagy pathway. For example, autophagy inhibition has been shown to improve chemotherapy efficiency in TNBC presenting with high levels of LC3B expression, the main protein marker of autophagy [4], and to enhance the therapeutic response in both anthracycline-sensitive and resistant TNBC cells [5]. Autophagy has also been proposed to protect TNBC cells from damaged mitochondria accumulation induced by chemotherapies [6]. These data led to the publication of several phase II clinical trials, which were conducted, or are underway, to determine the efficiency and safety of hydroxychloroquine, an autophagy inhibitor preventing lysosomal acidification, in combination with different chemotherapies (Ixabepilone, Plaquenil, Everolimus, and Gedatolisib) in recurrent or metastatic breast cancer patients (NCT00765765, NCT02414776, NCT03032406, NCT03400254, clinicaltrials.gov (US National Library of Medicine)).

Autophagy is a cellular process involved in the maintenance of cell homeostasis and cell survival, by inducing the degradation and/or the recycling of intracellular components such as protein aggregates or organelles (e.g., damaged mitochondria). This process is mediated by more than 40 core ATG (AuTophagy-related) proteins and characterized by the formation of a double-membrane structure, called phagophore, which elongates and closes to generate an autophagosome. The autophagosome, which engulfs cytosolic material as well as organelles, later fuses with a lysosome to form an autophagolysosome, leading to the degradation of its content by lysosomal proteases (reviewed in [7]). The initiation and elongation of this structure requires several ATG proteins, one of them being the ATG9 protein. Two isoforms of ATG9, A and B, are expressed in mammals and these proteins are the only transmembrane ATG proteins identified so far. ATG9A is ubiquitously expressed, while ATG9B is enriched in the placenta and pituitary gland, suggesting that ATG9B may play a specific role during embryogenesis [8]. While the specific function of these two isoforms remains unclear, it has been proposed that ATG9B may complement ATG9A during autophagy. ATG9A presents six conserved transmembrane domains with both N- and C-terminus localized on the cytofacial side of the vesicle. ATG9A continuous cycling between the plasma membrane, endosomes and trans-Golgi network is believed to be necessary for a Futophagosome formation and vesicles containing ATG9A have therefore been proposed as the main candidates for delivering lipids to growing phagophores [9]. Indeed, under nutrient-rich conditions, ATG9A is found in the trans-Golgi network, recycling and late endosomal compartments [9–15], but upon amino-acid starvation, it is relocalized towards the autophagosome initiation site, where it dynamically interacts with phagophores and autophagosomes, without being incorporated into them [10].

ATG9A dysregulation has already been linked to cancer, since ATG9A protein overexpression has been associated with poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma [16], whereas ATG9A inhibition was associated to the apparition of Trastuzumab resistance in HER2⁺ BC cells [17]. Furthermore, a recent study reported a decrease in *ATG9A* mRNA expression in breast invasive ductal carcinomas, compared to adjacent healthy tissues, and this decrease was linked with increased promoter methylation [18]. More interestingly, the authors also demonstrated a significant decrease

in *ATG9A* mRNA expression in HER2⁺ BC, but to our knowledge, no published study has already characterized the expression and the role of *ATG9A* in TNBC.

In this study, we therefore analyzed the expression of six *ATG* genes (*ATG9A*, *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *NIX* and *SQSTM1/P62*) using quantitative real-time PCR (qRT-PCR) in BC tissues, and compared their expression with healthy adjacent tissue. Our data clearly demonstrated that only *ATG9A* mRNA levels were significantly higher in TNBC tissue compared to healthy adjacent tissue. We also confirmed these data at the protein level using Immunohistochemical (IHC) analysis of tumors compared to healthy adjacent tissues. We then inhibited *ATG9A* expression in the TNBC cell line MDA-MB-436, and observed that *ATG9A* inhibition led to an inhibition of in vitro cancer features, such as proliferation and invasion.

2. Materials and Methods

2.1. Ethics Statement

Human samples were collected according to French laws, and the recommendations of the French National Committee of Ethics. Indeed, this study has been approved by the scientific committee of the “Tumorothèque Régionale de Franche-Comté” (BB-0033-00024) in 2003. The samples and the medical history of patients were encoded to protect patient confidentiality, and used under protocols approved by the recommendations of the French national Committee of Ethics. All human samples were collected by Pr. Séverine Valmary-Degano (Centre Hospitalier Régional Universitaire, Besançon, France) at the “Tumorothèque régionale de Franche-Comté”. Collection of samples and their use (AC-2010-1163) for further studies have been approved by the French “Ministère de la Recherche” and by the CPP EST II. We obtained all required consents from any patients involved in the study.

2.2. Tumor Samples

Patients were treated in two medical centers (“Centre Hospitalier Régional Universitaire de Besançon” and “Centre Hospitalier Régional de Belfort-Montbéliard”), and the samples collected were included by the “Tumorothèque Régionale de Franche-Comté” (BB-0033-00024) between January 2007 and September 2014 ($n = 80$). The median age was 58 years (range 26–85) and patients were selected according to their BC subtype at the time of diagnosis. Breast tumor subtypes were determined using ER (estrogen receptor), PR (progesterone receptor), and HER2 (human epidermal growth factor receptor 2) immunohistochemistry (IHC) staining (paraffin-embedded material). The threshold of negative signs was classified for ER and PR at $\leq 10\%$ regardless of the staining intensity. Staining of HER2 was divided into negative (0/1+) and positive (2/3+), where 2+ staining was confirmed using SISH (silver in situ hybridization) amplification. The histological grade was determined according to the Elston and Ellis classification [19]. All the clinical information regarding the different patients included in the study can be found in Table 1.

Table 1. Clinical information regarding the patients included in the study.

Cohort 1 (37)		Cohort 2 (80)	
Characteristics	N	Characteristics	N
Age (year) (37)		Age (year) (80)	
>57	18	>58	40
≤57	19	≤58	40
BC subtype (37)		BC subtype (80)	
LumA	13	LumA	30
LumB	10	LumB	14
HER-2	4	HER-2	6
TN	10	TN	30

Table 1. Cont.

Cohort 1 (37)		Cohort 2 (80)	
Grade (36)		Grade (79)	
I	5	I	9
II	21	II	37
III	10	III	33
pT (mm) (35)		pT (mm) (78)	
≤20	18	≤20	35
20–50	16	20–50	41
≥50	1	≥50	2
pN (36)		pN (80)	
negative	17	negative	41
positive	19	positive	39
ER status (37)		ER status (80)	
negative	14	negative	36
positive	23	positive	44
PR status (37)		PR status (80)	
negative	15	negative	39
positive	21	positive	41
HER-2 status (37)		HER-2 status (80)	
negative	23	negative	60
positive	14	positive	20

The table on the left represents Cohort 1, which was used to quantify the expression of *ATG9A*, *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *NIX*, and *P62/SQSTM1* mRNA levels. The table on the right (Cohort 2) represents the extended cohort, which was used to further analyze *ATG9A* mRNA levels in BC. N: Number of patients; the numbers in brackets are the total number of analyzed samples among the cohort; pT: Tumor size; pN: Lymph node status; ER: Estrogen receptor; PR: Progesterone receptor; HER-2: Human epidermal growth factor receptor-2.

2.3. Antibodies

For western blotting experiments or IHC, the following antibodies were used: Rabbit monoclonal anti-ATG9A (Abcam, Paris, France, ab108338), rabbit anti-Ki67 (Ventana, clone 30-9), rabbit anti-LC3B (Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France, L8918), rabbit polyclonal anti-ACTIN (Sigma-Aldrich, A5060), and secondary goat polyclonal anti-rabbit HRP (Abliance, Compiègne, France, BI2407).

2.4. Cell Culture

MDA-MB-231 and MDA-MB-436 cells were cultured in Dulbecco's minimum essential medium (DMEM) (Dutscher, 67170 Brumath France, L0066) supplemented with 100 µg/mL penicillin/streptomycin (Dutscher, L0018), 10% fetal bovine serum (FBS; Dutscher, S1810), and 0.4 mg/L amphotericin B in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C. Bafilomycin A1 (Sigma-Aldrich, B1793) was used at 500 nM for 2 h, and 3-methyladenine (Sigma-Aldrich, M9281) was used at 2.5 mM for 3 days.

2.5. Stable Cell Lines

To create the MDA-MB-436-shRNA-Control (1 and 2), *-ATG9A* (A, B, and C), and MDA-MB-231-shRNA-Control (I and II)-*ATG9A* (a and b) cell lines, MDA-MB-436 or MDA-MB-231 cells (340,000) were plated onto 6-well plates. The day after plating, cells were transfected using 2 µg of pLKO.1-puro-shRNA-Control vector (Mission non-mammalian shRNA control plasmid, Sigma Aldrich, SHC002), or pLKO.1-puro-shRNA-*ATG9A* vector (Mission shRNA, Sigma Aldrich, SHCLNG-NM_024085.3-3318s21c1) and 4 µL of Jetprime reagent (Polyplus, 114-07), according to the manufacturer's protocol. Two days later, puromycin (5 µg/mL) was added to the cells, and the medium was changed every 2 days for the next 14 days until the detection of puromycin-resistant single clones. Each clone

was then tested for the expression of *ATG9A* mRNA by RT-qPCR, and protein by western Blotting. The stable cell lines, which were then used in this study, were the MDA-MB-436-shRNA-*Control* clones (1 and 2), the MDA-MB-436-shRNA-*ATG9A* clones (A, B and C), the MDA-MB-231-shRNA-*Control* clones (I and II), and the MDA-MB-231-shRNA-*ATG9A* clones (a and b).

To create the MDA-MB-436-CRISPR-*Control* and -*ATG9A* cell lines, MDA-MB-436 cells (340,000) were plated onto 6-well plates. The day after plating, cells were transfected using 2 µg of pSpCas9(BB)-2A-GFP-*Control* vector (Addgene, 48138) or pSpCas9(BB)-2A-GFP-*ATG9A* (sgRNA sequence: TGCCCTCCGTATTGCACG), and 4 µL of Jetprime reagent (Polyplus, 114-07), according to the manufacturer's protocol. One day later, GFP-positive cells were sorted using a Sony cell sorter (SH800S) and plated onto 6-well plates (500 cells/well) until the detection and the characterization of single clones, as described above for the shRNA clones. The stable cell lines which were then used in this study were the MDA-MB-436-CRISPR-*Control* and the MDA-MB-436-CRISPR-*ATG9A*.

2.6. Western Blotting

Cells were scraped and harvested in cold phosphate-buffered saline (PBS; 137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, and 1.8 mM KH₂PO₄), and lysed in SB1X (45 mM Tris-HCl, pH 7.6, 10% Glycerol, 2% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 1.5% 2-mercaptoethanol, and 0.001% bromophenol blue). Protein lysates were sonicated for 10 s (Sonic and Materials, Vibra-Cell) before loading (20 µg), and then separated on a 10 or 12.5% polyacrylamide gel in running buffer (25 mM Tris base, 192 mM Glycine, and 1% SDS) at 20 mA for 80 min. The gel was then transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) 0.2 µm membrane (Bio-Rad, 162-0177) at 200 mA for 2 h in transfer buffer (25 mM Tris base, 192 mM Glycine, and 10% methanol). The membrane was blocked with 5% non-fat milk in Tris-buffered saline supplemented with Tween 20 (TBS-T; 20 mM Tris base, pH 7.6, 137 mM NaCl, and 0.1% Tween 20) for 1 h and incubated with primary antibodies in TBS-T supplemented with 1% non-fat milk, overnight at 4 °C. Following three washes in TBS-T, immunoreactive bands were detected using a secondary goat horseradish peroxidase (HRP)-coupled secondary anti-rabbit antibody and the Clarity Western ECL blotting substrate (Biorad, Marnes-la-Coquette, France, 1705061). The signals were then analyzed and quantified using the ChemiDoc XRS+ system (Biorad), and the Image Lab software (5.1, Biorad).

2.7. RNA Extraction and RT-qPCR

Total RNA were extracted using the Tri Reagent (Molecular Research Center, TR-118) as previously described [20]. Briefly, the cell pellet (300,000 cells) was suspended in 750 µL of Tri Reagent, and 0.2 mL of chloroform was added before centrifugation at 12,000 × *g* for 15 min at 4 °C. Total RNA was then precipitated using 0.5 mL of isopropanol and centrifuged at 10,000 × *g* for 20 min at 4 °C. The RNA pellet was washed with 70% ethanol before solubilization in water (30 µL) and then incubated for 10 min at 65 °C. Total purified RNA was then quantified before conservation at −80 °C.

For RNA extraction from patient samples, 20 mg of breast tissue (tumor or healthy adjacent tissue) was reduced in liquid nitrogen before homogenization in 750 µL of Tri Reagent for 15 min at 30 °C, and centrifugation at 2550 × *g* for 2 min in order to eliminate fat tissue.

For RT-qPCR analysis, 1.5 µg of total RNA was reverse transcribed using the M-MLV Reverse Transcriptase (Sigma, M1302), 1.25 µM of oligo(dT) 23 (Eurogentec), and 1.25 µM of random primers (Promega, Charbonnières-les-Bains, France C1181). Quantitative PCR was run on the Step One Real Time PCR System (Fisher Scientific, Illkirch, France) using the Syber Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, 4309155) and the following parameters: 10 min at 95 °C followed by 40 cycles; 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C. The target gene levels (*ATG9A*, *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *NIX*, and *SQSTM1*) for tissues were normalized to the ratio of expression from two housekeeping genes: *RPLP0* and *18S rRNA*. The target gene levels for cell samples (*ATG9A*) were normalized to the *18S rRNA* gene expression. The primer sequences used for qPCR analysis are described in the Table 2. Each sample was analyzed in duplicate and then differences in the expression of each gene were quantified using

the standard curve method using plasmids containing the cloned target sequences as controls for absolute quantification.

Table 2. Primer sequences used for Syber Green RT-qPCR experiments.

Gene	Forward	Reverse
18S rRNA	5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3'	5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'
ATG9A	5'-TTTGGCTTAGGGTGAAGACC-3'	5'-AGGGCAGCAAAGTATTTCCA-3'
ATG9B	5'-CCTTGGGCAGTTCTTCTTTG-3'	5'-CTTCTGGTGCCTGGTACAT-3'
BECLIN1	5'-TCACCATCCAGGAACACTACA-3'	5'-CCTGGCGAGGAGTTTCAATA-3'
LC3B	5'-CGGAAAGCAGCAGTGTACCA-3'	5'-GGCAGAAGGGAGTGTGTCTGA-3'
NIX	5'-AAGGCAGGCTTCATTTTCA-3'	5'-CCAATAATTTCCACAACGGG-3'
RPLP0	5'-TCGACAATGGCAGCATCTAC-3'	5'-GCCTTGACCTTTTCAGCAAG-3'
SQSTM1	5'-ATCGGAGGATCCGAGTGT-3'	5'-TGCTGTGAGCTGCTCTT-3'

2.8. Cell Proliferation Assays

For the MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide; Sigma-Aldrich, M5655), cells were plated in 96-well plates (3,000 cells per well, 16 wells per cell line) and MTT assays were conducted every day over a 4 day period as previously described [20]. Briefly, 100 μ L of a 0.5 mg/mL MTT solution, diluted in sterile PBS, was added in each well, then incubated for 2 h in 5% CO₂ at 37 °C. Following a 5 min centrifugation at 500 \times g, the MTT solution was discarded, and 50 μ L of Dimethyl sulfoxide (DMSO) was added to each well. Then, the absorbance was measured at 549 nm with a reference wavelength at 620 nm using a microplate reader (Thermo Scientific, Illkirch, France, Multiskan FC).

For the trypan blue exclusion assay, cells were plated in 24-well plates (30,000 cells per well, 2 wells per cell line) and counted every day over a 4 day period. After discarding the culture medium, cells were incubated in 100 μ L Trypsin-EDTA (Dutscher, X-0930) for 5 min at 37 °C before the addition of 200 μ L of complete medium and centrifugation at 500 \times g for 5 min. The cell pellet was then suspended in 50 μ L of trypan blue (0.04% in PBS, Corning, 702630) and the number of viable cells was then determined using a Malassez haemocytometer.

2.9. Cell Migration and Invasion Assays

Cell migration was quantified using a culture-insert 2 well in 35 mm microdishes (81176, Ibidi). In each well, 18,000 cells were plated and the insert was removed 24 h later. The migration rate was then evaluated 24 h later.

Cell invasion was evaluated using modified Boyden chambers (ThinCert for 24 well plates, 8 μ m pore size, Greiner Bio-one, 438122). Boyden chambers were coated with 50 μ g ECM (extra cellular matrix) gel from Engelbreth-Holm-Swarm murine sarcoma (Sigma-Aldrich, E1270) diluted in DMEM for 5 h at 37 °C. A total of 100,000 cells in 250 μ L of serum-free DMEM were seeded into the upper chamber and 500 μ L of complete culture medium was added in the lower compartment. After a 24 h incubation in a 5% CO₂ atmosphere at 37 °C, cells in the upper compartment were removed using a swab, and cells in the lower compartment were fixed for 5 min with absolute ethanol, then stained with crystal violet (0.5% in 2% ethanol) for 10 min. The filters were then washed with distilled water and cell density was quantified using the threshold color plugin of the ImageJ software.

2.10. Immunohistochemistry and Immunostaining Assessment

Immunohistochemical (IHC) analysis was performed using a standard protocol previously detailed [21]. Staining intensities were then quantified using the intensity quantification method (score: 0–3 and extent: 0–3). As previously described [22], the 2 scores were then multiplied to obtain an overall score ranging between 0 and 9. All immune-labeled tissues were evaluated by two experienced histopathologists.

2.11. Statistical Analysis

Statistical analyses were performed using the student t test. Data were expressed as the mean \pm SEM. * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ and *** $P \leq 0.001$.

3. Results

3.1. *ATG9A* Expression Was Increased in Breast Cancers

The different BC subtypes are classified depending on their molecular marker expression. Luminal A and Luminal B, which represent 70% of total BCs [19], are generally associated with a good prognosis and are characterized by ER α expression (ER⁺), whereas the amplification of the *HER2* gene is only observed in the Luminal B subtype. The HER2⁺ BC subtype, which represents 10–15% of overall BCs, presents an amplification of the *HER2* gene without the expression of ER α (ER⁻). TNBCs, which present no expression of ER, PR, or HER2, generally exhibit poor outcomes. Consequently, TNBCs present a significant challenge, and molecular-profiling efforts are under progress in order to determine new promising targets. Since autophagy has been reported to be involved in TNBC chemotherapy efficiency, we decided to analyze the expression of several *ATG* genes, in order to determine whether *ATG* gene expression was deregulated in BC. To this end, we first analyzed *ATG9A*, *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *NIX*, and *SQSTM1* mRNA levels in 37 human BC biopsies and compared their expression with the ones detected in healthy adjacent tissues, using qRT-PCR (Figure 1A). The clinical information regarding the patients whose samples have been used in our study can be found in Table 1. Our initial cohort included 13 Luminal A, 10 Luminal B, 4 HER2⁺, and 10 TN (triple negative) biopsies. Our results revealed no major difference in *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *NIX*, and *SQSTM1* mRNA expression between tumor and healthy adjacent tissues, but we observed an increase in *ATG9A* mRNA expression in Luminal A, Luminal B and TN patients, even if the significance of these differences remained to be confirmed. In order to validate this first set of data, we analyzed *ATG9A* mRNA levels in a larger cohort of 80 patients including 30 Luminal A, 14 Luminal B, 6 HER2⁺, and 30 TN (Figure 1B). The results obtained confirmed a significant increase in *ATG9A* mRNA levels in tumors compared to healthy adjacent tissues ($p = 0.0355$). To date, only seven out of the 80 patients from our cohort presented a cancer recurrence, and amongst them, five presented an increase in *ATG9A* mRNA levels in tumor cells compared to the healthy adjacent tissues (3/5 patients were diagnosed with TN, and 2/5 with Luminal B). However, due to the low number of patients presenting a cancer recurrence, we were not able to correlate the risk of recurrence to the difference of *ATG9A* expression levels between patients presenting a low or a high *ATG9A* mRNA expression. To establish the relevance of a link between *ATG9A* expression levels and clinical outcome in TNBC, we used the online survival analysis tool “KM plotter” [23], which integrates numerous gene expression data and survival information derived from 3,951 patients from databases such as The Cancer Genome Atlas (TCGA). The correlation of *ATG9A* expression levels with relapse-free survival (RFS) in TNBC was determined (Figure 1C), and we observed that high *ATG9A* levels correlated with shorter RFS, suggesting a link between *ATG9A* mRNA expression levels and survival of patients presenting a TNBC subtype.

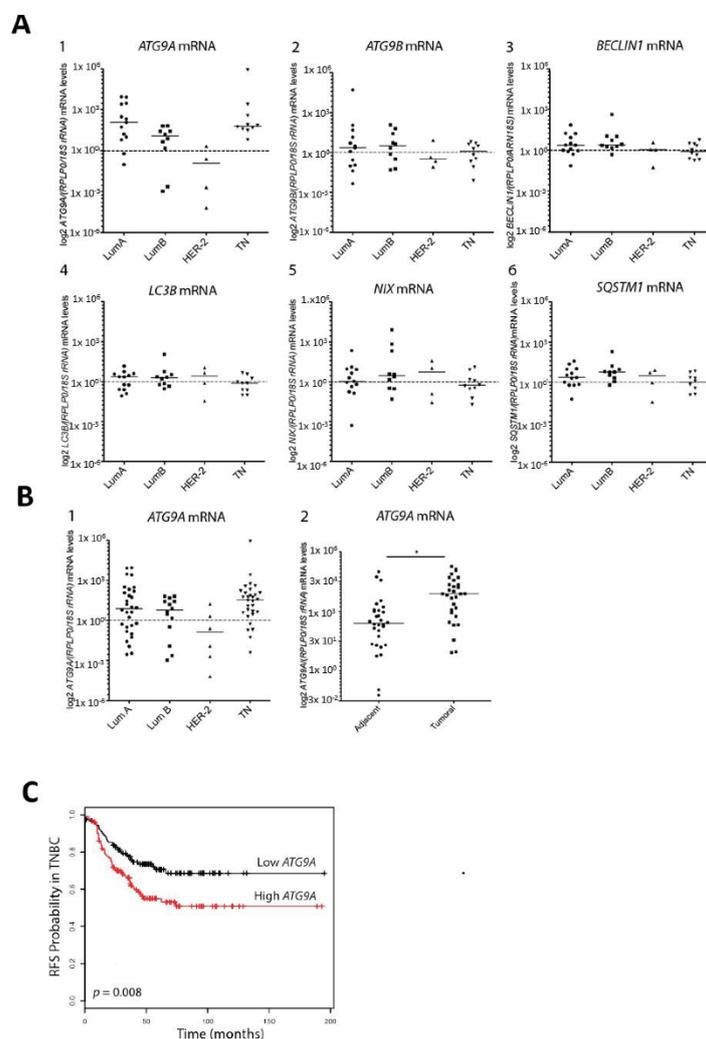


Figure 1. *ATG9A* mRNA overexpression in triple negative breast cancer. **(A)** Quantification of *ATG9A*, *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *NIX*, and *SQSTM1* mRNA levels using RT-qPCR, in Luminal A (LumA), Luminal B (LumB), HER2, and triple negative (TN) breast cancer biopsies compared to matched healthy adjacent tissues ($n = 37$). Values were normalized to the ratio of two housekeeping genes, *rRNA18S* and *RPLP0*. Data presented on scatter plots represent the \log_2 of *ATG9A*, *ATG9B*, *BECLIN1*, *LC3B*, *NIX*, and *SQSTM1* mRNA levels ratio in breast cancer biopsies over healthy adjacent tissues, for each patient. **(B)** The Left panel represents the ratio of *ATG9A* mRNA levels in LumA, LumB, HER2, and TN biopsies compared to matched healthy adjacent tissues (expanded cohort, $n = 80$). Data are expressed in \log_2 of relative *ATG9A* mRNA expression, for each patient, normalized with the ratio of two housekeeping genes: *rRNA18S* and *RPLP0*. The Right panel represents the \log_2 of *ATG9A* mRNA levels in healthy adjacent tissues (left) and TN biopsies (right), normalized to the ratio of two housekeeping genes, *rRNA18S* and *RPLP0*. Difference of expression was quantified using a paired t-test ($* p = 0.0325$). **(C)** Kaplan–Meier curves representing relapse-free survival (RFS) in TN patients expressing high ($n = 125$) or low ($n = 124$) *ATG9A* mRNA levels ($p = 0.008$; source: Kmplot.com).

We next decided to analyze whether the expression of the ATG9A protein was also up-regulated in TNBC. To do so, we analyzed the expression of the ATG9A protein in eight TNBC biopsies and compared its expression in the tumor compared to the healthy adjacent tissue. As expected, the ATG9A staining was significantly higher in 15 out of 21 patients (71%; $p < 0.0001$), four were unchanged, and only two were decreased in the tumor cells compared to the normal adjacent tissue (mean expression of 2.87 and 5.3 in normal and tumoral tissues, respectively; Figure 2). Interestingly, analysis of ATG9A protein expression in five TNBC cell lines showed that this protein was indeed expressed in all cell lines tested (Figure S1). When we compared the ATG9A score with the percentage of tumor cells expressing the proliferative marker KI67, we observed a strong correlation between ATG9 and KI67 ($p < 0.001$, and Pearson r 0.79; Figure 2C,D). Although the increase in ATG9A mRNA levels in LumA tumors compared to healthy adjacent tissues was less important than those observed with the TNBC patients, we also compared the expression of ATG9A protein in LumA and normal adjacent tissues (Figure S2A). We confirmed that ATG9A expression also significantly ($p < 0.05$) increased in LumA, but this was only observed in 10 out of 18 patients (55%). However, this increase was less important ($p < 0.05$) than what we observed in TNBC ($p < 0.001$), suggesting that the highest expression of ATG9A is in TNBC.

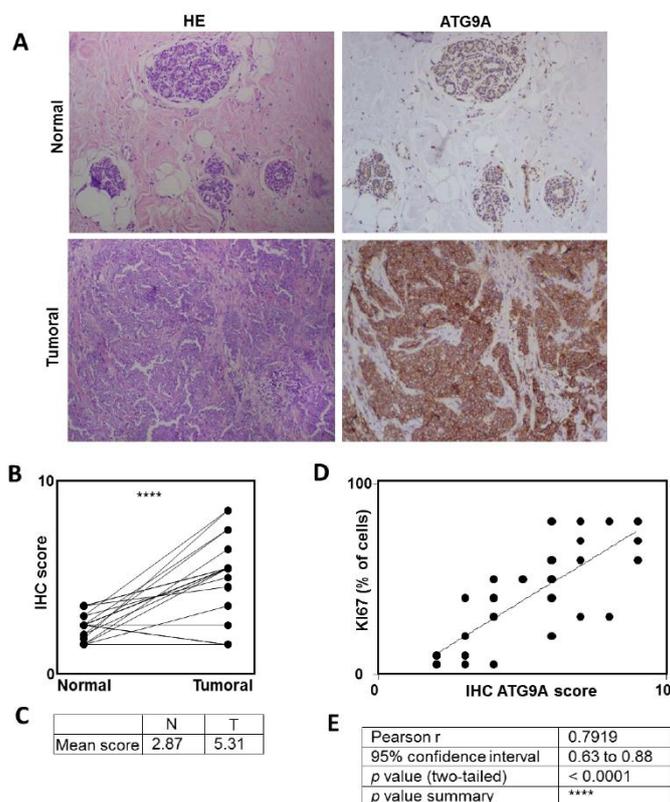


Figure 2. ATG9A protein overexpression in triple negative breast cancer. Quantification of ATG9A protein levels using IHC in triple negative breast cancer (TNBC) biopsies compared to matched healthy adjacent tissues. (A) Representative images of ATG9A protein staining in tumor and healthy tissues (left: HE (hematoxylin & eosin) staining, right: ATG9A staining). (B,C) Quantification of ATG9A staining in 21 patients. (D) Correlation between ATG9A score with KI67 staining in tumors. (E) Quantification.

3.2. Inhibition of *ATG9A* Expression Using *shRNA* Inhibits *In Vitro* Cell Proliferation and Invasion

In order to determine whether the high *ATG9A* mRNA levels quantified in TN tumors were a cause or a consequence of tumor development, we decided to inhibit *ATG9A* expression in the TNBC cell line MDA-MB-436. First, we transfected MDA-MB-436 cells with the pLKO.1-puro-*shRNA-ATG9A* vector (Mission *shRNA*, Sigma Aldrich), which encodes a *shRNA* specifically targeting the *ATG9A* mRNA (target sequence localized in the exon 16). We then selected and analyzed several puromycin-resistant clones (*sh-ATG9A*; clones A, B, and C). These clones exhibited a strong decrease in *ATG9A* mRNA levels (Figure 3A) as well as protein levels (Figure 3B,C), when compared to the control cell lines transfected with a vector coding a scramble *shRNA* (*sh-control*; clones 1 and 2). We then investigated whether a decrease in *ATG9A* expression in the MDA-MB-436 cell line would alter its tumor-linked features such as *in vitro* proliferation and invasion. We first analyzed cell proliferation by performing a MTT assay and a cell viability assay (trypan-blue exclusion test). The MTT results indeed showed that the *sh-ATG9A* cell lines exhibited a strong decrease in proliferation compared to the control cell lines. The trypan-blue exclusion assay confirmed these data since we observed a significant decrease in cell number, but no significant increase in cell death (Figure 3D,E). In order to confirm the pro-tumoral properties of *ATG9A*, we quantified the invasion ability of our clones using Boyden chambers. We indeed observed that the invalidation of *ATG9A* expression strongly decreased cell invasion (Figure 3F). Altogether, these data confirmed that a decrease in *ATG9A* expression led to the inhibition of pro-cancer phenotypes, and were therefore coherent with our *in vivo* data showing a high expression of *ATG9A* in TNBC.

We then decided to inhibit *ATG9A* expression in a second TNBC cell line, MDA-MB-231. Our results showed that we indeed inhibited *ATG9A* mRNA levels as well as protein levels, but we did not observe any change in cell proliferation or migration in the *sh-ATG9A* cells compared to the control cells (Figure S3). This could be explained by the different origin and genomes of these two cell lines or their mutation burden as we also established that this MDA-MB-231 cell line seemed to be less sensitive to changes in autophagy flux (Figure S4). Indeed, this cell line presented lower basal LC3B-II levels than the MDA-MB-436 ones, and these levels remained lower than the ones observed in the MDA-MB-436 cell line after Baf A1 incubation, suggesting a lower autophagy flux in the MDA-MB-231 cell line (Figure S4A,B). Moreover, this cell line was less sensitive to inhibition of autophagy since their proliferation was not altered after incubation with 3-MA, an inhibitor of the early steps of autophagy (Figure S4C,D). We also observed that the proliferation rate of MDA-MB-231 cells was not modified after a knock-down of *ATG9A* together with an incubation of 3-MA, while MDA-MB-436 cell proliferation was decreased in the *sh-ATG9A* cells compared to the controls, but did not further decrease after the addition of 3-MA, suggesting that the autophagy flux had already highly decreased in these cells (Figure S4E,F).

Since a very low residual protein expression was still detected in our MDA-MB-436 *shRNA*-designed cell lines, and that *shRNA* had been described to sometimes produce off-target effects, even if we compared three independent clones. Next, we decided to confirm our results in a genetic model constructed using the CRISPR-Cas9 technology. We therefore transfected MDA-MB-436 cells with the pSpCas9(BB)-2A-GFP vector, which encodes the Cas9-GFP protein as well as a sgRNA (single guide RNA) designed to specifically target the *ATG9A* gene (target sequence localized in the exon 8). Following transfection, the GFP-positive cells were selected and analyzed for *ATG9A* expression. *ATG9A* mRNA was significantly decreased in the CRISPR-*ATG9A* clone compared to the control cells (Figure 4A). Indeed, mRNA with premature non-sense mutations or premature termination codon (PTC), which are frequently observed in genetic diseases or with the CRISPR technology, are generally eliminated by the non-sense mediated mRNA decay pathway (NMD) [24]. We next confirmed the absence of the *ATG9A* protein in the CRISPR-*ATG9A* cells (Figure 4B). To determine whether the genetic invalidation of *ATG9A* expression also led to an inhibition of cancer-associated phenotypes, similar to the ones already observed in the *sh-ATG9A* clones, we quantified the proliferation rate of these cells using a MTT assay (Figure 4C). As expected, CRISPR-*ATG9A* cells presented a lower

proliferation rate than control cells. Moreover, these cells also showed significant invasion capacities compared to control cells (Figure 4D,E).

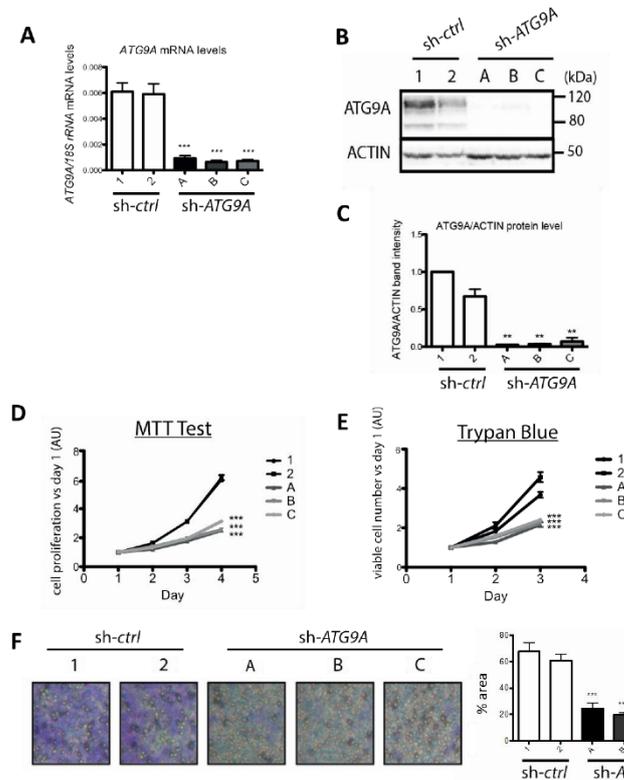


Figure 3. Inhibition of ATG9A expression using shRNA inhibits in vitro cell proliferation and invasion in the TNBC cell line MDA-MB-436. (A) ATG9A mRNA expression levels quantified by RT-qPCR in stable MDA-MB-436 clones expressing a sh-control (1 and 2) or a sh-ATG9A (A, B, and C; $n = 3$, duplicate). Values were normalized using the housekeeping gene *rRNA18S*. Difference in expression was quantified using a t-test: Compared to sh-control 1, $p < 0.0001$ for all sh-ATG9A clones (A, B, and C); compared to sh-control 2, $p = 0.0002$ for sh-ATG9A clone A and $p < 0.0001$ for sh-ATG9A clones B and C. (B) Levels of ATG9A and ACTIN proteins in the sh-control (clones 1 and 2) or sh-ATG9A (clones A, B, and C) clones. A representative image of three independent experiments is shown. (C) Quantification of ATG9A protein levels normalized to ACTIN protein levels, quantified using the ImageLab software ($n = 3$). The difference in expression was determined using a t-test: compared to sh-control 2, $p = 0.0023$; $p = 0.0024$, and $p = 0.0048$ for sh-ATG9A clones A, B, and C, respectively. $** p \leq 0.01$. Proliferation rates of sh-ATG9A and their controls using a MTT (D), or a Trypan-blue exclusion assay (E). The MTT assay was conducted every day over a four-day period ($n = 3$, 16 replicates). The difference in cell proliferation was quantified using a t-test at day 4. $*** p \leq 0.001$ $* p \leq 0.05$. For the trypan blue exclusion assay, viable cells were counted every day over a three-day period ($n = 3$, four replicates). The difference in cell number versus day 1 was quantified using a t-test at day 3 (graphs on the right). (F) The invasion assay was performed using sh-ATG9A (clones A, B, and C) and control clones (1 and 2). A representative image of three independent experiments with duplicates is shown on the left. The graph on the right represents the percentage of cells that migrated through the ECM-coated Boyden chambers after 24 h, quantification was done with the ImageJ software. The difference in cell density was quantified using a t-test. $*** p \leq 0.001$.

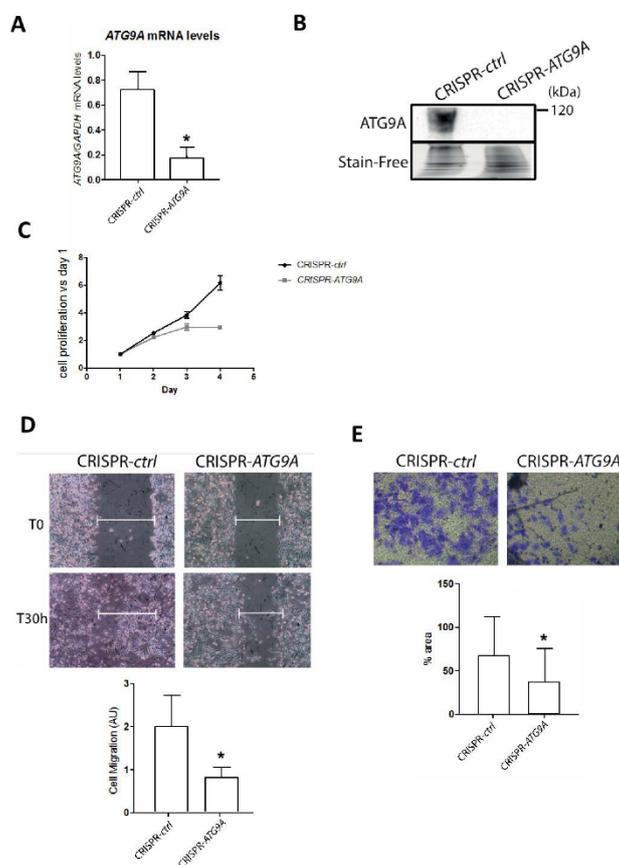


Figure 4. Inhibition of ATG9A expression using CRISPR-Cas9 inhibits *in vitro* cell proliferation, migration, and invasion in the TNBC cell line MDA-MB-436. **(A)** ATG9A mRNA expression levels quantified by RT-qPCR in the CRISPR-control or the CRISPR-ATG9A clones ($n = 3$). Values were normalized using the housekeeping gene *GAPDH*. The difference of expression was quantified using a t-test. $* p \leq 0.05$. **(B)** Level of expression of the ATG9A protein in the CRISPR-control and the CRISPR-ATG9A clones were analyzed by western blotting. A representative image of three independent experiments is shown. **(C)** The proliferation rates of the CRISPR-ATG9A clone and its control were quantified using a MTT assay conducted every day over a 4 day period ($n = 3$, 16 replicates). The difference in cell proliferation was quantified using a t-test at day 4. $p \leq 0.05$. **(D)** The migration ability of the CRISPR-ATG9A and -control clones were analyzed thanks to a wound healing assay. A representative image of three independent experiments is shown. The difference in cell migration was quantified using a t-test. $* p \leq 0.05$. **(E)** The invasion capacity of the CRISPR-ATG9A clone and -control clone was performed in Boyden chambers. A representative image of three independent experiments is shown. The graph represents the percentage of cells which migrated through the ECM-coated Boyden chambers after 24 h, quantification done with the ImageJ software. The difference in cell density was quantified using a t-test. $* p \leq 0.05$.

4. Discussion

Triple negative breast cancer is an aggressive subtype with limited treatment options and very poor prognosis. Finding new biomarkers may be useful for better and earlier diagnosis, but might also

lead to the characterization of novel targets for therapy. Since many studies have shown a link between autophagy and breast cancer (reviewed in [25]), this pathway may represent a new way of treatment, but the role of autophagy in cancer still remains largely unclear. On one hand, it is widely accepted that an inhibition of autophagy may increase the apparition of genetic mutations and therefore favor the apparition of cancer cells. On the other hand, it has also been described that autophagy can enhance cancer cell survival, since autophagy can support cancer cell survival in response to various stresses, such as starvation or hypoxia, or even induce anti-cancer drug resistance [4,26]. Therefore, further studies will be needed to clear out this paradox and determine the potential of autophagy as an anti-cancer target. Indeed, the role of *ATG9A* in autophagy seems dependent on the in vitro model or the type of cancer analyzed, and appears complex in cancers. For example, invalidation of *ATG9A* in MEFs (Mouse Embryonic Fibroblasts) provoked a significant decrease in LC3B-II accumulation in profit of LC3B-I [10]. In contrast, knockdown of *ATG9A* in pancreatic cancer cells induced an accumulation of the LC3B-II form [27]. Similar observations to the latter case were observed in our invalidation model of *ATG9A* in MDA-MB-436 cells, since we observed LC3B-II accumulation and therefore autophagy induction or inhibition of autophagosome degradation (Figure S5). Nevertheless, clinical trials are already underway to test the effect of inhibitors (hydroxychloroquine) or inducers of autophagy (Everolimus), alone or in combination with various chemotherapies (see the Clinicaltrials.gov website for more information; reviewed in [28]).

The first question to ask when willing to target the autophagy pathway, is whether autophagy is increased or inhibited in tumors compared to controls, but to get the right assessment, researchers are still looking for reliable autophagy biomarkers or new targets. For example, an increase in LC3B protein staining within tumor cells, which can be directly associated to an elevated number of overall autophagosomes within the cells, can be the consequence of increased autophagy flux or decreased degradation of autophagosomes by lysosomes. This is why our study aims at analyze the expression levels of different autophagy genes in a cohort of breast cancers. Our data showed, for the first time, that one autophagy gene, *ATG9A*, presented a significant increase in triple negative breast cancer patients compared to healthy adjacent tissues and correlated with the expression of the proliferative marker KI67. Moreover, using available bioinformatics databases, such as the survival database “KM plotter”, we observed that high *ATG9A* levels correlated with a significantly shorter relapse-free survival (RFS). We then developed in vitro *ATG9A* invalidation models in the TNBC cell line MDA-MB-436 and showed that a decrease in *ATG9A* expression led to an inhibition of cancer phenotypes within these cells. These in vitro data confirmed that *ATG9A* was necessary for the aggressive character of this cell line and that a high expression of this gene might be considered as a biomarker of TNBC even if *ATG9A* was also expressed at a lower level in LumA cancers. Nevertheless, it would be interesting to analyze a greater number of TNBC cases and follow *ATG9A* expression before, during, and after treatment to determine whether this gene could also become a marker of treatment efficiency or outcome.

These data are partly contradictory with the ones published recently, which showed that *ATG9A* mRNA expression was significantly decreased in invasive ductal carcinomas compared to matched healthy tissues [18]. However, when the authors analyzed *ATG9A* mRNA levels and correlated them with clinicopathological characteristics (ER, PR, or HER2 status), they only demonstrated a significantly lower *ATG9A* expression in the HER2⁺ subtype of breast cancers. Our results were therefore consistent with these conclusions since we also observed, in our cohort, a decrease in *ATG9A* mRNA expression in HER2⁺ patients, even if this decrease was not significant, mainly due to the low number of samples of this subgroup in our cohort ($n = 6$). Moreover, it is noteworthy that autophagy genes or protein levels can vary according to the cancer grade or even the cancer subtype analyzed. For example, we previously reported that the levels of *GABARAPL1*, a member of the ATG8 family necessary for autophagosome elongation and closure, decreased in numerous cancer cell lines and that a high expression of this gene, in a cohort of 256 samples, correlated with good prognosis in patients with breast cancers [29,30]. Nevertheless, another laboratory showed that *GABARAPL1* was up-regulated in TNBC cell lines and tissue, and that a high expression in this gene was associated with shorter

overall survival [31], suggesting that the analysis of mRNA expression using BC molecular subtypes could lead to significantly different conclusions, compared to a non-classified report, thus proving the heterogeneity of BC. Here, we show that similarly to *GABARAPL1* [30], *ATG9A* was up-regulated in TNBC and its inhibition decreased cancer phenotypes and abilities. Altogether, these data suggest that the expression of some ATGs may vary according to the type of cancer and the subtype analyzed, and that the decision to target the autophagy pathway as a therapy might be restricted to some type of cancer or even to a small number of patients, confirming the importance of establishing strong and reliable autophagy biomarkers.

Regarding *ATG9A*, the conclusions on its expression and function in cancer can also vary according to the study. For example, it has been recently shown that *TMEM74* (Transmembrane 74) is able to induce autophagy and favor cancer cell survival via its interaction with *ATG9A* and *ATG16L1* [32], and that a high expression of *TMEM74* is linked to a decrease of patient survival in different cancers, suggesting that *ATG9A* together with *TMEM74* would be a factor of poor prognosis. Another study showed that *miR-29a*, which targets the *ATG9A* and *TFEB* mRNAs, is down-regulated in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) leading to increased *ATG9A* levels, autophagy flux and resistance to gemcitabine, as well as increased cancer cell migration. A third study described that *ATG9A* was induced in response to hypoxia in glioblastoma (GBM) and that *ATG9A* depletion led to decreased in vitro proliferation as well as delayed in vivo tumor growth [33]. These data are therefore in agreement with ours, describing a pro-tumor role of *ATG9A* in cancers. In contrast, it has been recently suggested that the long non-coding RNA (lncRNA) *HAGLROS* was induced in gastric cancers and that its down-regulation led to decreased migration and invasion of gastric cancer cells, but also to increased *ATG9A/B* levels [34], suggesting an anti-tumor role of *ATG9A*.

Taken together, our results highlight, for the first time, the clinical relevance of *ATG9A* as a therapeutic target in triple negative breast cancer patients. However, future work will be necessary to characterize the molecular mechanisms leading to cancer-related phenotypes associated to *ATG9A*. Amongst the cancer-related phenotypes, stemness is determined by the capacities of cells to proliferate in serum free conditions. Indeed, cancer stem cells (CSCs) are supposed to play a key role in cancer relapse due to their high resistance to treatments and their high survival rate in low nutrient microenvironment. Tumorsphere assays have already been used in order to determine the role of autophagy in CSC proliferation or survival, but as seen above for other cancer-related phenotypes, contradictory effects have been reported depending of the cancer studied. For example, a combination of radiotherapy with chloroquine in U87 cells (glioma-derived cells), to inhibit radiation-induced autophagy, significantly decreased tumorsphere formation, suggesting a positive role of autophagy on tumorsphere survival [35]. In contrast, the JAK2 (Janus Kinase) inhibitor SAR317461, which induces autophagy, led to a decrease of tumorsphere numbers suggesting an inhibitory role in autophagy [36]. Therefore, it is clear that further studies would be needed to determine whether *ATG9A* could modify the ratio of stem cells vs. cancer cells in TNBC.

We have previously demonstrated that another autophagy gene, *GABARAPL1*, presents anti-tumor effects but we also recently described that the expression of a G116A mutant of *GABARAPL1*, which cannot be conjugated onto autophagosomes and therefore to participate in autophagosome elongation and maturation, was still able to decrease tumor growth in vivo [20], suggesting that the anti-tumor properties of *GABARAPL1* may not only be linked to its role in autophagy. Therefore, it would be of great interest to determine whether the role of *ATG9A* in TNBC is also linked to its role in autophagy.

Supplementary Materials: The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/7/12/248/s1>, Figure S1: *ATG9A* protein expression quantified in five different TNBC cell lines; Figure S2: *ATG9A* protein expression using IHC; Figure S3: *ATG9A* extinction in the MDA-MB-231 cell line does not lead to changes in cancer-linked phenotypes; Figure S4: The MDA-MB-231 cell line is less sensitive to autophagy inhibition than MDA-MB-436 cells; Figure S5: *ATG9A* extinction led to an increase in LC3B-II levels in the MDA-MB-436 cell line.

Author Contributions: Conceptualization: E.H. and M.B.-G.; investigation: A.C.-T., E.H., L.F., T.G., L.M., J.-R.P., V.P., M.V. and M.H.; resources: C.B., F.M. and M.-P.A.; validation and original draft writing: A.C.-T., E.H. and M.B.G.; review and editing: R.D.-M., P.A. and P.P.

Funding: Aurore Claude-Taupin was supported by a fellowship from the “Région de Franche-Comté”. This work was supported by funding from institutional grants from INSERM, EFS, and Univ. Bourgogne Franche-Comté and by the “Ligue Contre le Cancer” (001AC.2015) and the “Région Bourgogne Franche-Comté” (2014C-15449).

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

Abbreviations

ATG	autophagy-related
BC	breast cancer
CSCs	cancer stem cells
DMEM	dulbecco’s minimum essential medium
EBSS	earle’s balanced salt solution
ECM	extra cellular matrix
ER	estrogen receptor
FBS	fetal bovine serum
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
HRP	horseradish peroxidase
IHC	immunohistochemistry
LC3B	microtubule-associated protein 1 light chain 3B
mTORC1	mammalian target of rapamycin complex 1
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
PBS	phosphate buffer saline
PBS-T	PBS triton-X-100
pN	lymph node status
PR	Progesterone Receptor
pT	tumor size
PVDF	polyvinylidene difluoride
RT-qPCR	reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
SDS	sodium dodecylsulfate
sgRNA	single guide RNA
SISH	silver in situ hybridization
TN	triple negative
TNBC	triple negative breast cancer

References

1. Siegel, R.L.; Miller, K.D.; Jemal, A. Cancer statistics, 2018. *CA Cancer J. Clin.* **2018**, *68*, 7–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Berry, D.A.; Cronin, K.A.; Plevritis, S.K.; Fryback, D.G.; Clarke, L.; Zelen, M.; Mandelblatt, J.S.; Yakovlev, A.Y.; Habbema, J.D.; Feuer, E.J. Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **2005**, *353*, 1784–1792. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Yadav, B.S.; Sharma, S.C.; Chanana, P.; Jhamb, S. Systemic treatment strategies for triple-negative breast cancer. *World J. Clin. Oncol.* **2014**, *5*, 125–133. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Lefort, S.; Joffre, C.; Kieffer, Y.; Givel, A.M.; Bourachot, B.; Zago, G.; Bieche, I.; Dubois, T.; Meseure, D.; Vincent-Salomon, A.; et al. Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers. *Autophagy* **2014**, *10*, 2122–2142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Chittaranjan, S.; Bortnik, S.; Dragowska, W.H.; Xu, J.; Abeysundara, N.; Leung, A.; Go, N.E.; DeVorkin, L.; Wepler, S.A.; Gelmon, K.; et al. Autophagy inhibition augments the anticancer effects of epirubicin treatment in anthracycline-sensitive and -resistant triple-negative breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **2014**, *20*, 3159–3173. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Wen, J.; Yeo, S.; Wang, C.; Chen, S.; Sun, S.; Haas, M.A.; Tu, W.; Jin, F.; Guan, J.L. Autophagy inhibition re-sensitizes pulse stimulation-selected paclitaxel-resistant triple negative breast cancer cells to chemotherapy-induced apoptosis. *Breast Cancer Res. Treat.* **2015**, *149*, 619–629. [[CrossRef](#)]
7. Lamb, C.A.; Yoshimori, T.; Tooze, S.A. The autophagosome: Origins unknown, biogenesis complex. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2013**, *14*, 759–774. [[CrossRef](#)]

8. Yamada, T.; Carson, A.R.; Caniggia, I.; Umebayashi, K.; Yoshimori, T.; Nakabayashi, K.; Scherer, S.W. Endothelial nitric-oxide synthase antisense (NOS3AS) gene encodes an autophagy-related protein (APG9-like2) highly expressed in trophoblast. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 18283–18290. [[CrossRef](#)]
9. Young, A.R.; Chan, E.Y.; Hu, X.W.; Kochl, R.; Crawshaw, S.G.; High, S.; Hailey, D.W.; Lippincott-Schwartz, J.; Tooze, S.A. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J. Cell Sci.* **2006**, *119*, 3888–3900. [[CrossRef](#)]
10. Orsi, A.; Razi, M.; Dooley, H.C.; Robinson, D.; Weston, A.E.; Collinson, L.M.; Tooze, S.A. Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol. Biol. Cell* **2012**, *23*, 1860–1873. [[CrossRef](#)]
11. Webber, J.L.; Tooze, S.A. Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO J.* **2010**, *29*, 27–40. [[CrossRef](#)]
12. Longatti, A.; Lamb, C.A.; Razi, M.; Yoshimura, S.; Barr, F.A.; Tooze, S.A. TBC1D14 regulates autophagosome formation via Rab11- and ULK1-positive recycling endosomes. *J. Cell Biol.* **2012**, *197*, 659–675. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
13. Puri, C.; Renna, M.; Bento, C.F.; Moreau, K.; Rubinsztein, D.C. ATG16L1 meets ATG9 in recycling endosomes: Additional roles for the plasma membrane and endocytosis in autophagosome biogenesis. *Autophagy* **2014**, *10*, 182–184. [[CrossRef](#)]
14. Imai, K.; Hao, F.; Fujita, N.; Tsuji, Y.; Oe, Y.; Araki, Y.; Hamasaki, M.; Noda, T.; Yoshimori, T. Atg9A trafficking through the recycling endosomes is required for autophagosome formation. *J. Cell Sci.* **2016**, *129*, 3781–3791. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Popovic, D.; Dikic, I. TBC1D5 and the AP2 complex regulate ATG9 trafficking and initiation of autophagy. *EMBO Rep.* **2014**, *15*, 392–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
16. Tang, J.Y.; Hsi, E.; Huang, Y.C.; Hsu, N.C.; Chen, Y.K.; Chu, P.Y.; Chai, C.Y. ATG9A overexpression is associated with disease recurrence and poor survival in patients with oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* **2013**, *463*, 737–742. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Nunes, J.; Zhang, H.; Angelopoulos, N.; Chhetri, J.; Osipo, C.; Grothey, A.; Stebbing, J.; Giamas, G. ATG9A loss confers resistance to trastuzumab via c-Cbl mediated Her2 degradation. *Oncotarget* **2016**, *7*, 27599–27612. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Zhang, X.; Li, C.; Wang, D.; Chen, Q.; Li, C.L.; Li, H.J. Aberrant methylation of ATG2B, ATG4D, ATG9A and ATG9B CpG island promoter is associated with decreased mRNA expression in sporadic breast carcinoma. *Gene* **2016**, *590*, 285–292. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
19. Elston, C.W.; Ellis, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: Experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* **1991**, *19*, 403–410. [[CrossRef](#)]
20. Poillet-Perez, L.; Jacquet, M.; Hervouet, E.; Gauthier, T.; Fraichard, A.; Borg, C.; Pallandre, J.R.; Gonzalez, B.J.; Ramdani, Y.; Boyer-Guittaut, M.; et al. GABARAPL1 tumor suppressive function is independent of its conjugation to autophagosomes in MCF-7 breast cancer cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 55998–56020. [[CrossRef](#)]
21. Herfs, M.; Longuespee, R.; Quick, C.M.; Roncarati, P.; Suarez-Carmona, M.; Hubert, P.; Lebeau, A.; Bruyere, D.; Mazzucchelli, G.; Smargiasso, N.; et al. Proteomic signatures reveal a dualistic and clinically relevant classification of anal canal carcinoma. *J. Pathol.* **2017**, *241*, 522–533. [[CrossRef](#)]
22. Hubert, P.; Herman, L.; Roncarati, P.; Maillard, C.; Renoux, V.; Demoulin, S.; Epicum, C.; Foidart, J.M.; Boniver, J.; Noel, A.; et al. Altered alpha-defensin 5 expression in cervical squamocolumnar junction: Implication in the formation of a viral/tumour-permissive microenvironment. *J. Pathol.* **2014**, *234*, 464–477. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Lanczky, A.; Nagy, A.; Bottai, G.; Munkacsy, G.; Szabo, A.; Santarpia, L.; Gyorfy, B. miRpower: A web-tool to validate survival-associated miRNAs utilizing expression data from 2178 breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* **2016**, *160*, 439–446. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Popp, M.W.; Maquat, L.E. Leveraging Rules of Nonsense-Mediated mRNA Decay for Genome Engineering and Personalized Medicine. *Cell* **2016**, *165*, 1319–1322. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Han, Y.; Fan, S.; Qin, T.; Yang, J.; Sun, Y.; Lu, Y.; Mao, J.; Li, L. Role of autophagy in breast cancer and breast cancer stem cells (Review). *Int. J. Oncol.* **2018**, *52*, 1057–1070. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Liang, C.; Feng, P.; Ku, B.; Dotan, I.; Canaani, D.; Oh, B.H.; Jung, J.U. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell Biol.* **2006**, *8*, 688–699. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

27. Kwon, J.J.; Willy, J.A.; Quirin, K.A.; Wek, R.C.; Korc, M.; Yin, X.M.; Kota, J. Novel role of miR-29a in pancreatic cancer autophagy and its therapeutic potential. *Oncotarget* **2016**, *7*, 71635–71650. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Onorati, A.V.; Dyczynski, M.; Ojha, R.; Amaravadi, R.K. Targeting autophagy in cancer. *Cancer* **2018**, *124*, 3307–3318. [[CrossRef](#)]
29. Berthier, A.; Seguin, S.; Sasco, A.J.; Bobin, J.Y.; De Laroche, G.; Datchary, J.; Saez, S.; Rodriguez-Lafrasse, C.; Tolle, F.; Fraichard, A.; et al. High expression of gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br. J. Cancer* **2010**, *102*, 1024–1031. [[CrossRef](#)]
30. Nemos, C.; Mansuy, V.; Vernier-Magnin, S.; Fraichard, A.; Jouvenot, M.; Delage-Mourroux, R. Expression of gec1/GABARAPL1 versus GABARAP mRNAs in human: Predominance of gec1/GABARAPL1 in the central nervous system. *Brain Res. Mol. Brain Res.* **2003**, *119*, 216–219. [[CrossRef](#)]
31. Ran, L.; Hong, T.; Xiao, X.; Xie, L.; Zhou, J.; Wen, G. GABARAPL1 acts as a potential marker and promotes tumor proliferation and metastasis in triple negative breast cancer. *Oncotarget* **2017**, *8*, 74519–74526. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Sun, Y.; Chen, Y.; Zhang, J.; Cao, L.; He, M.; Liu, X.; Zhao, N.; Yin, A.; Huang, H.; Wang, L. TMEM74 promotes tumor cell survival by inducing autophagy via interactions with ATG16L1 and ATG9A. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e3031. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Abdul Rahim, S.A.; Dirkse, A.; Oudin, A.; Schuster, A.; Bohler, J.; Barthelemy, V.; Muller, A.; Vallar, L.; Janji, B.; Golebiewska, A.; et al. Regulation of hypoxia-induced autophagy in glioblastoma involves ATG9A. *Br. J. Cancer* **2017**, *117*, 813–825. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Chen, J.F.; Wu, P.; Xia, R.; Yang, J.; Huo, X.Y.; Gu, D.Y.; Tang, C.J.; De, W.; Yang, F. STAT3-induced lncRNA HAGLROS overexpression contributes to the malignant progression of gastric cancer cells via mTOR signal-mediated inhibition of autophagy. *Mol. Cancer* **2018**, *17*, 6. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Ye, H.; Chen, M.; Cao, F.; Huang, H.; Zhan, R.; Zheng, X. Chloroquine, an autophagy inhibitor, potentiates the radiosensitivity of glioma initiating cells by inhibiting autophagy and activating apoptosis. *BMC Neurol.* **2016**, *16*, 178. [[CrossRef](#)]
36. Mukthavaram, R.; Ouyang, X.; Saklecha, R.; Jiang, P.; Nomura, N.; Pingle, S.C.; Guo, F.; Makale, M.; Kesari, S. Effect of the JAK2/STAT3 inhibitor SAR317461 on human glioblastoma tumorspheres. *J. Transl. Med.* **2015**, *13*, 269. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



© 2018 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Discussion Générale

Les différentes expériences de cette thèse ont permis de construire un certain nombre d'outils biologiques (vecteurs et lignées cellulaires) qui pourront être utilisés pour des études de vaccinations précliniques chez la souris. L'établissement de lignées de cellules B16-F10 exprimant les différentes formes de l'antigène OVA s'est avéré être une mauvaise stratégie dans l'objectif d'utiliser ces cellules comme cellules présentatrices d'antigènes pour activer des lymphocytes T CD4⁺. Même si l'activation des cellules T CD8⁺ s'est révélée positive avec les cellules B16-F10 surexprimant les différents antigènes OVA, celle des cellules T CD4⁺, certainement plus exigeante, n'a pas été possible. Ce constat nous a imposé de modifier nos modèles cellulaires de présentation et la difficulté de trouver une lignée de cellules dendritiques nous a conduits à avoir recours aux cultures primaires. Toutefois, les lignées de cellules de mélanome exprimant l'antigène pourront tout de même être utilisées dans ces études précliniques et trouveront leur intérêt. L'amplification et la différenciation des cellules dendritiques mises en culture primaire, nous a effectivement permis d'atteindre notre objectif initial. En effet, la co-culture des cellules dendritiques surexprimant les antigènes OVA-Myc-ATG8 avec les LT CD8⁺ OT-I et CD4⁺ OT-II naïfs a pu activer la prolifération des deux sous-populations de lymphocytes (**Publication I**). Ces expériences nous ont ainsi permis de montrer que les protéines GABARAP, GABARAPL1 pouvait être également utilisées comme LC3B pour envoyer artificiellement un antigène dans la voie autophagique et favoriser une présentation par les molécules du CMH-II. Ces résultats ont été confirmés en inhibant les phases précoces de l'autophagie par le 3-MA. Même si les résultats préliminaires de l'inhibition de l'autophagie par interférence ARN (si *Atg5*) vont dans le même sens, ils devront être confirmés (**Publication I**).

Ce travail démarré *in vitro* devra être poursuivi *in vivo* chez des souris afin de vérifier que les effets *in vitro* peuvent être également obtenus *in vivo*. Dans un premier temps, nous vérifierons que l'injection de ces DC dans des souris C57BL/6N peut immuniser les souris contre l'antigène *in vivo*. Ainsi, à l'issue de l'injection des DC exprimant les différentes formes d'OVA, les splénocytes seront prélevés et incubés *ex vivo* avec les peptides OVA restreints aux molécules du CMH-I et II afin de mettre en évidence la présence des cellules T CD4⁺ ou CD8⁺ spécifiques qui seront quantifiées, par la sécrétion de cytokines comme l'IFN- γ , en ELISpot. Pour vérifier l'efficacité de la réponse primaire à l'antigène OVA-ATG8 présenté par les cellules dendritiques, les cellules de mélanome exprimant l'antigène OVA seront administrées aux souris et la croissance tumorale sera suivie et comparée aux souris n'ayant pas été immunisées ou immunisées avec des DC sauvages. De plus, le potentiel de cette vaccination à induire une réponse immunitaire thérapeutique pourra aussi être étudié. Dans ce cas, les cellules B16-OVA seront préalablement injectées aux souris pour induire une tumeur, puis les souris seront ensuite vaccinées par les DC surexprimant l'antigène OVA ou OVA-Myc-ATG8 et la différence de croissance tumorale sera également mesurée. Enfin, les DC pourront être également

administrées à des souris ayant déjà développé une tumeur (B16-OVA) et nous pourrions suivre une éventuelle régression de la tumeur afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de nos cellules. Après le contact initial impliquant les cellules dendritiques, nous pourrions également vérifier la production d'une réponse mémoire en réinjectant à nouveau dans les semaines suivantes les cellules B16-OVA présentant l'antigène.

Par ailleurs, les cellules B16-OVA-ATG8 pourront être utilisées pour la fabrication de DRibbles qui, incubées avec les DC seront utilisées en vaccination thérapeutique. En effet, les DRibbles libérés par les cellules B16-F10 surexprimant les antigènes OVA-ATG8 pourraient contenir plus d'antigènes OVA et donc faciliter l'immunisation antitumorale des souris. Ultérieurement, si notre travail apportait des résultats prometteurs, il serait nécessaire de passer sur un modèle physiologique d'antigènes de tumeur naturellement exprimés par des cellules tumorales.

La surexpression de l'antigène OVA comme des antigènes OVA-Myc-ATG8 ou 242OVA-Myc-ATG8 dans les cellules dendritiques différenciées *in vitro* a permis l'activation de la prolifération des LT CD8⁺ (OT-I) lorsque ces cellules sont transfectées transitoirement par la méthode JetPEI-macrophage ou par électroporation à J9 et J6 (**Résultats complémentaires**). L'inhibition de l'autophagie par le 3-Méthyladénine dans les cellules dendritiques (cellules dendritiques électroporées à J9 uniquement) surexprimant les antigènes OVA-Myc-GABARAP et OVA-Myc-GABARAPL1 a entraîné une moins forte prolifération des LT CD8⁺ OT-I mis en co-culture avec ces cellules que lorsque les cellules dendritiques exprimaient OVA-Myc-LC3B. (**Résultats complémentaires**). Cette expérience ayant été réalisée plusieurs fois avec les mêmes résultats, suggère que l'apprêtement des antigènes OVA-Myc-GABARAP/OVA-Myc-GABARAPL1 est en partie différent de celui des antigènes OVA/OVA-Myc-LC3B dans les cellules dendritiques matures à J9 et électroporées. Une petite partie de la dégradation et de l'apprêtement des antigènes OVA-Myc-GABARAP/OVA-Myc-GABARAPL1 pourrait avoir lieu par la voie non classique vacuolaire de présentation par le CMH-I. Ces résultats obtenus avec le 3-MA devront être confirmés en utilisant des siRNA *Atg5* qui inhibe plus spécifiquement la voie autophagique que le 3-MA. Afin de déterminer plus précisément par quelle voie a lieu l'apprêtement des antigènes OVA-Myc-GABARAP/OVA-Myc-GABARAPL1, il faudrait aussi inhiber l'activité des transporteur TAP1/2 pour déterminer si le mécanisme d'apprêtement est dépendant ou indépendant de ces transporteurs. Nous pourrions également utiliser d'autres inhibiteurs de la voie autophagique (chloroquine ou NH₄Cl par exemple), pour déterminer si les antigènes OVA-Myc-GABARAP/OVA-Myc-GABARAPL1 sont dégradés par la voie lysosomale comme le traitement par le 3-MA pourrait le laisser penser. L'inhibition de la dégradation par le protéasome dans les cellules dendritiques en utilisant le bortézomib montre que l'ensemble

des antigènes OVA est dégradé par le protéasome et qu'il s'agit de la voie majoritaire permettant la présentation du peptide OVA par les protéines du CMH-I (**Résultats complémentaires**).

Pour obtenir les réponses T recherchées, deux méthodes de transfection ont été utilisées, l'une reposant sur l'internalisation de l'ADN par endocytose impliquant le récepteur au mannose, l'autre par la création de pores transitoires dans la membrane plasmique sous l'influence d'un champ électrique. Les 2 protocoles de différenciation et de transfection ont fonctionné. L'un, l'électroporation, offrait une expression supérieure du transgène (avec peut-être une mortalité supérieure qu'il faudrait évaluer) mais tout de même insuffisante pour une présentation efficace, l'autre, le JetPEI-Macrophages, a permis la présentation et la stimulation des LT CD4⁺ (OT-II) mais uniquement lorsque les cellules dendritiques étaient au préalable, irradiées. L'irradiation n'a pas été appliquée sur les DC transfectées par électroporation. Peut-être cette étape est-elle également nécessaire pour ces cellules. Il est toutefois impératif de comprendre ce que l'irradiation induit comme conséquences sur la présentation des antigènes au système immunitaire.

1.1. Cellules dendritiques et irradiation

L'activation de la prolifération des LT CD4⁺ OT-II n'a pu être obtenue que lorsque les cellules dendritiques surexprimant les antigènes OVA-Myc-ATG8 (JetPEI-Macrophage) ont été irradiées avant la co-culture. Cette irradiation pourrait jouer sur l'autophagie ou sur la maturation des cellules dendritiques (**Résultats complémentaires**). Dans une étude de 2001 similaire à la nôtre (Diebold *et al*, 2001), les auteurs ont montré dans les cellules dendritiques que la surexpression de l'antigène de fusion OVA associé au récepteur de la transferrine ou à la chaîne invariante pouvait augmenter sa présentation par les protéines du CMH-II. Ces résultats ont été obtenus grâce à des cellules dendritiques surexprimant les antigènes par transduction et irradiées avant la co-culture (Diebold *et al*, 2001). Plusieurs études utilisent également des cellules dendritiques irradiées pour les expériences de co-culture avec les LT sans regarder l'effet sur la capacité des DC à stimuler les LT. Une étude de Huang et collaborateurs, s'est intéressée aux effets *in vitro* de l'irradiation des DC sur leur phénotype et leur fonction (Huang *et al*, 2011). Ils ont ainsi pu mettre en évidence que l'irradiation augmentait le pourcentage de cellules dendritiques qui coexprimaient les marqueurs de surface CD40 et CD70 de façon dose dépendante (Huang *et al*, 2011). Cependant, l'expression des protéines de costimulation CD80 et CD86 n'était pas augmentée, ni celle du marqueur de maturation CD83 sur ces cellules dendritiques (Huang *et al*, 2011). Ils ont aussi constaté que la maturation des DC par l'ajout de différents facteurs (CD40 ligand, LPS, CpG...) n'augmentait pas l'expression de CD70 comme le faisait l'irradiation des DC matures. De plus, l'expression de CD70 liée à l'irradiation des DC est

corrélée à une plus forte prolifération des LT (CD3⁺) spécifiques de MART-1₂₆₋₃₅ lorsqu'ils sont incubées avec des DC préalablement chargées avec ce même peptide. Ces résultats suggèrent que l'augmentation de l'expression de CD70 sur les cellules dendritiques par l'irradiation pourrait augmenter la capacité des cellules dendritiques à activer des LT (Huang *et al*, 2011). CD70 est un ligand de CD27 exprimé à la surface des LT. L'activation de l'axe de costimulation CD70-CD27 promeut l'activation des LT CD4⁺ et CD8⁺, ainsi que leur expansion clonale (van de Ven & Borst, 2015). Huang et collaborateurs ont également montré que l'irradiation des DC induit une augmentation de la production d'IL-12 et IL-23 suggérant que l'irradiation peut également jouer sur la production de cytokines qui peuvent participer à l'augmentation de l'activation des LT (Huang *et al*, 2011).

Il serait donc intéressant de regarder si l'irradiation des DC, modifie leur maturation, l'expression de leur marqueur CD70 ou leur production de cytokines (IL-12, IFN- γ , IL-10 par exemple). Une modification de l'un de ces paramètres pourrait expliquer l'augmentation de la prolifération des LT-CD4⁺ OT-II que nous observons dans notre modèle.

L'irradiation pourrait également jouer un rôle dans l'induction de l'autophagie. En effet, Zeng et ses collaborateurs (Zeng *et al*, 2019) ont rapporté que la radiothérapie pouvait induire l'autophagie dans des lignées cellulaires *in vitro*. Dans cette étude, les cellules A549 et H1975 ont été transfectées par le plasmide d'expression mCherry-GFP-LC3B et irradiées avec différentes doses de rayonnement. Le flux autophagique a été surveillé en utilisant la microscopie à fluorescence pour détecter le nombre d'autophagosomes et d'autolysosomes. Cette expérience a été complétée par l'étude des niveaux de LC3B-II et de la dégradation de p62 par western blotting. L'ensemble des résultats a confirmé que la radiothérapie induisait en effet un flux autophagique dans ces cellules (Zeng *et al*, 2019). De plus, les auteurs ont observé que ces rayonnements ionisants augmentaient l'expression des molécules du CMH-I dans les cellules tumorales A549 et H1975. La plus forte expression des molécules du CMH-I est observée lorsqu'une dose unique de 20 Gy est appliquée sur les cellules. A cette dose, l'autophagie est induite. D'un autre côté, il a été montré que l'inhibition de l'autophagie par la chloroquine inversait l'expression des molécules de CMH-I dans les cellules tumorales A549 et H1975 (Zeng *et al*, 2019). Nous pouvons donc penser que l'irradiation des cellules dendritiques pourrait jouer sur l'autophagie dans ces cellules et sur la présentation par les molécules du CMH. Il serait donc intéressant de vérifier si l'irradiation induit également l'autophagie dans notre modèle de cellules dendritiques.

1.2. Immunothérapie basée sur les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules présentatrices d'antigènes professionnelles qui peuvent présenter des antigènes dérivés de tumeurs sur les molécules de CMH-I/CMH-II et activer la réponse des LT cytotoxiques mais également des LT helper. Elles peuvent ainsi initier et maintenir une réponse immunitaire. Les cellules dendritiques peuvent également activer les cellules NK (Osada *et al*, 2006) et les NKT (natural killer T) (Keller *et al*, 2017) qui peuvent aider à la réponse antitumorale.

Les propriétés des cellules dendritiques ont orienté la recherche en immunothérapie des cancers, dans le développement de vaccins à base de cellules dendritiques chargées avec des antigènes de tumeurs pour induire une réponse antitumorale (Kalinski *et al*, 2013). En effet, les cellules dendritiques ont le potentiel d'entraîner une forte activation des LT chez les patients et ont la capacité d'entraîner une réponse T antitumorale durable dans le temps avec une réponse T mémoire pour une immunosurveillance.

Les vaccins antitumoraux actuels basés par exemple sur l'utilisation de peptides antigéniques, de protéines et de cellules tumorales génétiquement modifiées requièrent la présentation de ces antigènes par les propres cellules dendritiques du patient. Mais, ces cellules dendritiques de patients peuvent être inactives ou inefficaces pour générer une réponse immunitaire efficiente (Almand *et al*, 2000). En effet, les cellules tumorales peuvent inhiber la maturation des cellules dendritiques en sécrétant du VEGF (vascular endothelial growth factor) (Gabrilovich *et al*, 1996) ce qui a pour conséquence d'empêcher les cellules dendritiques d'être fonctionnelles. Aussi, la production d'autres facteurs dans le microenvironnement tumoral comme la prostaglandine E2 (PGE2) peut orienter *in vitro* la différenciation des cellules dendritiques en un phénotype de cellules myéloïdes suppressives (MDSC, myeloid-derived suppressor cells). Ces MDSC ont une fonction suppressive sur les LT cytotoxiques et pourraient donc favoriser la croissance tumorale (Obermajer *et al*, 2011). La préparation et la manipulation des cellules dendritiques *ex vivo* permet d'obtenir des DC fonctionnelles et de ne pas être dépendant de la qualité des DC du patient. La vaccination à base de cellules dendritiques présente donc un fort potentiel thérapeutique dans le traitement contre le cancer puisque les cellules dendritiques peuvent être générées *ex vivo*.

Néanmoins, les études cliniques ont démontré que cette technique présentait une faible efficacité thérapeutique (Sabado & Bhardwaj, 2013). Le premier et le seul succès thérapeutique approuvé par la FDA (food and drug autorisation) d'un vaccin basé sur l'utilisation combinée de cellules dendritiques chargées avec des antigènes et de LT, est le sipuleucel-T (Provenge®; Dendreon, WA, USA) dans le traitement thérapeutique des cancers de la prostate (réfractaire

aux traitements hormonaux) (Kantoff *et al*, 2010). Plusieurs paramètres semblent limiter l'efficacité des vaccins basés sur les cellules dendritiques : la source et le type de cellules dendritiques utilisées, le site et la fréquence d'injection et la capacité des cellules dendritiques à migrer vers les ganglions lymphatiques (Sabado & Bhardwaj, 2015; Allan *et al*, 2006). La maîtrise de ces différents paramètres représente un enjeu majeur dans la vaccination en immunothérapie.

1.2.1. Préparation des cellules dendritiques pour la vaccination

Les cellules dendritiques peuvent être générées *ex vivo* à partir des progéniteurs présents dans la moelle osseuse (Lutz *et al*, 1999) ou à partir des monocytes (CD14⁺) isolés de PBMC des patients (Kiertcher & Roth, 1996). Elles sont très souvent cultivées *ex vivo* dans un milieu de culture avec le facteur de différenciation GM-CSF et les cytokines IL-4 ou IL-13 (Alters *et al*, 1999; Kiertcher & Roth, 1996). Dans notre étude, nous avons cultivé les cellules dendritiques à partir de progéniteurs issus de la moelle osseuse des souris C57BL/6N en utilisant 5 ng/mL de GM-CSF et 10 ng/mL d'IL-4. Cette technique permet d'obtenir des cellules dendritiques immatures au bout de 6 jours en grande quantité. *In vivo*, au site de l'infection, le GM-CSF et l'IL-4 permettent de produire des cellules dendritiques dans un état intermédiaire de différenciation donc immatures. Ces cellules dendritiques sont spécialisées dans la capture et l'apprêtement des antigènes. Les cellules dendritiques immatures peuvent ensuite évoluer vers l'état mature à la suite de signaux de maturation et se spécialiser dans la présentation de peptides antigéniques. Toujours *in vivo*, cette maturation a lieu lorsque les cellules dendritiques migrent vers les ganglions lymphatiques pour rencontrer les LT naïfs (Cella *et al*, 1997). Plusieurs molécules peuvent induire la maturation des cellules dendritiques en se fixant par exemple aux récepteurs de type TLR ou aux récepteurs du TNF (TNFR) et sont donc utilisées *ex vivo* pour induire la maturation des cellules dendritiques. Les TLR reconnaissent des PAMP comme le LPS et les séquences d'ADN non méthylées CpG (Akira *et al*, 2001). Les TNFR peuvent reconnaître le TNF- α (Brunner *et al*, 2000) et le ligand de CD40 qui appartient à la famille du TNF (Würtzen *et al*, 2001) par exemple. La fixation de ces molécules sur leur récepteur induit la maturation des cellules dendritiques. Les cellules dendritiques matures expriment fortement les molécules du CMH-II pour permettre la présentation de peptides qui seront reconnus par le TCR des LT (Cella *et al*, 1997). En plus, d'une augmentation de l'expression des molécules du CMH-II, les cellules dendritiques matures expriment davantage de molécules de costimulation comme CD80 et CD86 qui vont permettre de donner le 2^{ème} signal nécessaire à l'activation des LT (Cella *et al*, 1997).

Le choix de préparation *ex vivo* des cellules dendritiques permettant leur prolifération et leur maturation est important pour que la vaccination utilisant ces cellules permette la mise en place d'une réponse T efficace. En effet, les cellules doivent à la fois exprimer efficacement les peptides antitumoraux sur les molécules du CMH et exprimer suffisamment les molécules de costimulation pour permettre l'activation totale des LT. Mais, la maturation des cellules dendritiques est également importante pour permettre la migration de ces cellules du site d'injection du vaccin vers les ganglions lymphatiques pour rencontrer et activer un LT naïf (De Vries *et al*, 2003). Aussi, après les signaux 1 et 2 qui sont importants pour l'activation des LT, un troisième signal est également important. Ce 3^{ème} signal correspond à la sécrétion de cytokines par les DC matures qui interagissent avec les LT naïfs. Cette sécrétion de cytokines (IL-12 et IFN- γ par exemple) va permettre d'orienter les LT vers une fonction effectrice appropriée et de favoriser la prolifération clonale des LT (Kaliński *et al*, 1999; Goral, 2011). Ainsi, l'efficacité de la vaccination dépendrait de plusieurs paramètres : *i*) la préparation des cellules dendritiques incluant la maturation, *ii*) le choix de l'antigène associé aux tumeurs et la méthode permettant la présentation des peptides par les cellules dendritiques et *iii*) la méthode d'injection pour permettre la migration des cellules dendritiques vers les ganglions lymphatiques.

1.2.2. Choix de l'antigène de tumeurs et approche de l'adressage de l'antigène dans les DC pour augmenter l'immunisation

La vaccination basée sur les cellules dendritiques en immunothérapie vise à accroître la réponse immunitaire antitumorale en augmentant la réponse contre un antigène de la tumeur. Cet antigène doit être le plus spécifique possible de la tumeur et être fortement immunogène pour obtenir une immunisation optimale et l'élimination de la tumeur. Parmi les antigènes de tumeurs, il existe les antigènes associés aux tumeurs (TAA, tumor-associated antigen) et les antigènes spécifiques de la tumeur (TSA, tumor specific antigen) qui ne sont pas ou très peu exprimés par les autres cellules de l'organisme (ex : néoantigènes). Les antigènes de tumeurs, peuvent avoir une origine virale (peptides E6 et E7 de HPV (human papilloma virus) (Welters *et al*, 2008)), provenir d'antigènes issus de gènes mutés dans la tumeur (par exemple le peptide issu de la protéine CDK4 mutée (Wolfel *et al*, 1995)) ou être dérivés de gènes qui sont normalement exprimés dans les lignées germinales, mais qui sont surexprimés dans la cellule tumorale (par exemple NYESO-1 (Sonpavde *et al*, 2014)).

1.2.3. Les différentes techniques permettant la présentation de peptides dérivés de l'antigène dans les cellules dendritiques

Plusieurs techniques différentes ont été développées afin de faire apprêter et présenter l'antigène par les molécules du CMH-I/II dans les cellules dendritiques *in vitro*. Les cellules dendritiques peuvent être chargées directement par les antigènes de tumeurs ou des peptides antigéniques dérivés d'antigènes de tumeurs (Celluzzi *et al*, 1996; Stober *et al*, 2002). Aussi, les cellules peuvent être transfectées par de l'ADN (Diebold *et al*, 2001) ou de l'ARN (Liao *et al*, 2004), ou les cellules dendritiques peuvent être infectées par des vecteurs viraux (Sun *et al*, 2015). De plus, les cellules dendritiques peuvent également être incubées avec du lysat de cellules tumorales (Hatfield *et al*, 2008), des cellules tumorales entières neutralisées (Palucka *et al*, 2006), des ARN totaux de tumeurs (Ashley *et al*, 1997) ou des DRibbles (Su *et al*, 2013) avant d'être utilisées en vaccination antitumorale.

1.2.3.1. Les cellules dendritiques chargées avec des peptides

Dès 1990, Inaba et collaborateurs (Inaba *et al*, 1990) ont pu montrer que des cellules dendritiques prélevées dans la rate d'une souris et chargées *ex vivo* avec des antigènes protéiques peuvent *in vivo* entraîner une réponse des LT CD8⁺ dans les organes lymphoïdes. Ces lymphocytes T activés reconnaissent uniquement les peptides dérivés de cette protéine et présentés par les molécules du CMH-I des DC (Inaba *et al*, 1990). En 1996, Celluzzi et collaborateur ont montré que les cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse chargées *ex vivo* avec le peptide OVA restreint au CMH-I (SIINFEKL) et utilisées pour immuniser des souris C57BL/6 entraînaient *in vivo* l'activation des LT CD8⁺ cytotoxiques (Celluzzi *et al*, 1996). De plus, l'immunisation *in vivo* des souris avec des DC préalablement chargées induit une immunité antitumorale grâce aux LT cytotoxiques contre la tumeur (cellules B16 surexprimant l'antigène OVA et greffées dans les souris) (Celluzzi *et al*, 1996). Dans une autre étude, des cellules dendritiques autologues de patients, cultivées *ex vivo*, ont été chargées avec l'antigène de tumeurs Mage-3 (melanoma-associated antigen 3) et utilisées pour vacciner des patients atteints de cancers gastrointestinaux (Sadanaga *et al*, 2001). Des réponses lymphocytaires T CD8⁺ spécifiques du peptide ont été observées chez la moitié des patients, mais la régression des tumeurs n'a pu être observée que chez 3 des 8 patients vaccinés (Sadanaga *et al*, 2001).

L'utilisation des peptides tumoraux ou d'antigènes de tumeurs pour charger directement les cellules dendritiques présente l'avantage d'être facile à réaliser. Mais, cela nécessite de connaître quels sont les antigènes immunogènes de la tumeur et quels sont les épitopes présentés. Cette technique semble donc limitée. L'utilisation de lysats cellulaires

provenant de lignées tumorales ou de lysats tumoraux peuvent permettre d'augmenter le répertoire de peptides présentés par les molécules du CMH-I et II. La technologie basée sur l'utilisation de d'ADN plasmidique peut permettre de modifier le peptide ou l'antigène pour qu'ils soient mieux présentés par les cellules dendritiques.

1.2.3.2. Les cellules dendritiques préparées avec de l'ADN

Un autre type de vaccination à base de cellules dendritiques existe et est basé sur l'expression de l'antigène par la cellules dendritiques grâce à l'introduction d'ADN. L'ADN peut entrer dans la cellule par transfection en utilisant l'électroporation par exemple (Van Tendeloo *et al*, 2001) ou par transduction en utilisant des vecteurs viraux comme les adénovirus (Nikitina *et al*, 2001).

Dans une étude vaccinale, des cellules dendritiques murines ont été électroporées en présence d'un vecteur plasmidique codant un antigène de fusion composé de la protéine lysosomale LAMP1 et de l'antigène gag du VIH. La surexpression de cet antigène de fusion dans les cellules dendritiques *ex vivo* a permis d'activer les LT CD4⁺ (ELISpot-IFN- γ) spécifiques des peptides de l'antigène gag (Simon *et al*, 2010). La réponse des LT CD4⁺ a aussi été observé *in vivo* dans des souris transgéniques HLA-DR4 et cette réponse est spécifique de plusieurs épitopes de l'antigène gag de VIH (Simon *et al*, 2010). En transfectant les cellules dendritiques par un plasmide codant la totalité de la protéine gag, les cellules dendritiques ont pu apprêter et présenter plusieurs épitopes sur les molécules du CMH-II. De plus, la fusion de l'antigène avec la protéine LAMP1 permet de cibler l'apprêtement dans la voie lysosomale et donc la présentation de l'antigène par les molécules du CMH-II (Simon *et al*, 2010). Par ailleurs, comme nous l'avons décrit précédemment, des protéines de l'autophagie ont également été utilisées pour adresser un antigène à la voie autophagique et permettre la présentation par les molécules du CMH-II. Ainsi, la protéine p62 a été fusionnée à l'antigène gag du VIH (Andersen *et al*, 2016), LC3B à l'antigène gag (Coulon *et al*, 2016) et LC3B à l'antigène de tumeurs NY-ESO-1 (Fonteneau *et al*, 2016). Dans tous les cas, l'adressage de l'antigène à l'autophagosome a permis d'augmenter la réponse des LT CD4⁺ mis en co-culture avec les cellules présentatrices d'antigènes surexprimant les antigènes de fusion par cette méthode de transfert d'ADN. Nous avons également démontré que les protéines GABARAP et GABARAPL1 peuvent être utilisées pour adresser efficacement l'antigène OVA entier aux autophagosomes dans les cellules dendritiques (**Publication I**). Cet adressage permet la présentation du peptide par les molécules du CMH-II. De façon intéressante, l'antigène entier est toujours dégradé par le protéasome et donc apprêté par la voie du CMH-I. Nous avons donc pu avec une seule construction activer à la fois les LT CD4⁺ et CD8⁺ (**Publication I**). Notre étude pourra être

complétée par une étude vaccinale *in vivo* sur des souris inoculées avec des tumeurs B16-OVA. Cette étude permettra de vérifier si l'on arrive à immuniser des souris par l'injection de cellules dendritiques surexprimant les protéines de fusion OVA-Myc-ATG8. D'autres protéines peuvent aussi être utilisées pour augmenter la présentation d'un antigène par les protéines du CMH-II : la fusion de l'antigène OVA à la chaîne invariante Ii ou le récepteur de la transferrine (Diebold *et al*, 2001)

Il existe des différences d'efficacité entre la transfection et la transduction pour le transfert d'ADN. L'utilisation de la transduction avec un adénovirus est une technique qui semble plus efficace et non toxique pour les cellules. Dans une étude vaccinale avec des cellules dendritiques transduites par un adénovirus, les auteurs ont estimé l'efficacité à 70 % (Yang *et al*, 2010). De plus, cette technique ne gêne pas la maturation des cellules dendritiques par le TNF- α (Yang *et al*, 2010). Pour notre étude, nous avons choisi de transférer des vecteurs plasmidiques dans les cellules dendritiques. Deux techniques différentes de transfection ont été utilisées : la transfection avec le kit JetPEI-Macrophage et la transfection par électroporation. Nous avons privilégié l'utilisation de vecteur plasmidique car ils permettent la création de protéines de fusion pour augmenter dans notre cas l'adressage de l'antigène aux autophagosomes grâce aux protéines de la famille ATG8.

Les deux méthodes de transfection utilisées ont présenté des avantages et des inconvénients.

L'utilisation du kit JetPEI-Macrophage est intéressante car les réactifs utilisés ne présentent pas de toxicité pour les cellules dendritiques et ils provoquent leur maturation. Celle-ci serait liée au mannose fixé au polymère cationique PEI. Cet ose serait reconnu par un récepteur (CD 206) présent à la surface des cellules dendritiques. Le mannose peut être présent à la surface des pathogènes et le récepteur au mannose est un PRR qui peut entraîner la maturation des cellules dendritiques (Kanazawa, 2007). Cependant l'efficacité de transfection reste faible.

L'utilisation de l'électroporation (Amaxa Nucleofector) nous a permis d'augmenter l'efficacité de transfection par rapport au JetPEI-Macrophage (**Résultats complémentaires**). En revanche, cette technique s'avère être plus délétère pour les DC. Aussi, la maturation des DC a été menée avant l'électroporation en utilisant du LPS. Ces deux méthodes de transfection des cellules dendritiques devront être aussi testées en vaccination pour déterminer quelle méthode est la plus efficace. La construction de vecteur rétroviraux a été entreprise dans des plasmides pBABE pour pouvoir exprimer *in vivo* les antigènes 242OVA et 242OVA-Myc-ATG8.

D'une façon plus générale, l'expression d'antigènes dans la cellule dendritique par le transfert d'ADN est une technique qui présente plusieurs avantages. Elle permet de modifier un antigène

pour améliorer sa présentation par les cellules dendritiques ou d'orienter son apprêtement/présentation par les molécules du CMH-II par exemple en réalisant des antigènes recombinants (Fonteneau *et al*, 2016; Andersen *et al*, 2016; Coulon *et al*, 2016; Simon *et al*, 2010). De plus, cette méthode permet d'utiliser un antigène entier et donc de potentiellement permettre la présentation de plusieurs épitopes ou des néoantigènes. L'augmentation du panel d'épitopes présentés par la cellule dendritique à partir d'un antigène peut générer des réponses plus larges par les LT CD4⁺ et CD8⁺. Enfin, cette méthode permet de réaliser des cotransfections avec des antigènes de tumeurs et des protéines qui favorisent l'activation et la prolifération des LT, par exemple. Ainsi, nous pouvons imaginer réaliser des cotransfections pour faire exprimer davantage de protéines de costimulation comme CD80 et CD86 par les DC qui améliorerait l'activation des LT (Agadjanyan *et al*, 1999). Une autre possibilité serait de faire surexprimer des cytokines pour améliorer l'activation des LT. Par exemple, il a été montré que de plasmide d'expression de l'IL-12 et du GM-CSF dans la vaccination ADN, pourrait favoriser l'activation des LT CD4⁺ TH1 décrits pour être antitumoraux contrairement à l'IL-4 ou l'IL-10 qui favoriserait une réponse TH2 plutôt décrite comme protumorale (Ahlers *et al*, 1997).

Néanmoins, cette technique présente l'inconvénient de devoir connaître les antigènes associés aux tumeurs qui seraient immunogènes pour les faire exprimer dans les DC.

1.2.3.3. *Les cellules dendritiques incubées avec du lysat tumoral, des cellules tumorales entières ou des DRibbles*

Cette technique inclut l'utilisation de lysat de cellules tumorales provenant de lignées ou de la tumeur, ou l'utilisation de cellules entières. Ces cellules peuvent être en amont traitées pour induire un type de mort cellulaire particulier afin d'améliorer la présentation croisée des antigènes de tumeurs par les DC, par exemple. En effet, nous avons décrit dans l'introduction que l'induction de la mort cellulaire par l'autophagie dans les cellules tumorales pouvait améliorer la présentation croisée d'un antigène, lors d'une immunisation *in vivo* de souris. Ces souris présentaient plus de réponse lymphocytaire CD8⁺ spécifique de l'antigène dans leurs ganglions (Uhl *et al*, 2009). Aussi, l'induction de l'autophagie par la rapamycine ou par une privation en nutriments dans des cellules de mélanome humain, avant qu'elles ne soient irradiées puis incubées avec les DC, améliore la présentation croisée de l'antigène gp100 par les DC. Cette amélioration de la présentation croisée par les cellules dendritiques s'accompagne d'une plus forte activation *in vitro* et *in vivo* des LT CD8⁺ spécifiques de l'antigène gp100 (Li *et al*, 2008). De plus, une nouvelle thérapie vaccinale basée sur l'utilisation d'autophagosomes dérivées de cellules tumorales (DRibbles) a été développée pour l'immunothérapie. En effet, les

DC chargées de DRibbles ont pu activer les LT CD8⁺ avec une meilleure efficacité que les DC chargées de cellules mortes ou de lysats cellulaires (Li *et al*, 2011b). Une étude de vaccination thérapeutique sur des souris à base de DC chargées avec des DRibbles dérivées de cellules 3LL, entraîne un retard de croissance tumorale sous-cutanée (tumeur 3LL) et une amélioration significative de la survie des souris (Li *et al*, 2011b). Les DRibbles permettent de présenter aux DC un panel plus large d'antigènes avec des protéines à courte durée de vie, des DRiP et des protéines à longue durée de vie (Li *et al*, 2009b). L'utilisation de lysat cellulaire ou de cellules entières pour incuber les DC permet également de proposer un panel plus large d'antigènes de tumeurs comme pour les DRibbles. Ce panel plus large peut également permettre au DC de présenter les peptides sur différents haplotypes et d'activer des LT CD4⁺/CD8⁺ (Rojas-Sepúlveda *et al*, 2018). De plus, l'utilisation de lysats cellulaires tumoraux préparés par des cycles de congélation/décongélation ou des DRibbles (Li *et al*, 2011b) permettent également le relargage de DAMP qui pourront améliorer la maturation des DC. Ceci peut être un avantage non négligeable en vaccination *in vivo* puisque cela pourra améliorer l'efficacité d'activation des LT, ainsi que leurs fonctionnalités (Rojas-Sepúlveda *et al*, 2018; Li *et al*, 2011b).

Annexes

Revue :

**“Role of autophagy in antigen presentation and its involvement
on cancer immunotherapy”**

Leila Fonderflick, Olivier Adotévi, Michaël Guittaut, Pascale Adami, Régis Delage-
Mourroux

Publié dans *Autophagy in Immune Response: Impact on Cancer Immunotherapy*,
Volume 1, 1st Edition, 2020.

Role of autophagy in antigen presentation and its involvement on cancer immunotherapy

*Leila Fonderflick^a, Olivier Adotévi^{a,b}, Michaël Guittaut^{a,c},
Pascale Adami^a, Régis Delage-Mourroux^a*

^aUniversity of Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Institut RIGHT, Group TIM-C, Besançon, France ^bDepartment of Medical Oncology, University Hospital of Besançon, Besançon, France ^cDImaCell Platform, University of Bourgogne Franche-Comté, Besançon, France

Abstract

Autophagy is a catabolic process in which cytosolic constituents such as damaged proteins and organelles are degraded by lysosomal hydrolases and this pathway therefore recycles nutrients and provides energy to the cells. In this review, we will describe the involvement of autophagy in antigen presentation and its impact on cancer immunotherapy. In antigen presenting cells, the autophagy pathway generates peptides from endogenous antigen presented by the major histocompatibility class II (MHC-II) proteins to CD4⁺ T cells. The contribution of CD4⁺ T cells in the immune response is crucial and central since they coordinate and increase the activity of every cell types involved in immunity and especially in the immunity against cancer. Autophagy is also important in antigen donor cells like for instance tumor cells. Indeed, when captured by antigen presenting cells, these exogenous antigens will be more efficiently presented on MHC-I by the mechanism of cross-presentation for a stronger priming of CD8⁺ T cells and a better cytotoxic activity.

Finally, the involvement of autophagy in antigen presentation led to consider the modulation of autophagy as a mean to improve immunotherapy through three promising axes. Firstly, the release of autophagosomes by tumor cells treated with proteasome and autophagosome-lysosome fusion inhibitors or autophagic inducer is a source of tumor antigens for therapeutic vaccination. Secondly, fusion proteins between ATG8 family proteins or cargo adaptors and tumor antigens will specifically address the tumor antigens into autophagosomes in order to facilitate their MHC-II presentation and efficiently prime CD4⁺ T cells. Finally, the use of radiotherapy can increase autophagy in tumor cells, enhances MHC-I expression level at the surface of tumor cells making them better target for CD8⁺ T cell cytotoxicity.

Abbreviations

3-MA	3-methyladenine
APC	antigen-presenting cell
ATG	autophagy-related
CQ	chloroquine
DAMP	damage associated molecular pattern
DC	dendritic cell
DRibble	defective ribosomal products containing autophagosome-rich blebs
DRiP	defective ribosomal products
GABARAP	γ -aminobutyric acid receptor-associated protein
GABARAPL1	γ -aminobutyric acid receptor-associated protein-like-1
HLA	human leucocyte antigen
IFN	interferon
LAP	LC3-associated phagocytosis
MHC	major histocompatibility complex
NBR1	neighbor of BRCA1 gene 1
mTOR	mammalian target of rapamycin
PI3K	phospholipid inositol triphosphate-kinase
SQSTM1	sequestosome 1/p62
Sh RNA	small hairpin RNA
SLiP	short-lived protein
Si RNA	small interfering RNA
TLR	toll-like receptor

Conflict of interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Introduction

The term autophagy meaning “self-eating” refers primarily to a catabolic process which is highly conserved from yeast to mammals. In this pathway, cytoplasmic parts of the cells are degraded and recycled by the lysosome to provide the cells in nutrients and energy. Autophagy has been described to occur at low basal level to maintain cellular homeostasis but can also be induced by metabolic stresses, such as nutrient starvation, oxidative or endoplasmic reticulum (ER) stress to promote cell survival. Three intracellular common autophagy pathways in eukaryotic cells have been described: macroautophagy, microautophagy and chaperone mediated autophagy (CMA) [1,2].

Briefly, *macroautophagy* (hereafter called *autophagy*) is characterized by the formation of a double-membrane structure called phagophore in which portions of the cytosol, damaged proteins/organelles, long lived proteins, and/or unfolded proteins are engulfed. After this initiation step, the phagophore gradually lengthens until it closes and forms a double-membrane organelle called autophagosome. This stage is called the elongation step. Then, after the maturation step, autophagosomes fuse with lysosomes to generate autolysosomes leading to the degradation of autophagosome constituents by acidic lysosomal hydrolases [3,4] (Fig. 1A). This process requires more than 30 proteins called autophagy-related (Atg) proteins.

At the molecular level, two ubiquitin-like conjugation systems ATG8/PL and ATG5–ATG12 regulate autophagosome formation and its elongation. The ATG8 family is composed

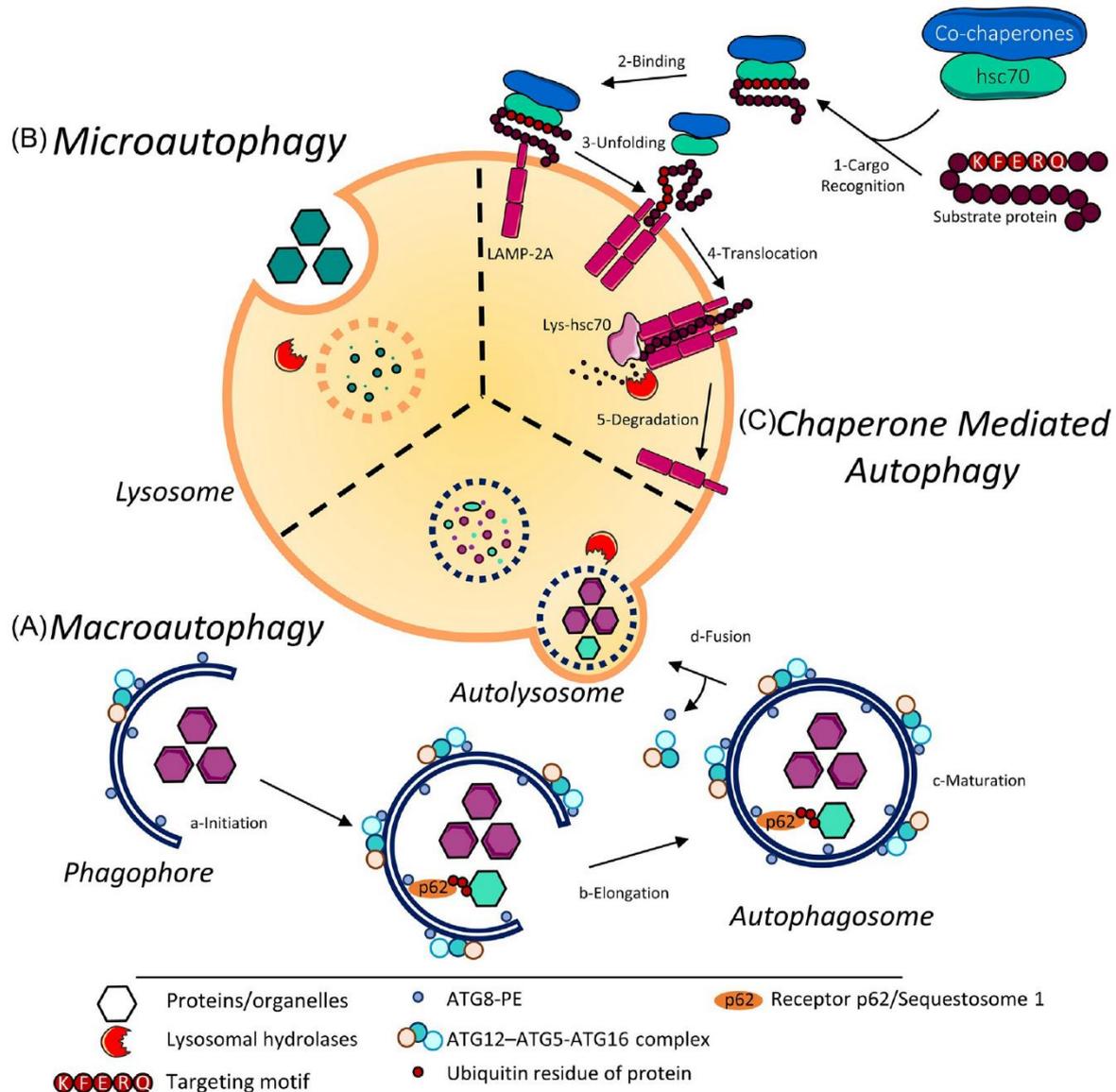


FIG. 1 Representation of the three types of autophagy. (A) Macroautophagy is characterized by the sequestration of cytoplasmic content in autophagic vesicles called autophagosomes. (a) During the initiation step, a double membrane structure called phagophore gradually lengthens (b) until it closes to form a double membrane vesicle called autophagosome (c). This autophagosome merges with the lysosome (d) to form the autolysosome and its contents is degraded by lysosomal hydrolases. ATG8 is conjugated to phosphatidyl-ethanolamine (PE) by the ATG12-ATG5-ATG16 complex to form ATG8-PE. In selective autophagy, the cargo is recruited before the closure through its interaction with the cargo adaptor (i.e., p62) which binds ATG8-PE embedded into the inner membrane. (B) In microautophagy the protein to be degraded are directly internalized by the invagination lysosomal membrane. (C) Chaperone mediated autophagy is characterized by the selective degradation of proteins containing the KFERQ motif. These proteins are recognized by the chaperone protein hsc70 (1) which will then associate with the lysosomal protein LAMP-2A (2-3) leading to their translocation (4) within the lysosome and their degradation (5).

of two subfamilies, light chain 3 (LC3) subfamily and γ -aminobutyric acid receptor associated protein (GABARAP). The LC3 subfamily includes LC3 forms A, B and C, whereas the GABARAP subfamily comprises GABARAP, GABARAP-like-1/Glandular epithelial cells 1 (GABARAPL1/GEC1), GABARAP-like-2 (GABARAPL2) and GABARAP-like-3 (GABARAPL3). GEC1 was first described by our laboratory as an estrogen regulated gene [5]. The first ubiquitin-like protein ATG12 is activated following its cleavage at the C-terminal carboxyl group by the E1 ubiquitin-like enzyme ATG7. Then, ATG12 is transferred to the E2 enzyme ATG10 and attached to a lysyl residue of ATG5. The covalent ATG12–ATG5 complex then binds ATG16 to form the ATG12–ATG5–ATG16 trimeric complex, which has been suggested to act as an E3 ligase for the conjugation of ATG8 proteins onto lipids [6]. The proteins ATG8, are beforehand cleaved by the protease ATG4 at their C-terminal end to expose a glycyl residue. Then, the cleaved mature forms of these proteins are successively covalently linked to the E1 enzyme ATG7 and to the E2 enzyme ATG3 and finally transferred to phosphatidylethanolamine (PE) docked into the elongating autophagosomal membrane. The conjugation between the ATG8 and the lipid is activated by the E3-like enzyme ATG12–ATG5–ATG16 complex [6,7]. Therefore, during the autophagy process two forms of the LC3/GABARAP proteins are produced: the form I, which is cleaved and cytosolic, and the form II, linked onto the PE, itself associated with the inner and outer autophagy membranes [8–10] (Fig. 1A).

Autophagy also contributes to cellular homeostasis by selectively degrading intracellular materials, such as damaged mitochondria, excess of peroxisomes or aggregated proteins as well as intracellular pathogens. The selectivity of the components to be degraded requires receptor proteins, called cargo adaptors which are able to recruit specific components, called cargos, to the autophagosomes thanks to their interaction with the ATG8 proteins. The interaction between ATG8 and cargo adaptors is linked to the existence of a LIR domain (LC3-interacting region) in the cargo adaptor which directs its interaction with ATG8 proteins present on the autophagosomal membrane. Cargo adaptors also possess an ubiquitin-binding domain (UBA) which allow them to recognize ubiquitinated substrates (cargos) and direct them into the autophagosomes [11]. In mammals, several cargo adaptors have been described such as sequestosome 1 (SQSTM1/p62) which recognizes ubiquitinated proteins [12] (Fig. 1A), or cytosolic bacteria [13], NBR1 which recognizes single ubiquitinated proteins [14], or NIX which recognizes damaged mitochondria [15]. The different selective autophagy pathways are generally named from the cargo they target for degradation, for example, aggrephagy (protein aggregates), mitophagy (mitochondria) or xenophagy (pathogens, including bacteria) [11]. Under non-physiological conditions, such as nutrient starvation or metabolic stress, autophagy is induced and leads to bulk lysosomal degradation of cytoplasmic components independently of the involvement of cargo adaptors.

Unlike macroautophagy, endosomal *microautophagy* involves the direct engulfment of cytoplasmic components into the lysosome lumen after the invagination of the lysosome membrane in mammals or the vacuole in yeast. This process allows for the degradation of random proteins (Fig. 1B) [16].

The Chaperone-mediated-autophagy implicates the selective degradation of intracellular components by the lysosome. Unlike, macroautophagy and microautophagy no vesicle formation or major modification of the lysosome structure membrane are required for CMA [17]. Selective soluble or unfolded proteins are targeted to the membrane of lysosome following the recognition of a pentapeptide sequence called KFERQ-like motif. Firstly, the substrate

proteins are recognized by cytosolic chaperone complexes composed of the heat shock cognate protein of 70-kDa (hsc70) and its co-chaperones. Secondly, the protein complexes are binding the lysosomal associated membrane protein type 2A (LAMP-2A) and the substrate proteins are then unfolded. Finally, the substrate proteins are translocated into the lysosomal lumen to induce their degradation regulated by a lysosomal chaperone called lys-hsc70 (Fig. 1C) [18].

Autophagy is, therefore, involved in several biological functions such as nutrient homeostasis, elimination of damaged organelles and pathogens. The alteration of this pathway has been described to lead to the development of pathologies including tumorigenesis and neurodegenerative diseases. In this chapter, we will discuss the involvement of autophagy in the antigen presentation process during adaptive immunity and focus on the role of autophagy in the presentation of tumoral antigens. Indeed, it has been shown that the recognition of peptides coming from the extracellular and intracellular sources, on the major histocompatibility complex class II (MHC-II) or MHC class I (MHC-I) molecules by CD4⁺ and CD8⁺ T cells, respectively, plays a key role in the immune response against tumor cells.

Classical MHC class I and II antigen presentation

The MHC-I and II molecules play a major role in the response of the adaptive immune system. In the conventional paradigm, antigenic peptides presented by MHC-I proteins are mainly generated from cytosolic and nuclear proteins, whereas antigenic peptides presented by MHC-II are engendered from exogenous proteins. CD8⁺ T cells recognize protein-derived peptides presented by MHC-I while CD4⁺ T cells recognize protein-derived peptides presented by MHC-II.

MHC-I molecules are expressed by almost all nucleated cells. MHC-I molecules consist of two types of chain—a polymorphic membrane heavy chain and an invariant chain called β 2-microglobulin, assembled into the ER. Without peptides, the MHC-I complex is stabilized by three chaperone proteins: calreticulin, the protein disulfide isomerase (ERp57) and tapasin. All these subunits form a complex called the peptide-loading complex (PLC). Tapasin also interacts with the peptide transport protein TAP (transporter associated with antigen processing) which directs the translocation of peptides from the cytoplasm into the ER. Peptides are generated from endogenous proteins by cytosolic and nuclear proteasomes. The processed peptides of 8–16 amino acids are trimmed by an aminopeptidase ERAP1 present in the ER before binding to MHC-I molecules. MHC-I-peptide complexes are then transported to the cell surface to be recognized by CD8⁺ T cells [19]. However, exogenous sources of antigens can be also presented on MHC-I molecules by dendritic cells (DC), specialized antigen presenting cells (APC) to activate CD8⁺ T cells. This less conventional process is called cross-presentation. Indeed, exogenous antigens can be processed in a TAP independent manner or in a TAP dependent manner following endocytosis [20]. Firstly described in 1976 as “cross-priming” [21], this process enlarges the peptide repertoire that dendritic cells can present on MHC-I proteins to activate the CD8⁺ T cell response. This mechanism is involved in autoimmune diseases when cross priming presents self-antigens to CD8⁺ T cells [22] or immune surveillance of cancer and virus infections [20].

MHC-II molecules are expressed by a subgroup of immune cells called antigen presenting cells, such as DCs, macrophages and B cells. MHC-II peptides are produced with the help of

lysosomal hydrolases from exogenous proteins delivered to late endosomes by phagocytosis, macropinocytosis and endocytosis. MHC-II α and β subunits are synthesized and folded in the endoplasmic reticulum thanks to a specific chaperone, the invariant chain (I chain). This process helps to limit the early association of peptides at the peptide binding groove of the MHC protein. The complex between MHC-II and the invariant chain is then transported through the Golgi apparatus into a compartment called the MHC-II compartment (MIIC). In the MIIC, due to the acidic pH, proteases cathepsin S and cathepsin L are activated and the I chain is proteolyzed to give a residual I chain fragment called class II-associated invariant chain peptide (CLIP). Then, the MHC-II $\alpha\beta$ -CLIP complex binds a chaperone called HLA-DM in human (H2-DM in mouse) to allow for the exchange of CLIP for a high affinity antigenic peptide derived from a protein degraded in the endosomal pathway. The MHC-II-peptide complexes are subsequently transported to the cell surface membrane to be recognized and stimulate CD4⁺ T cells [19,23].

Autophagy and antigen presentation

Recently accumulating evidences have demonstrated that autophagy is directly involved in MHC-I and MHC-II presentations.

Autophagy and MHC-II antigen presentation

Autophagy in MHC-II presentation of endogenous antigens

First evidences that autophagy have connection with the MHC-II antigen presentation have been given by colocalization data between autophagy proteins and MHC-II molecules. Former studies have shown that peptides derived from the proteolysis of ATG proteins [24], as well as lysosomal proteins [25], can be presented by MHC-II molecules. Indeed, during the maturation of the autophagosomes, the inner membrane is degraded. Since, the form II of the ATG8 are docked both on the internal and external sides to the autophagosomes. ATG8 proteins can therefore give antigenic peptides. For example, in pancreatic islet β -cells expressing I-A^{g7} molecules, the GABARAP-derived peptide 29-45 (VPVIVEKAPKARIGDLD) has been found on MHC-II molecules, suggesting that GABARAP can be targeted to the MIIC compartment [24]. Another evidence has been given by Schmid and collaborators [26]. Indeed, they showed, during colocalization experiments targeting LC3B, HLA-DM, MHC-II and LAMP-2, that, in human dendritic, B and epithelial cells, autophagosomes are constitutively formed and continuously fused with MIIC [26]. Similarly, in cortical and medullar thymic epithelial cell lines LC3 colocalized with H2-DM, MHC-II molecules, CLIP in a positive lysosomal LAMP-1 compartment. The autophagy machinery can also be targeted to the MIIC compartment for MHC-II presentation in the thymic epithelium [27]. This continuous supply of self-endogenous antigens contributes to self-tolerance in the thymus by positive and negative CD4⁺ T cell selection [28].

Macroautophagy is involved in endogenous antigen processing and presentation such as viral, bacterial or cytoplasmic antigens by MHC-II. As a first example, the endogenous Epstein-Barr virus nuclear antigen 1 (EBNA1) is processed by autophagy. Inhibition of

autophagy, using NH_4Cl or chloroquine, led to EBNA1 accumulation in cytosolic vesicles. In addition, treatment with Atg12 siRNAs to inhibit autophagosome formation decreased EBNA1-specific CD4^+ T cell recognition [29]. Similarly, Nimmerjahn and colleagues have shown that the cytosolic bacterial antigen neomycin phosphotransferase II (Neor) was presented on MHC-II molecules by autophagy [30]. However, autophagy also seemed to be able to process nuclear antigens for MHC-II presentation. In fact, when the Neor antigen was addressed to the cell nucleus by addition of a triplicated SV40 large T antigen nuclear localization signal, this fusion protein NucNeor was exclusively located into the nucleus. To avoid the exportation of NucNeor into the cytosol, the CRM1 protein nuclear exporting system was blocked with the antibiotic leptomycin B. Nevertheless, both Neor and NucNeor were processed by the autophagy pathway and Neor as well as NucNeor transfected cells were able to stimulate specific CD4^+ T cells with the same efficiency [31].

Autophagy is capable of degrading cytosol invading bacteria, as well. In macrophages, induction of autophagy by rapamycin (a mTOR inhibitor) led to the inhibition of mycobacteria survival by promoting the maturation of *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb) phagosome to phagolysosome [32]. *In vivo* study of the immunodominant mycobacterial Ag85B antigen presentation by mouse APCs showed that inducing autophagy with rapamycin led to enhance presentation of Ag85B derived peptides on MHC-II molecules and increased efficacy of the BCG vaccine [33]. However, *M. tuberculosis* can escape the host immune system by the suppression of MHC-II restricted antigen presentation. In fact, in Mtb infected dendritic cells, the PE_PGRS47 Mtb protein inhibited autophagy and limited the presentation of Mtb antigens. During *in vivo* infection in mice, the mutant of the PE_PGRS47 Mtb protein, MHC-II antigen presentation was enhanced [34].

But, macroautophagy is not the only process involved in MHC-II antigen presentation of endogenous antigens. Indeed, chaperone mediated autophagy can also participate in MHC-II presentation of cytoplasmic antigen since it has been demonstrated in a B cell model, that overexpression of LAMP-2A and hsc70 promoted cytoplasmic antigen capture and MHC-II presentation without modifying the levels of presence of the MHC-II molecules at the cell surface [35]. On the opposite, LAMP-2C overexpression inhibited MHC-II presentation of antigen [36].

Autophagy in MHC-II presentation of exogenous antigens

Autophagy is generally associated with the degradation of endogenous components. However, this process is also implicated in the degradation of exogenous antigens. Autophagy was found to be essential for optimal processing and presentation of extracellular antigens phagocytosed through the TLR pathway [37]. In a model of mouse conditionally knocked-out for *Atg5*, an essential autophagic protein required for autophagosome formation had been generated. In this model all hematopoietic cells, including DC and T cells, lacked *Atg5* gene in spleen, lymph nodes and bone-marrow [37]. *In vivo*, the deletion of *Atg5* in dendritic cells caused defects in CD4^+ T cell priming. When these mice were infected-intravaginally by the Herpes Simplex Virus 1, they were unable to produce a T helper 1 response (the number of $\text{IFN-}\gamma$ producing T cells and the synthesis of $\text{IFN-}\gamma$ were reduced compared to the wild type mice controls). Furthermore, *Atg5*^{-/-} deficient mice died more rapidly than wild type mice after viral infection. Further investigations demonstrated that *Atg5*^{-/-} DCs were unable to prime and activate the proliferation of wild type CD4^+ T cells

while these APCs were still able to migrate into secondary lymphoid organs, to produce cytokines, and to express MHC-II [37]. Moreover, *Atg5*^{-/-} DCs as well as wild type DCs were able to capture fluorescent soluble antigens as well as fluorescent apoptotic cells suggesting that endocytosis and phagocytosis processes were unchanged in *Atg5*^{-/-} DCs. To study the requirement of the autophagy machinery during the processing and presentation of endogenous antigens, DCs were infected with *Listeria monocytogenes* expressing the commonly-used antigen model OVALBUMIN (OVA). DC presentation of OVA peptides moderately decreased in absence of ATG5 as attested by a decrease in OVA-specific CD4⁺ T cell proliferation showing that autophagy was indeed required for the processing and presentation of endogenous antigens. Furthermore, using specific autophagy inhibitors or knock-down of autophagic proteins using *Atg7* and *Atg12* siRNA in wild type DCs, the authors showed that these APCs were impaired in their ability to present peptides derived from phagocytosed exogenous antigens. These results suggested that autophagy was also necessary for the processing and presentation of exogenous antigens in DCs. Last, it was demonstrated that the absence of ATG5 in DCs delayed the fusion between phagosomes and lysosomes suggesting that autophagy was necessary for this step and the effective delivery of cathepsins into the MHC-II processing compartment [37].

LC3-associated phagocytosis (LAP), is a non-canonical autophagy which has also been implicated in exogenous antigen processing and presentation on MHC-II molecules. During LAP, antigens are phagocytosed in a single membrane phagosome coated with the essential autophagic protein LC3B under its PE conjugated form -II (Fig. 2B) [38]. LAP could occur in different immune cells including macrophages [39], conventional dendritic cells [40] or plasmacytoid dendritic cells [41]. In a model using human antigen presenting cells and *Candida albicans* antigens, the authors showed that the recruitment of the antigens into LC3B-coated phagosome was dependent on the stimulation of the pattern recognition receptors (TLR2 for example) and of the NADPH oxidase 2 (NOX2) activity. The uncoupling of LC3B coated onto the phagosomes occurred before the acidification of phagosomes and the fusion with lysosomes. The formation of LAP seemed to delay antigen degradation and to prolonge the presentation of antigens on MHC-II complexes leading to a better CD4⁺ T cells response [38].

Autophagy and MHC-I antigen presentation

Autophagy and ATGs are implicated in MHC-I presentation in one hand in regulating MHC-I expression level on the cell membrane and on the other hand in generating peptides for MHC-I protein presentation.

Autophagy and MHC-I molecules expression

In mice, DCs and macrophages invalidated for the *Atg5* and the *Atg7* genes maintained a higher MHC-I molecule level on their cell surface compared to wild type cells because ATG proteins seemed to be involved in the internalization and recycling of MHC-I [42]. Indeed, it has been shown that MHC-I recruits the protein adaptor associated kinase 1 (AAK1) [42], a clathrin mediated endocytosis regulator [43], via the LC3B protein bound to the plasma membrane [42]. So, defect in ATG5 abolished LC3 lipidation and led to a less efficient recruitment

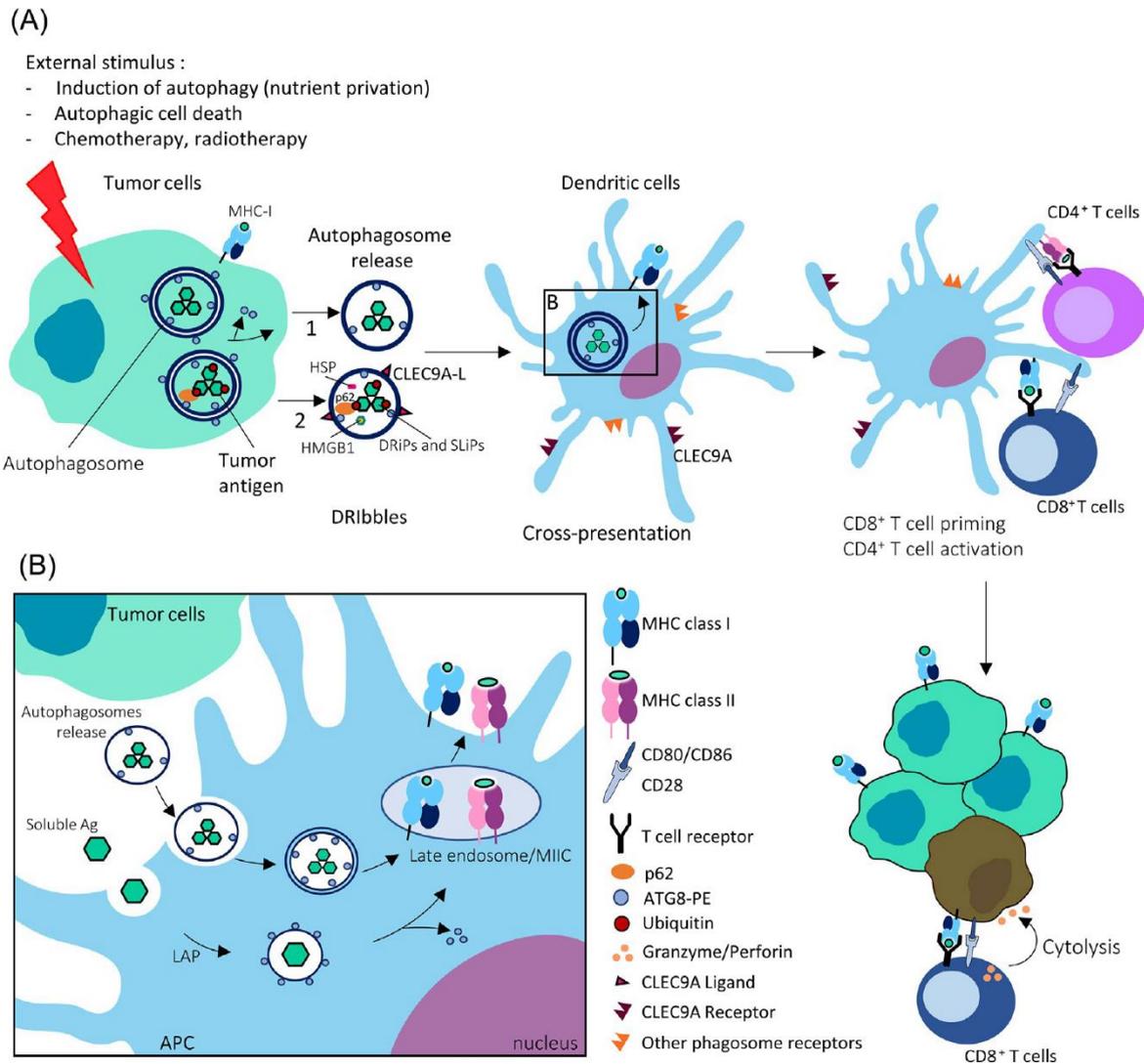


FIG. 2 Contribution of autophagy for exogenous tumor antigen processing. (A) Schematic representation of the potential autophagy mechanism for MHC class I antigen presentation. (1) Autophagy can be induced in tumor cells by nutrient starvation, drugs treatment, chemotherapy. Tumor cell autophagosomes can be released in the extracellular environment and internalized by antigen presenting cells (APC) specialized in cross-presentation. Antigens are then processed and presented bound to MHC-I molecule on the cell surface to prime/activate CD8⁺ T cells. (2) Inhibition of proteasome activity and autophagosome degradation in tumor cells lead to aggregation of ubiquitinated proteins, like defective ribosomal product (DRiPs) and short-lived proteins (SLiPs) that are sequestered in autophagosomes *via* p62. P62 protein binds to LC3B thanks to a Ubiquitin Binding Domain. The inner vesicle of autophagosomes is also released and this autophagosome-derived vesicle is called “defective ribosomal products-containing autophagosomes-rich blebs” (DRibbles). (B) Antigen content of autophagosomes is endocytosed by APCs and then probably fused with late endosomes or MiIC compartments to be processed and bound to MHC-I proteins by cross presentation. Autophagy in antigen donor cells can enhance the immunogenicity of tumor cells by increasing cross-presentation. In a second way, antigens release directly in extracellular domain can be internalized in APC by LC3-associated phagocytosis (LAP). LAP facilitates antigen processing and increases MHC-II presentation to activate CD4⁺ T cells. Abbreviations: Ag, antigen; APC, antigen presenting cells; DRiP, defective ribosomal products; Dribbles, defective ribosomal products-containing autophagosomes-rich blebs; HMGB1, high mobility group box 1; HSP, heat shock protein; LAP, LC3-associated phagocytosis; MHC, major histocompatibility complex; MiIC, MHC class II compartment; SLiP, short-lived protein.

of AAK1 to MHC-I molecules. Then, *Atg5*^{-/-} APCs were able to enhance the stimulation of CD8⁺ T cells during influenza A virus and lymphocytic choriomeningitis virus infection in these mice [42].

Autophagy in MHC-I antigen presentation of endogenous antigens

It is now clear, that autophagy can enhance classical MHC-I antigen presentation. In a model of macrophages infected by the herpes simplex virus type 1 (HSV-1), the authors showed that during the first hours of infection the presentation of glycoprotein B (gB) antigen-derived peptides followed the classical pathway involving the proteasome and the stimulation of gB-specific CD8⁺ T cells. Nevertheless, after an 8–12 h infection, gB antigens were then processed by autophagy since a bafilomycin A treatment, a lysosomal acidification inhibitor strongly inhibited the ability of macrophages to stimulate gB-restricted CD8⁺ T cells. Electronic microscopy showed that the antigen was internalized into specific four membrane autophagosomes probably originating from the nucleus. After being processed into the autophagosomes, the peptides escaped to the cytosol to be further processed by the proteasome and join the MHC-I classical pathway in a TAP-dependent manner [44].

The antigen presentation by MHC-I can implicate autophagy independently of the proteasome and the ER peptide transporter TAP. This has been demonstrated in a different model by cytomegalovirus (CMV) infection in human lymphoblasts deficient for the TAP transporter. As a matter of fact, the inhibition of proteasome did not affect the processing and presentation of the viral pUL138 antigen since cells were still able to activate pUL138-restricted CD8⁺ T cells. In contrast, inhibition of autophagy, using chloroquine, strongly reduced the presentation of the pUL138 antigen by MHC-I. Furthermore [MHC-I-peptide] complex was assembled into the endosomal compartment and not into the ER as classically described [45].

Some virus therefore developed the ability to block the autophagic machinery to escape immune surveillance. *In vitro*, DCs infected by an HSV1 mutant lacking the autophagy inhibitor "Infected Cell Protein" (ICP34.5), presented an increasing capacity to stimulate CD8⁺ T cells [46]. It has been shown that ICP34.5 inhibited autophagy through its interaction with BECLIN 1, a major protein involved in the formation of autophagosomes [46].

Autophagy in cross-presentation

The mechanism by which exogenous peptides gain access to MHC-I processing is not completely understood. In this context, the role of autophagy in cross-presentation of exogenous antigens by MHC-I molecules in dendritic cells remains controversial. In the experiments run by Lee and collaborators, that we mentioned previously [37], they also investigated whether autophagy was able to present exogenous peptides on MHC I protein in a model of *Atg5*^{-/-} hematopoietic cells [37]. For this purpose, the authors incubated wild type DCs or autophagy deficient DCs with a soluble OVA antigen or with apoptotic OVA-expressing cells. It is important to remember that in *Atg5*^{-/-} DCs, neither phagocytosis nor endocytosis were affected. In any case, wild-type or *Atg5*^{-/-} DCs were able to stimulate OVA-specific CD8⁺ T cells with a similar efficiency and they showed that, in *Atg5*^{-/-} mice, CD8⁺ T cell priming was not affected [37]. According to these authors autophagy impairment did not disturb cross presentation.

It also has been shown that a specific deletion of the class III PI3Kinase vacuolar protein sorting 34 (VPS34) gene led to the absence of expression of *VPS34* in the sub-population of CD8 α^+ dendritic cells [47]. VPS34 is a protein involved in autophagy as well as in endocytosis and intracellular vesicular trafficking [48]. In the absence of VSP34, no double membrane autophagosome structures were detected in dendritic cells and accumulation of endoplasmic reticulum or mitochondria mass indicated that the canonical autophagy was indeed defective in these cells [47]. Nonetheless, *VPS34*-deficient dendritic cells showed an enhanced ability to present peptides through MHC I and II classical pathways (through the proteasomal or the endosomal pathway, respectively). Nevertheless, *VPS34*-deficient DCs were not able to cross-present the exogenous OVA antigen when it was proposed to DCs by OVA-expressing apoptotic cells. In the opposite, they were able to cross-present the same exogenous OVA antigen when it was proposed to DCs under a soluble form, expressed in bacteria or addressed to DCs by an antibody. Then, these results suggest that pinocytosis, receptor-mediated endocytosis or phagocytosis processes were unaffected [47]. Furthermore, the authors showed that inhibition of the VSP34 expression led to a decrease of the DC capacity to present antigens from dying cells because knocking-down *VSP34* suppressed the mRNA and protein expression of TIM-4, a phosphatidylserine receptor dedicated to the phagocytosis of apoptotic cells. Thus, DC-specific *VPS34*-deficient mice presented an increase in the development of metastasis in response to B16 melanoma cell line inoculation. VPS34 therefore seemed to play a key role in the regulation of CD8 α^+ DCs homeostasis involved in cross-presentation of apoptotic cell-derived antigens to MHC-I restricted T cells [47].

Other works addressed the same question and gave opposite conclusions. It has been for instance demonstrated that $\alpha\text{Al}_2\text{O}_3$ nanoparticles coated with the OVA antigen, were able to induce OVA cross-presentation on MHC I in bone-marrow-derived dendritic cells in an autophagy-dependent manner. The involvement of autophagy was confirmed since OVA-coated nanoparticles were localized into LC3-positive autophagosomes when soluble OVA did not. Furthermore, autophagy inhibition decreased OVA presentation on MHC-I protein attested by a decrease of OVA-specific CD8 $^+$ T cell proliferation [49].

Autophagy in cross-presentation: Role in antigen donor cells

During cross-presentation, antigen comes from outside the dendritic cells which can internalize dying cells as antigen donors. Recent interesting results suggested an important role of autophagy in these dying viral infected cells as well as dying tumor cells for an optimal cross presentation in DC. Indeed, Li and colleagues [50] used a model of HEK 293T cells expressing a membrane-bound GFP-OVA antigen or a human melanoma cell line expressing gp100 as an endogenous tumor antigen. When autophagy in antigen-donor cell was stimulated by rapamycin or nutrient starvation before irradiation and incubation with DC, cross-presentation of these antigens by DCs was ameliorated as attested by a stronger specific CD8 $^+$ T cell stimulation [50]. The opposite effect was observed when the autophagy was inhibited in the antigen donor cells at the initiation step (using siRNA *Beclin 1*), at the formation of autophagosome (using siRNA *atg12*). Surprisingly, the blockade of the fusion step between autophagosomes and lysosomes, using NH_4Cl , increased also the cross-presentation suggesting that the antigen processing did not happen into the autolysosome [50].

To investigate the role of different cell death types on the efficiency of cross priming, two antigen donor cell lines have been established. In one Murine Embryonic Fibroblast (MEF)

cell line, apoptosis was abolished by *Bax/Bak* gene expression invalidation when the wild type MEF cell line. The cells were then infected with an Influenza virus and killed by a genotoxic UV-B stress [51]. Indeed, wild type MEFs died by apoptosis when *Bax*⁻/*Bak*⁻ MEFs died by programmed cell death type II (autophagy). Nine days after *in vivo* immunization, there were more Influenza-restricted CD8⁺ T cells within the lymph nodes of mice immunized with *Bax*⁻/*Bak*⁻ MEFs than with wild-type MEF. This suggested that an antigen donor cell dying by autophagy was more efficient to induce cross-priming in DC. The need for autophagy was clearly assessed since *Atg5* deletion in donor cells significantly reduced priming by DCs [51]. Thus, autophagy can be indirectly involved in the processing and presentation of antigens in MHC-I molecules by giving antigens to DCs for the priming and stimulation of specific CD8⁺ T cells but the mechanism still needs to be further investigated.

Autophagy and presentation of tumor antigens

We have previously highlighted, that autophagy plays a primordial role in endogenous and exogenous antigen processing for both MHC-I and II presentation. So, this process is also probably important for cancer immune surveillance and tumor cell elimination by CD8⁺ and CD4⁺ T cells.

Autophagy in MHC-II presentation of tumor antigens

Macroautophagy could indeed play a role for the processing and presentation of tumor antigen-derived peptides by MHC-II molecules. For example, MUCINE 1 (MUC1), a protein normally expressed at the cell surface of epithelial cells, was described to be upregulated in tumor cells in human acute myeloid leukemia [52] and breast cancer [53]. Dörfel and collaborators demonstrated [54], in a model of human monocyte-derived DCs transfected with the *Muc1* mRNA, that MUC1 protein processing involved TAP-dependent and TAP-independent processes and implicated the proteasome as well as the endosomal lysosomal compartment. Inhibition of autophagy, using 3-MA or Wortmannin treatment decreased the capacity of dendritic cells to present the tumor-associated antigenic peptides on MHC-II molecules to MUC1-specific CD4⁺ T cells. At the same time CD8⁺ T cell response to MUC1 derived peptide was unchanged [54]. Other melanoma tumor antigen-derived peptides such as MAGE-3 [55], Melan-A [56], Melan-A/MART-1 [57] and gp100 [58] have also been described as proteins presented by the MHC-II molecules in APCs or melanoma cells to induce specific-CD4⁺ T cell response. Nevertheless, the contribution of ATG proteins and autophagy in the melanoma antigen processing has not yet been investigated.

Autophagy in cross-presentation: Role in tumor cells as antigen donor cells

As previously described in OVA-expressing HEK 293T cells and melanoma cells used as antigen donors, activation of autophagy in HEK 293T or tumor cells was essential for a more efficient cross-presentation by dendritic cells [50]. Li and collaborators [50] proposed that tumor antigen-containing autophagosomes of the donor cells could be used as good carriers for tumor antigen delivery to DCs. To prove their theory, they purified autophagosomes from HEK 293T cells which were pretreated with NH₄Cl to block the fusion between autophagosome and lysosome. DCs incubated with purified autophagic vesicles

were then able to stimulate OVA-specific CD8⁺ T cells and autophagosomes isolated from melanoma cells were also able to induce a CD8⁺ response against the tumor gp100 antigen. Altogether, these data suggested that purified autophagosomes could be presented as good candidates for cancer vaccination [50] (Fig. 2). In another study, the same group had shown that the vitamin E analog alpha-tocopheryloxyacetic acid (α -TEA) primarily described as an inducer of tumor cell apoptosis, stimulated autophagy as well and enhanced cross-presentation of tumor antigens to dendritic cells. Furthermore, it has been shown that α -TEA stimulated tumor cells were able to release double-membrane structure vesicles in their culture medium and high levels of LC3B-II were detected in these vesicles by immunoblot analysis indicating their autophagosome origin. These vesicles called α -TAGS for α -TEA-derived autophagosome-enriched supernatant from α -TEA-stimulated OVA-expressing tumor cells were able to deliver the OVA antigen to DC to induce *in vitro* a strong CD8⁺ T cell response.

Proteasome degradation is generally linked to the degradation of short-lived proteins (SLiPs) or defective ribosomal products (DRiPs) when autophagy has been described to be more dedicated to degradation of long-lived proteins. However, it has been proposed and shown that, when the proteasome was inhibited by the proteasome inhibitor Bortezomib, SLiPs as well as DRiPs would aggregate and be targeted for degradation by the autophagy pathway [59]. Indeed, the analysis of autophagosome obtained from cancer cells treated with both proteasome and lysosome inhibitors showed that ubiquitinated SLiPs and DRiPs proteins colocalized with LC3B [60]. Moreover, the delivery of ubiquitinated proteins to autophagosomes was dependent of the specific p62 receptor which connects ubiquitinated proteins to LC3B [61]. Many autophagosomes accumulated into the cytoplasm of cancer cells treated with an inhibitor and these vesicles stored long-lived as well as short-lived proteins as well as ubiquitinated proteins. Furthermore, these vesicles were also liberated into the culture medium under prolonged inhibitor treatment and called "DRiPs containing autophagosomes-rich blebs" (DRibbles) [60,62] (Fig. 2A). Furthermore, in addition to DRiPs and SLiPs, DRibbles expressed damage associated molecular pattern (DAMP) including HSP90, HSP94, calreticulin and HMGB1. Thus, these autophagosomes which contain DAMP molecules can be released and could enhanced the efficacy of vaccination with DRibbles [60]. The DRibbles from inhibitor-treated cancer cells were enriched in a broader spectrum of cellular antigens compared to natural DRibbles coming from untreated cells.

The mechanism by which DRibbles are internalized into DC is not yet completely elucidated. First evidences showed that DRibbles expressed high levels of the CLEC9A ligand on their membrane. The C-type lectin receptor CLEC9A has been described to be involved in the capture of necrotic cells and in the presentation of antigens by a sub-population of DCs competent for cross-presentation. However, the mechanism by which antigens present inside the autophagosomes colocalized in dendritic cells with empty MHC-I molecules is not completely elucidated. Li and collaborators [60] suggested that DRibbles could enter the cells through caveolae or a clathrin-dependent endocytosis and that CLEC9A could drive DRibbles antigens to the nonacidic endosomal compartment for cross-presentation in DCs. Subsequently, the antigens could escape the endosomal compartment toward the cytosol through an ERAD-like machinery, be ubiquitinated and cleaved by the proteasome [60]. Another possibility is that inner autophagosomes are probably endocytosed by dendritic cells and end up in late endosomes/MIIC compartments (Fig. 2B). Active MHC-I molecules which were

found in the vacuolar pathway [63] could be constitutively recycled from the cell surface and received a new peptide into the MIIC/late endosomal compartment [64]. So, peptides created in the autophagy pathway or in the endocytic pathway could be bound to empty MHC-I molecules in this compartment and transported back to the cell surface to activate T cells.

DRibbles were also produced from different cancer cell lines and proposed to DCs for cross-presentation in order to induce a CD8⁺ T cell immune response. Indeed, *in vitro* proliferation of CD8⁺ T cells was observed when these cells were co-cultured with DRibbles-primed DCs. Besides inducing a potent T lymphocyte response, DRibbles are also involved in the innate immune response. They triggered multiple pattern recognition receptors like TLR2, 4, 7 and 8 and intracellular NOD2 receptor to induce pro-inflammatory cytokines expression (including TNF- α , IL-6, IL-10, and IL- β) and maturation. They led to the NLRP3 inflammasome activation by providing first and second signals required for IL-1 β production by peripheral blood mononuclear cells [65].

Taking together, these data confirmed that autophagosomes coming from antigen donor cells were a good vehicle for tumor antigen delivery to dendritic cells for cross-presentation.

Autophagy and mediating antigen presentation for immunotherapy

The purpose of an immunotherapy protocol is to help the natural immune system to fight and eliminate cancer cells. Different types of immunotherapies are used: antibody targeting immune checkpoint inhibitors, adoptive cell transfer therapy, monoclonal antibodies, therapeutic vaccines and immune system modulators. In this paragraph we will discuss the potential use of autophagy to modulate antigen presentation in cancer cells and in antigen presenting cells following vaccine, chemotherapy and radiotherapy protocols.

Autophagosome-enriched vesicle fractions or DRibble vaccines

As previously described, DCs pulsed with α -TEA-derived autophagosome-enriched supernatant were able to deliver the OVA antigen to DCs to induce a strong CD8⁺ T cell response *in vitro*. Interestingly, *in vivo* immunization of BALB/c mice using DCs pulsed with these α -TAGS reduced lung metastasis and improved the survival of mice bearing 4T1 murine mammary tumors thanks to enhanced CD8⁺ T cells priming. This effect was reversed when tumor cells were treated with 3-MA or *Atg12* shRNA proving the crucial role of autophagosome formation in cross-presentation by DCs [66]. So, the release of vesicles coming from antigen donor cells could be favored following the induction of autophagy. These data therefore suggested that α -TEA chemotherapy could become a new strategy to generate tumor-associated antigens and induce cross-presentation by DCs and enhance the immune response against tumor cells [66].

It has also previously been shown that tumors cells treated with inhibitors of proteasome and inhibitors of autophagosome lysosome fusion released autophagosome-derived vesicles containing tumor antigens in the culture medium. DRibbles were presented as good candidates for anti-tumor vaccine by delivering tumor antigens *via* autophagosomes to DCs. Indeed, when mice bearing 3LL tumors received a subcutaneous injection of DCs which were

pulsed with 3LL-derived DRibbles, a delay of tumor growth and a significant amelioration of the mice survival could be observed compared to untreated mice or mice treated with unloaded DCs. Moreover, when mice were vaccinated with DC-pulsed with 3LL-DRibbles in the presence of IFN- γ and poly-[IC] adjuvant, the efficacy of vaccine was greatly improved. Indeed, 5 out of 6 vaccinated mice survived more than 80 days. Furthermore, mice intravenously inoculated with 3LL tumor cells, were subsequently vaccinated to evaluate the formation of metastasis. Vaccination with 3LL-derived-DRibble pulsed-DCs strongly reduced metastasis number as compared to no vaccination or vaccination with unloaded DCs. Moreover, DCs loaded with DRibbles gave better efficiency than DCs loaded with dead cells or cell lysates. On the basis of these findings, Li and collaborators proposed that Dribble-linked vaccines could be a promising clinical approach to treat patients with non-small cell lung carcinoma or breast cancer [60].

In a different study, Twitty and collaborator [61], used a model of 3-methylcholanthrene (MCA)-induced sarcomas to compare the efficiency of mice vaccination with whole cells of MCA-induced sarcomas or with DRibble-derived from those tumors. DRibbles were produced from tumor cells treated with bortezomib (Velcade) and NH₄Cl. Vaccination with irradiated whole cells elicited an immune response against homologous sarcomas but failed to elicit an immune response against non-homologous MCA-derived sarcomas. On the opposite, vaccination with DRibble-derived from one MCA-induced sarcoma gave a protection against this homologous sarcoma but also against the other non-homologous sarcomas. Nevertheless, vaccination with DRibble-derived from a MCA-induced sarcoma was not able to produce an immune response against other cell lines like for example B16-melanomas and primary kidney cells. The authors also showed that a Bortezomib (Velcade) treatment stabilized ubiquitinated SLiPs which were delivered into the autophagosomes by the p62 cargo adaptor. The immune response generated by vaccination with DRibbles was directed against the ubiquitinated SLiPs. As a matter of fact, a pretreatment of cells with an inhibitor of protein synthesis before the treatment with the proteasome inhibitor limited the production of SLiPs and, under these conditions, Dribbles failed to induce a protection. SLiPs were then the common source of antigens between every independent sarcomas [61].

An efficient therapeutic vaccination is based on a strong T response which can be induced if tumor cells are highly mutated and if tumors are infiltrated by T cells recognizing these neoepitopes. Most of the tumors failed to induce such a strong response. Furthermore, tumors themselves are able to down regulate the tumor-infiltrating T cell immune response. This is the reason why a combinational immunotherapy using allogeneic-DRibbles and anti-OX40 co-stimulatory receptor antibodies was used in mice bearing 4T1 mammary carcinoma. OX40 is a receptor belonging to the TNF receptor family and is expressed in stimulated T cells but not in naïve T cells. The combination of DRibbles and OX40 agonist antibodies led to enhanced priming of T-cells, robust proliferation, expansion and differentiation into memory and effector T cells associated with tumor regression [67].

Another immune effect of DRibbles has been observed on B cell-induced immune responses. Indeed, intravenous injection of DRibbles produced by the murine hepatoma cell line Hep1-6 induced a better *in vivo* response than injection of whole tumor cell lysates in term of B cell activation and proliferation, Hep1-6 specific antibody production and cytokine secretion. Furthermore, Dribble-stimulated B cells were able to capture DRibbles antigens to process and present peptides in order to directly reactivate effector T cells. The B cell

responses relied on the content of proteins in DRibbles and was induced in a TLR2-MyD88 dependent manner [68].

In the previously mentioned work, DRibbles were produced from antigen-donor tumor cells treated either with an autophagy inducer or with a proteasome inhibitor and an autophagosome/lysosome fusion inhibitor. However, it has been shown that tumor cells were able to produce Tumor cell-Released AutoPhagosomes (TRAPs) under natural situation without any inhibitor and these TRAPs promote immunosuppression. As a matter of fact, TRAPs could induce B cell differentiation into B regulators producing the IL-10 cytokine which has an immunosuppressive activity on T cells [69]. TRAPs isolated from the B16-F10 melanoma cell line were added to the culture medium of bone-marrow-derived macrophages leading to the differentiation of these macrophages into a suppressive M2 phenotype characterized by a decrease of MHC-II protein expression and absence of co-stimulatory protein CD86 in a TLR4-MyD88 dependent way. Moreover, TRAPs upregulated the check point inhibitory protein Programmed Cell Death (PD1)-ligand PD-L1 in these macrophages. Furthermore, M2 macrophages produced the immunosuppressive IL-10 cytokine but not the inflammatory cytokines [70].

TRAPs, α -TAGSs and DRibbles may differ from each other in their antigen content suggesting that the use of inhibitors or autophagy inducers might be crucial. Nevertheless, further investigations will be needed to elucidate the differences in the molecular contents of these autophagy-derived vesicles to define the best strategy of vaccination.

DNA based vaccines

It has been shown in different studies that autophagy could enhance presentation to CD4⁺ and CD8⁺ T cells. However, these previous works we reported mainly studied cross-presentation of exogenous antigens for an anti-tumor CD8⁺ T cell immune response. Promoting a CD4⁺ T cell response could greatly ameliorate an anti-tumor defense since CD4⁺ T cells could induce cytotoxic mechanisms but also could enhance natural killer or CD8⁺ T cell activities. To address endogenous antigens to autophagosomes, a novel DNA-based vaccine was proposed. M199 human melanoma cells were transfected with a plasmid expressing a fusion protein composed of the ATG8/LC3B and the C terminus end of NY-ESO-1. NY-ESO-1 for New York Esophageal Squamous cell carcinoma is a cancer-testis antigen also expressed in various cancer types. It was observed that NY-ESO-1 fused with LC3B underwent an enhanced lysosomal processing through the autophagy pathway and an efficient targeting into the class II loading compartment. The NY-ESO-1₁₅₇₋₁₇₀ epitope was 5- to 10-fold more presented to MHC-II-restricted CD4⁺ T cells when linked to LC3B than the NY-ESO-1 epitope alone. M199 melanoma cells expressing the fusion protein also sustained a higher CD4⁺ T cell activation *in vitro* attested by a stronger IFN- γ production [71].

Using a similar strategy, HIV antigens fused with LC3B were more addressed to autophagosomes in dendritic cells leading to improved HIV-specific CD4⁺ T cell activity [72]. Instead of LC3B, the selective autophagy cargo adaptor p62 was also fused with the Gag p24 HIV antigen resulting in the generation of Gag p24-Specific CD4⁺ and CD8⁺ T cells *in vivo* [73]. We can then hypothesize that the other members of the ATG8 family such as GABARAP or GABARAPL1, or other selective autophagic receptors such as NIX or NDP52 could be used to design DNA-based vaccines to target efficiently antigens to autophagosomes.

A short peptide called “viral inducer of protein aggregation (VIPA)” translated from a sequence located in the middle region of the *ICP10* gene of Herpes simplex virus 2 has been shown to be able to aggregate proteins. Then, VIPA could be another good candidate to address antigen to autophagosomes through the aggrephagy pathway. A fusion protein between GFP, a surrogate tumor antigen OVA and VIPA has been produced in B16 melanoma cells. GFP fluorescent aggregates were detected in B16 cells and colocalized with OVA indicated that OVA antigen was located in aggresome structures. The presence of VIPA could efficiently address the OVA antigen to the lysosomal degradation pathway. Mice were then vaccinated with irradiated B16 cells which were previously transfected with either the VIPA-OVA or OVA expression plasmids. The processing of OVA antigen aggregates led to CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte proliferation and to a decrease of tumor growth in mice bearing B16-OVA melanoma cells [74].

Taken together, these studies suggested that the use of ATG8 proteins, cargo adaptors or aggregate inducers could become a good strategy to target tumor antigens into autophagosomes of DCs by DNA-based vaccine and to enhance CD4⁺ T cells response and CD8⁺ cytotoxic activation in immunotherapy.

Autophagy treatments to increase immunotherapy sensitivity through increased antigen presentation

Radiotherapy has been described to enhance the immune response leading to the hypothesis that the association between radiotherapy and immunotherapy could be a promising strategy to decrease tumor cell proliferation. During radiotherapy, the choice of the dose of radiation influences the response of patients to immunotherapy and Zeng and collaborators [75] reported that radiotherapy induced autophagy. In this study, A549 and H1975 cells were transfected with mCherry-GFP-LC3B expression plasmid and irradiated with different doses of radiation and the autophagy flux was monitored using fluorescence microscopy to detect the number of autophagosomes and autolysosomes. This experiment was completed with the study of LC3B-II levels and p62 degradation by immunoblotting. All the findings confirmed that radiotherapy indeed induced autophagy flux. Moreover, the authors observed that dose of radiation increased the expression of MHC-I molecules in A549 and H1975 tumor cells. Interestingly, the strongest autophagy induction and higher MHC-I expression were obtained with a single radiation dose of 20 Gy. On the other hand, it has been shown that inhibition of autophagy using chloroquine reversed MHC-I molecules expression in A549 and H1975 tumor cells. Furthermore, immunochemistry studies performed in NSCLC cell patients showed a strong correlation between MHC-I expression and CD8⁺ T cell infiltration. This increased CD8⁺ T cell infiltration should lead to a better response to immunotherapy [75]. Therefore, a combination of radiotherapy and immunotherapies using both immune checkpoint inhibitors such as anti-CTLA4 and anti-PD1/PD-L1 (PD1 ligand) could optimize the immune response in cancer therapies. Twyman-Saint Victor and collaborators [76] showed in a B16-F10 melanoma mouse tumor model that the combination between radiotherapy and an anti-CTLA4 antibody treatment promoted the regression of irradiated and non-irradiated tumors in mice. However, a resistance to the treatment was observed and induced an upregulation of PD-L1 expression in tumor cells leading to T cell-exhaustion. Addition of an anti-PD-L1 could therefore reinvigorate exhausted T cells and improve the

response to radiotherapy and anti-CTLA4 treatment. Thus, this combination of irradiation, anti-CTLA4 and anti-PD-L1 in clinical trials could be promising to obtain an optimal response against cancer in patients [76].

Conclusion

Autophagy is involved in several biological processes, including cell survival/death, proliferation, differentiation and tumorigenesis. In this chapter, we reported data which showed the role of autophagy in the antigen processing and presentation on both MHC-I and II complexes but the role of autophagy in cancer still remains unclear and controversial. Indeed, autophagy is able to suppress tumorigenesis at the early stages of tumor development and can be considered as an anti-tumoral process [77]. During the later stages of tumor progression, autophagy can play a pro-tumoral role by providing energy and nutrients to tumor cells and therefore promote cell survival. Nowadays, clinical trials or therapeutic treatments are based on both autophagy inducers (i.e., varinostat treatment in acute myeloid leukemia [78], varinostat and temsirolimus in mantle cell lymphoma [79]) or autophagy inhibitors (i.e., hydroxychloroquine in breast cancer [80]).

Autophagy may also contribute directly to antigen processing and presentation on MHC molecules in DCs to induce an optimal immune anti-tumor response. Autophagy activation in antigen-bearing tumor cells can induce the release of autophagosome-derived vesicles containing tumor antigens and it has been shown that the capture of these vesicles by APCs greatly enhanced the immune response. Therefore, systemic injection of autophagy inhibitors could lead to the inhibition of the anti-cancer immune response. Taken together, these data make it hard to predict how autophagy should be modulated *in vivo* for the better outcome of patients. But, it seems clear that every approach which would induce the recruitment of tumor-specific antigens into autophagosomes to later use autophagosomes-derived vesicles in therapeutic vaccination should give promising results, used alone or in combination with other therapeutic strategies. Nevertheless, further experiments will first be needed to better characterize how these vesicles are internalized by DCs and their molecular contents before planning to use them in therapeutic treatments.

Acknowledgments

We would like to thank the editors and reviewers of this work. We especially thank Professor Salem Chouaib to invite us and give us the opportunity to write this book chapter.

References

- [1] Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2010;22(2):124–31.
- [2] Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z. Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol* 2012;22(1):R29–34.
- [3] Feng Y, He D, Yao Z, Klionsky DJ. The machinery of macroautophagy. *Cell Res* 2014;24(1):24–41.
- [4] Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* 2007;9(10):1102–9.
- [5] Pellerin I, Vuillermoz C, Jouvenot M, Ordener C, Royez M, Adessi GL. Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured Guinea-pig endometrial cells. *Mol Cell Endocrinol* 1993;90(2):R17–21.

- [6] Nakatogawa H. Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy. *Essays Biochem* 2013;55:39–50.
- [7] Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, Noda T, Ohsumi Y. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 2000; 408(6811):488–92.
- [8] Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J* 2000;19(21):5720–8.
- [9] Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T. LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* 2004;117(Pt 13):2805–12.
- [10] Chakraborty FZ, Seguin-Py S, Le Grand JN, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Despouy G, Perez V, Jouvenot M, Boyer-Guittaut M. GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* 2010;6(4):495–505.
- [11] Johansen T, Lamark T. Selective autophagy: ATG8 family proteins, LIR motifs and cargo receptors. *J Mol Biol* 2019;432(1):80–103.
- [12] Pankiv S, Clausen TH, Lamark T, Brech A, Bruun J-A, Outzen H, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy. *J Biol Chem* 2007;282(33):24131–45.
- [13] Zheng YT, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell JH. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *J Immunol* 2009;183(9):5909–16.
- [14] Kirkin V, Lamark T, Sou Y-S, Bjørkøy G, Nunn JL, Bruun J-A, Shvets E, McEwan DG, Clausen TH, Wild P, Bilusic I, Theurillat J-P, Øvervatn A, Ishii T, Elazar Z, Komatsu M, Dikic I, Johansen T. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates. *Mol Cell* 2009;33(4):505–16.
- [15] Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, Rogov V, Löhr F, Popovic D, Occhipinti A, Reichert AS, Terzic J, Dötsch V, Ney PA, Dikic I. Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* 2010;11(1):45–51.
- [16] Tekirdag K, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy and endosomal microautophagy: joint by a chaperone. *J Biol Chem* 2018;293(15):5414–24.
- [17] Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2018; 19(6):365–81.
- [18] Massey AC, Zhang C, Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr Top Dev Biol* 2006;73:205–35.
- [19] Blum JS, Wearsch PA, Cresswell P. Pathways of antigen processing. *Annu Rev Immunol* 2013;31(1):443–73.
- [20] Cruz FM, Colbert JD, Merino E, Kriegsmann BA, Rock KL. The biology and underlying mechanisms of cross-presentation of exogenous antigens on MHC-I molecules. *Annu Rev Immunol* 2017;35(1):149–76.
- [21] Bevan MJ. Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 1976;143(5):1283–8.
- [22] Ji Q, Castelli L, Goverman JM. MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by tip-DCs that promote determinant spreading to CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* 2013;14(3):254–61.
- [23] Trombetta ES, Mellman I. Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 2004; 23(1):975–1028.
- [24] Suri A, Walters JJ, Rohrs HW, Gross ML, Unanue ER. First signature of islet beta-cell-derived naturally processed peptides selected by diabetogenic class II MHC molecules. *J Immunol* 2008;180(6):3849–56.
- [25] Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, Müller M, Kreymborg K, Altenberend F, Brandenburg J, Kalbacher H, Brock R, Driessen C, Rammensee H-G, Stevanovic S. Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(22):7922–7.
- [26] Schmid D, Pypaert M, Münz C. MHC class II antigen loading compartments continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* 2007;26(1):79–92.
- [27] Kasai M, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Seki S, Ikeda T, Mizuochi T. Autophagic compartments gain access to the MHC class II compartments in thymic epithelium. *J Immunol* 2009;183(11):7278–85.
- [28] Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, Mizushima N, Klein L. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* 2008;455(7211):396–400.
- [29] Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T, Münz C. Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science* 2005;307(5709):593–6.

- [30] Nimmerjahn F, Milosevic S, Behrends U, Jaffee EM, Pardoll DM, Bornkamm GW, Mautner J. Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol* 2003; 33(5):1250–9.
- [31] Riedel A, Nimmerjahn F, Burdach S, Behrends U, Bornkamm GW, Mautner J. Endogenous presentation of a nuclear antigen on MHC class II by autophagy in the absence of CRM1-mediated nuclear export. *Eur J Immunol* 2008;38(8):2090–5.
- [32] Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI, Deretic V. Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and *Mycobacterium tuberculosis* survival in infected macrophages. *Cell* 2004;119(6):753–66.
- [33] Jagannath C, Lindsey DR, Dhandayuthapani S, Xu Y, Hunter RL, Eissa NT. Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. *Nat Med* 2009;15(3):267–76.
- [34] Saini NK, Baena A, Ng TW, Venkataswamy MM, Kennedy SC, Kunnath-Velayudhan S, Carreño LJ, Xu J, Chan J, Larsen MH, Jacobs WR, Porcelli SA. Suppression of autophagy and antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS47. *Nat Microbiol* 2016;1(9):16133.
- [35] Zhou D, Li P, Lin Y, Lott JM, Hislop AD, Canaday DH, Brutkiewicz RR, Blum JS. Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* 2005;22(5):571–81.
- [36] Pérez L, McLetchie S, Gardiner GJ, Deffit SN, Zhou D, Blum JS. LAMP-2C inhibits MHC class II presentation of cytoplasmic antigens by disrupting chaperone-mediated autophagy. *J Immunol* 2016;196(6):2457–65.
- [37] Lee HK, Mattei LM, Steinberg BE, Alberts P, Lee YH, Chervonsky A, Mizushima N, Grinstein S, Iwasaki A. In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. *Immunity* 2010;32(2):227–39.
- [38] Romao S, Gasser N, Becker AC, Guhl B, Bajagic M, Vanoaica D, Ziegler U, Roesler J, Dengjel J, Reichenbach J, Münz C. Autophagy proteins stabilize pathogen-containing phagosomes for prolonged MHC II antigen processing. *J Cell Biol* 2013;203(5):757–66.
- [39] Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SWG, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, Komatsu M, Tanaka K, Cleveland JL, Withoff S, Green DR. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 2007;450(7173):1253–7.
- [40] Martinez J, Cunha LD, Park S, Yang M, Lu Q, Orchard R, Li Q-Z, Yan M, Janke L, Guy C, Linkermann A, Virgin HW, Green DR. Noncanonical autophagy inhibits the auto-inflammatory, lupus-like response to dying cells. *Nature* 2016;533(7601):115–9.
- [41] Henault J, Martinez J, Riggs JM, Tian J, Mehta P, Clarke L, Sasai M, Latz E, Brinkmann MM, Iwasaki A, Coyle AJ, Kolbeck R, Green DR, Sanjuan MA. Noncanonical autophagy is required for type I interferon secretion in response to DNA-immune complexes. *Immunity* 2012;37(6):986–97.
- [42] Loi M, Müller A, Steinbach K, Niven J, Barreira da Silva R, Paul P, Ligeon L-A, Caruso A, Albrecht RA, Becker AC, Annaheim N, Nowag H, Dengjel J, García-Sastre A, Merkler D, Münz C, Gannagé M. Macroautophagy proteins control MHC class I levels on dendritic cells and shape anti-viral CD8(+) T cell responses. *Cell Rep* 2016;15(5):1076–87.
- [43] Conner SD, Schmid SL. Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 2002;156(5):921–9.
- [44] English L, Chemali M, Duron J, Rondeau C, Laplante A, Gingras D, Alexander D, Leib D, Norbury C, Lippé R, Desjardins M. Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol* 2009;10(5):480–7.
- [45] Tey S-K, Khanna R. Autophagy mediates transporter associated with antigen processing-independent presentation of viral epitopes through MHC class I pathway. *Blood* 2012;120(5):994–1004.
- [46] Budida R, Stankov MV, Döhner K, Buch A, Panayotova-Dimitrova D, Tappe KA, Pohlmann A, Sodeik B, Behrens GMN. Herpes simplex virus 1 interferes with autophagy of murine dendritic cells and impairs their ability to stimulate CD8+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 2017;47(10):1819–34.
- [47] Parekh VV, Pabbisetty SK, Wu L, Sebzda E, Martinez J, Zhang J, Kaer LV. Autophagy-related protein Vps34 controls the homeostasis and function of antigen cross-presenting CD8 α + dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci* 2017;114(31):E6371–80.
- [48] Backer JM. The regulation and function of class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* 2008;410(1):1–17.
- [49] Li H, Li Y, Jiao J, Hu H-M. Alpha-alumina nanoparticles induce efficient autophagy-dependent cross-presentation and potent antitumour response. *Nat Nanotechnol* 2011;6(10):645–50.
- [50] Li Y, Wang L-X, Yang G, Hao F, Urba WJ, Hu H-M. Efficient cross-presentation depends on autophagy in tumor cells. *Cancer Res* 2008;68(17):6889–95.

- [51] Uhl M, Kepp O, Jusforgues-Saklani H, Vicencio J-M, Kroemer G, Albert ML. Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8+ T cells. *Cell Death Differ* 2009; 16(7):991–1005.
- [52] Liu S, Yin L, Stroopinsky D, Rajabi H, Puissant A, Stegmaier K, Avigan D, Kharbanda S, Kufe D, Stone R. MUC1-C oncoprotein promotes FLT3 receptor activation in acute myeloid leukemia cells. *Blood* 2014;123(5):734–42.
- [53] Rahn JJ, Dabbagh L, Pasdar M, Hugh JC. The importance of MUC1 cellular localization in patients with breast carcinoma: an immunohistologic study of 71 patients and review of the literature. *Cancer* 2001;91(11): 1973–82.
- [54] Dörfel D, Appel S, Grünebach F, Weck MM, Müller MR, Heine A, Brossart P. Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA. *Blood* 2005;105(8):3199–205.
- [55] Chaux P, Vantomme V, Stroobant V, Thielemans K, Corthals J, Luiten R, Eggermont AMM, Boon T, van der Bruggen P. Identification of MAGE-3 epitopes presented by HLA-DR molecules to CD4+ T lymphocytes. *J Exp Med* 1999;189(5):767–78.
- [56] Godefroy E, Scotto L, Souleimanian NE, Ritter G, Old LJ, Jotereau F, Valmori D, Ayyoub M. Identification of two Melan-A CD4+ T cell epitopes presented by frequently expressed MHC class II alleles. *Clin Immunol* 2006;121(1):54–62.
- [57] Zarour HM, Kirkwood JM, Kierstead LS, Herr W, Brusci V, Slingluff CL, Sidney J, Sette A, Storkus WJ. Melan-A/MART-1(51-73) represents an immunogenic HLA-DR4-restricted epitope recognized by melanoma-reactive CD4(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(1):400–5.
- [58] Robila V, Ostankovitch M, Altrich-VanLith ML, Theos AC, Drover S, Marks MS, Restifo N, Engelhard VH. MHC class II presentation of gp100 epitopes in melanoma cells requires the function of conventional endosomes, and is influenced by melanosomes. *J Immunol* 2008;181(11):7843–52.
- [59] Li Y, Wang L, Pang P, Twitty C, Fox BA, Aung S, Urba WJ, Hu H-M. Cross-presentation of tumor associated antigens through tumor-derived autophagosomes. *Autophagy* 2009;5(4):576–7.
- [60] Li Y, Wang L-X, Pang P, Cui Z, Aung S, Haley D, Fox BA, Urba WJ, Hu H-M. Tumor-derived autophagosome vaccine: mechanism of cross-presentation and therapeutic efficacy. *Clin Cancer Res* 2011;17(22):7047–57.
- [61] Twitty CG, Jensen SM, Hu H-M, Fox BA. Tumor-derived autophagosome vaccine: induction of cross-protective immune responses against short-lived proteins through a p62-dependent mechanism. *Clin Cancer Res* 2011; 17(20):6467–81.
- [62] Yu G, Moudgil T, Cui Z, Mou Y, Wang L, Fox BA, Hu H-M. Ubiquitinated proteins isolated from tumor cells are efficient substrates for antigen cross-presentation. *J Immunother* 2017;40(5):155–63.
- [63] Mahmutefendić H, Blagojević G, Kučić N, Lučin P. Constitutive internalization of murine MHC class I molecules. *J Cell Physiol* 2007;210(2):445–55.
- [64] Kleijmeer MJ, Escola J-M, UytdeHaag FGCM, Jakobson E, Griffith JM, Osterhaus ADME, Stoorvogel W, Melief CJM, Rabouille C, Geuze HJ. Antigen loading of MHC class I molecules in the endocytic tract. *Traffic* 2001;2(2):124–37.
- [65] Xing Y, Cao R, Hu H-M. TLR and NLRP3 inflammasome-dependent innate immune responses to tumor-derived autophagosomes (DRibbles). *Cell Death Dis* 2016;7(8).
- [66] Li Y, Hahn T, Garrison K, Cui Z-H, Thorburn A, Thorburn J, Hu H-M, Akporiaye ET. The vitamin E analog alpha-TEA stimulates tumor autophagy and enhances antigen cross-presentation. *Cancer Res* 2012;72(14): 3535–45.
- [67] Yu G, Li Y, Cui Z, Morris NP, Weinberg AD, Fox BA, Urba WJ, Wang L, Hu H-M. Combinational immunotherapy with Allo-DRibble vaccines and anti-OX40 co-stimulation leads to generation of cross-reactive effector T cells and tumor regression. *Sci Rep* 2016;6:37558.
- [68] Li W, Zhou M, Ren H, Hu H-M, Lu L, Cao M, Wang L. Tumor-derived autophagosomes (DRibbles) induce B cell activation in a TLR2-MyD88 dependent manner. *PLoS ONE* 2013;8(1):e53564.
- [69] Zhou M, Wen Z, Cheng F, Ma J, Li W, Ren H, Sheng Y, Dong H, Lu L, Hu H-M, Wang L-X. Tumor-released autophagosomes induce IL-10-producing B cells with suppressive activity on T lymphocytes via TLR2-MyD88-NF- κ B signal pathway. *Onco Targets Ther* 2016;5(7).
- [70] Wen Z-F, Liu H, Gao R, Zhou M, Ma J, Zhang Y, Zhao J, Chen Y, Zhang T, Huang F, Pan N, Zhang J, Fox BA, Hu H-M, Wang L-X. Tumor cell-released autophagosomes (TRAPs) promote immunosuppression through induction of M2-like macrophages with increased expression of PD-L1. *J Immunother Cancer* 2018;6(1):151.

Liste des communications orales

Leïla Fonderflick, Elodie Lauret Marie-Joseph, Olivier Adotévi, Michael Boyer Guittaut, Pascale Adami and Régis Delage-Mourroux. **The role of autophagy and ATG8 proteins in MHC class I and II presentation of endogenous peptides.** (*INSERM U1098*), *Journées UMR1098, Fourmis de la recherche, Besançon, Novembre 2019.*

Leïla Fonderflick, Elodie Lauret Marie-Joseph, Olivier Adotévi, Michael Boyer Guittaut, Pascale Adami and Régis Delage-Mourroux. **The role of autophagy and ATG8 proteins on MHC class II presentation of endogenous peptides.** (*INSERM U1098*), *Forum des jeunes chercheurs. Dijon, Juin 2018.*

Leïla Fonderflick, Olivier Adotévi, Pascale Adami and Régis Delage-Mourroux. **Rôle de l'autophagie et des protéines ATG8 dans la présentation par le CMH de classe II, de peptides issus d'antigènes endogènes spécifiques de tumeurs.** (*EA 3922*) *Société de Biologie de Besançon, Décembre 2016.*

Liste des communications affichées

Leïla Fonderflick, Olivier Adotévi, Michaël Guittaut, Pascale Adami and Régis Delage-Mourroux. The role of macroautophagy and ATG8 proteins in MHC presentation of endogenous peptides. *Journées UMR1098, Fourmis de la recherche, Besançon, Novembre 2019 (Poster 1)*.

Leïla Fonderflick, Elodie Lauret Marie-Joseph, Olivier Adotévi, Michael Boyer Guittaut, Pascale Adami and Régis Delage-Mourroux. The role of autophagy and ATG8 proteins in MHC class I and II presentation of endogenous peptides. *Journées UMR1098, Fourmis de la recherche, Besançon, Novembre 2018 (Poster 2)*.

Leïla Fonderflick, Elodie Lauret Marie-Joseph, Olivier Adotévi, Michael Boyer Guittaut, Pascale Adami and Régis Delage-Mourroux. The role of autophagy and ATG8 proteins in MHC class I and II presentation of endogenous peptide derived from tumours. *Club francophone de l'autophagie (CFATG), Paris, Novembre 2017 (Poster 3)*.

Leïla Fonderflick, Elodie Lauret Marie-Joseph, Olivier Adotévi, Michael Boyer Guittaut, Pascale Adami and Régis Delage-Mourroux. The role of autophagy and ATG8 proteins in MHC class I and II presentation of endogenous peptide derived from tumours. *Journées UMR1098, Fourmis de la recherche, Besançon, Novembre 2017 (Poster 3)*.

Leïla Fonderflick, Elodie Lauret Marie-Joseph, Olivier Adotévi, Michael Boyer Guittaut, Pascale Adami and Régis Delage-Mourroux. Le rôle de l'autophagie et des protéines ATG8 dans la présentation par le CMH de classe I et II de peptides endogènes issus de tumeurs. *Forum des jeunes chercheurs. Dijon, Juin 2017 (Poster 4)*.

Leïla Fonderflick, Yahn Godet, Olivier Adotévi, Pascale Adami and Régis Delage-Mourroux. The role of ATG8 protein in MHC class II presentation of tumor derived antigen. *Oncotrans, Besançon, Janvier 2017 (Poster 5)*.

Leïla Fonderflick, Yahn Godet, Olivier Adotévi, Pascale Adami and Régis Delage-Mourroux. The role of ATG8 protein in MHC class II presentation of tumor derived antigen. *CFATG, Bordeaux, Octobre 2016 (Poster 5)*.

POSTER 1 :

The role of macroautophagy and ATG8 proteins in MHC presentation of
endogenous peptides

Leïla Fonderflick, Olivier Adotévi, Michaël Guittaut, Pascale Adami and Régis Delage-
Mourroux

Journées UMR1098, Fourmis de la recherche, Besançon, France

Novembre 2019

The role of macroautophagy and ATG8 proteins in MHC presentation of endogenous peptides

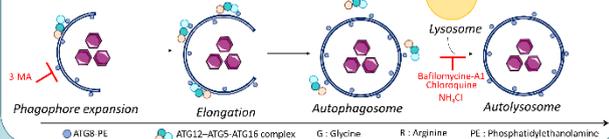
Leïla FONDERFLICK¹, Olivier ADOTEVI¹, Michael GUITTAUT¹, Pascale ADAMI¹ and Régis DELAGE-MOURROUX¹.

¹: Univ. Bourgogne Franche-Comté, INSERM, EFS BFC, UMR1098, Interactions Hôte-Greffon-Tumeur/Ingénierie Cellulaire et Génique, F-25000 Besançon, France

Introduction

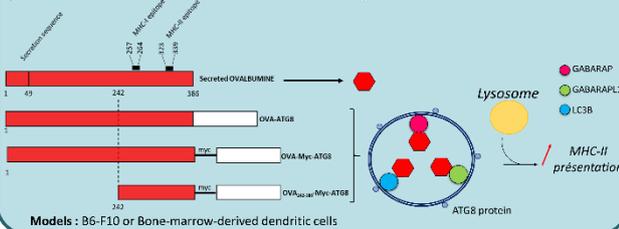
Macroautophagy is involved in MHC class I and II antigen presentation.

Molecular way of macroautophagy



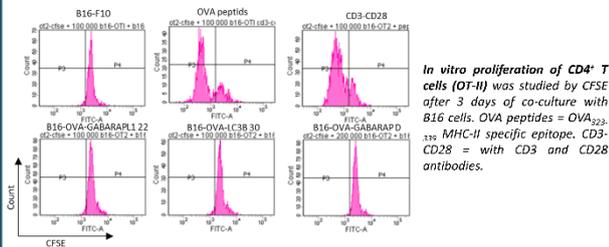
THE AIMS OF THIS STUDY ARE :

1. To target OVA antigen to autophagosome in order to increase antigen presentation on MHC-II and to generate antigen-specific CD4⁺ T cells,
2. To study the role of autophagosome formation involved ATG8 proteins (LC3B, GABARAP and GABARAP1) in antigen presentation.



Models : B6-F10 or Bone-marrow-derived dendritic cells

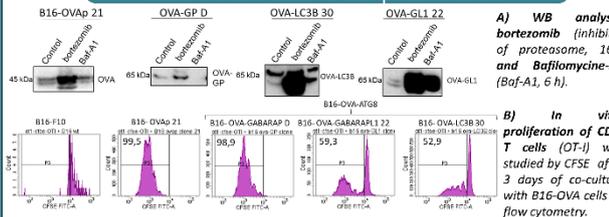
1 Overexpression of OVA-ATG8 in B16-F10 cells: CD4⁺ T cell proliferation



In vitro proliferation of CD4⁺ T cells (OT-II) was studied by CFSE after 3 days of co-culture with B16 cells. OVA peptides = OVA₂₂₃₋₃₃₉, OVA₃₂₃₋₃₃₉ MHC-II specific epitope. CD3-CD28 = with CD3 and CD28 antibodies. DC \emptyset = untransfected bmDC.

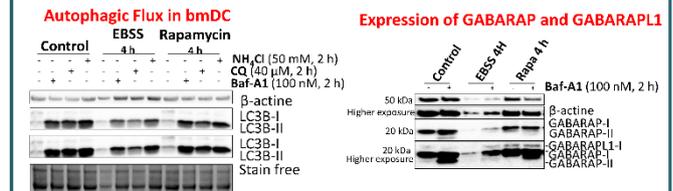
Conclusion : CD4⁺ T cells proliferation is unaffected by overexpression of OVA-ATG8 in B16-F10 cells

2 Overexpression of OVA-ATG8 in B16-F10 cells: CD8⁺ T cell proliferation

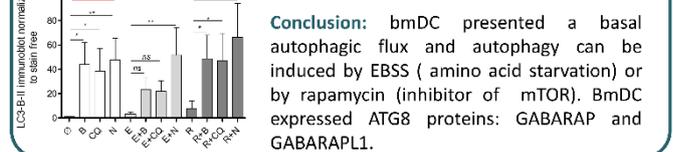


Conclusion : OVA-ATG8 proteins are highly degraded by proteasome (A) and B16-OVA-ATG8 can activate CD8⁺ T lymphocyte (OT-I) (B). Because highly degraded, OVA-ATG8 fusion proteins are probably no more disposable for autophagosome formation.

3 Autophagic Flux in bmDC and expression of GABARAP and GABARAP1

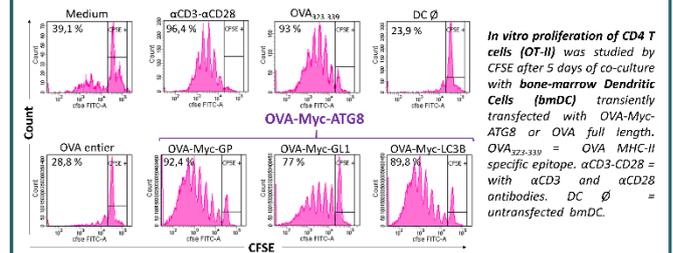


WB analysis of LC3B-II to determine the basal and induced autophagic flux in bmDC and expression of GABARAP and GABARAP1.



Conclusion: bmDC presented a basal autophagic flux and autophagy can be induced by EBSS (amino acid starvation) or by rapamycin (inhibitor of mTOR). BmDC expressed ATG8 proteins: GABARAP and GABARAP1.

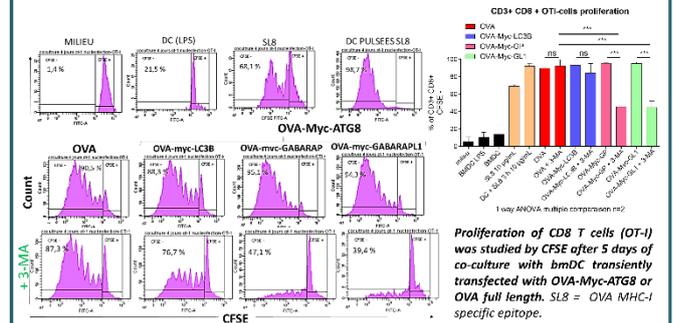
4 Overexpression of OVA-ATG8 in bmDC : CD4⁺ T cell proliferation



In vitro proliferation of CD4⁺ T cells (OT-II) was studied by CFSE after 5 days of co-culture with bone-marrow Dendritic Cells (bmDC) transiently transfected with OVA-Myc-ATG8 or OVA full length. OVA₂₂₃₋₃₃₉ = OVA MHC-II specific epitope. αCD3-CD28 = with αCD3 and αCD28 antibodies. DC \emptyset = untransfected bmDC.

Conclusion : CD4⁺ T cells proliferation is activated by overexpression of OVA-Myc-ATG8 in bone-marrow Dendritic Cells (n=1)

5 Overexpression of OVA-ATG8 in bmDC: CD8⁺ T cell proliferation



Conclusion : CD8⁺ T cells proliferation is activated by overexpression of OVA and OVA-Myc-ATG8 in bmDC but decreased when autophagy was blocked by 3-Méthyladenin in bmDC overexpressing OVA-Myc-ATG8 (n=2).

Perspectives

- 1 Overexpression of the different OVA-ATG8 in DC
- 2 Activation or inhibition of autophagy in OVA-ATG8 DC
- 3 Adoptive transfer of OVA-ATG8 DC in B16-OVA cells inoculated mice

POSTER 2 :

The role of autophagy and ATG8 proteins in MHC class I and II
presentation of endogenous peptides.

Leila Fonderflick, Elodie Lauret Marie-Joseph, Olivier Adotévi, Michael Boyer Guittaut,
Pascale Adami and Régis Delage-Mourroux

Journées UMR1098, Fourmis de la recherche, Besançon, France

Novembre 2018

The role of autophagy and ATG8 proteins in MHC class I and II presentation of endogenous peptides

PROJECT

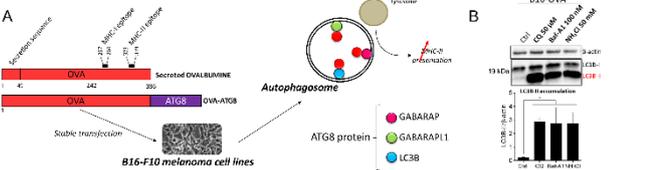
Autophagy is involved in MHC class I and II antigen presentation.

THE AIMS OF THIS STUDY ARE :

1. To target OVA antigen to autophagosome in order to increase antigen presentation on MHC-II and to generate antigen-specific CD4+ T cells,
2. To study the role of autophagosome formation involved ATG8 proteins (LC3B, GABARAP and GABARAPL1) in antigen presentation.

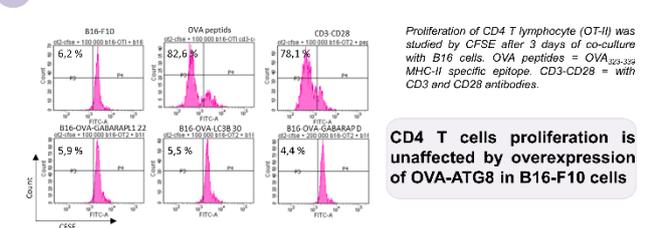
RESULTS

1. VALIDATION OF B16-F10 MODELS : CHARACTERIZATION OF AUTOPHAGIC FLUX

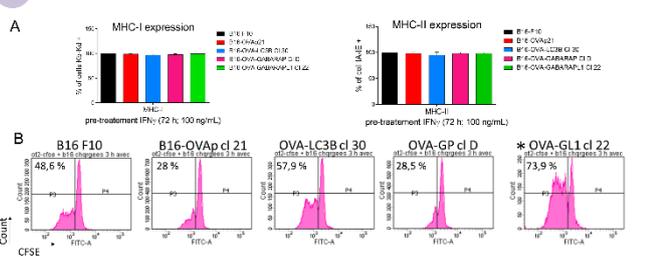


- Stable B16-F10 cell lines expressing OVA-LC3B, OVA-GABARAP and OVA-GABARAPL1 (A)
- High basal autophagic flux in B16-OVA cells (B) (Statistic test : One-way ANOVA : * : P<0,05) (n=6)
- No modification of basal or induced autophagic flux by OVA-ATG8 fusion protein overexpression

2. ARE B16-OVA-ATG8 CELLS ABLE TO ACTIVATE CD4 T CELLS ?

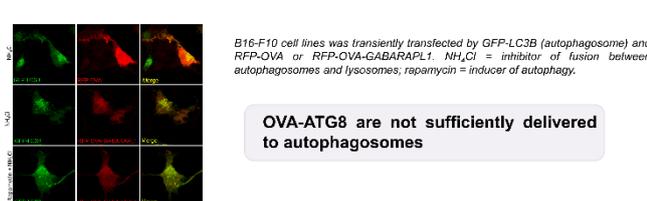


3. ARE B16-OVA-ATG8 ABLE TO PRESENT OVA ANTIGEN ?

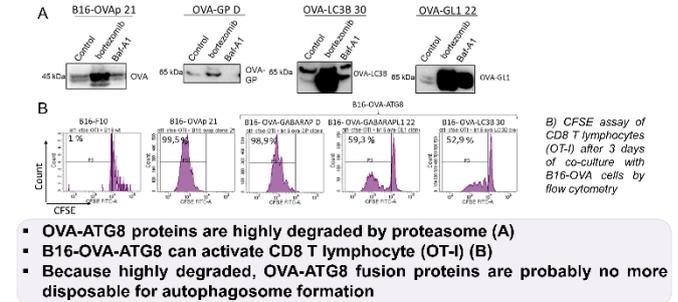


- CD4 T cells proliferation is unaffected by overexpression of OVA-Myc-ATG8 and OVA₂₄₂₋₃₈₆-Myc-ATG8 in B16-F10 cells (n=3)

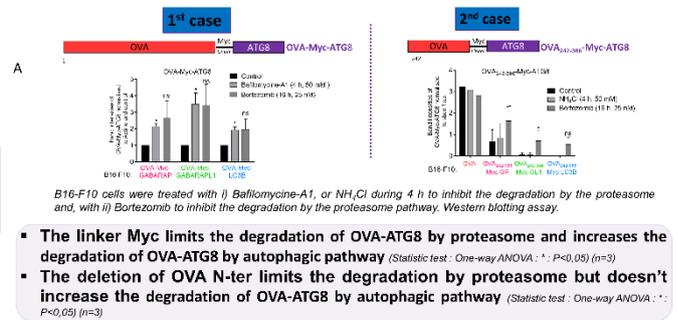
4. ARE OVA-ATG8 FUSION PROTEINS CORRECTLY DELIVERED INTO AUTOPHAGY PATHWAY ?



5. ARE OVA-ATG8 FUSION PROTEINS DEGRADED BY PROTEASOME MACHINERY ?

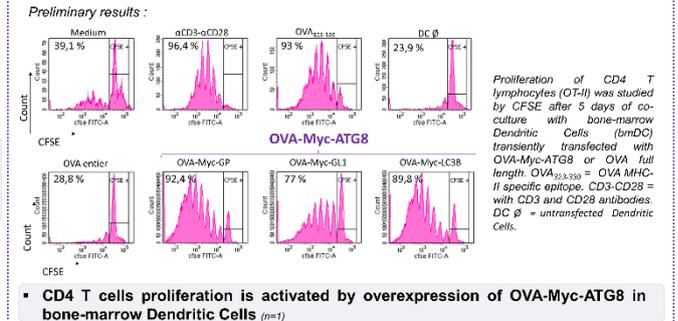


6. CAN WE MODIFY THE CONSTRUCTION OVA-ATG8 TO INCREASE AUTOPHAGOSOMES OVA TARGETING ?



- CD4 T cells proliferation is unaffected by overexpression of OVA-Myc-ATG8 and OVA₂₄₂₋₃₈₆-Myc-ATG8 in B16-F10 cells (n=3)

7. OVEREXPRESSION OF OVA-ATG8 IN BONE-MARROW DENDRITIC CELLS.



PERSPECTIVES

- 1: Overexpression of the different OVA-ATG8 in DC
- 2: Activation or inhibition of autophagy in OVA-ATG8 DC
- 3: Adoptive transfer of OVA-ATG8 DC in B16-OVA cells inoculated mice

A BETTER UNDERSTANDING OF THE ROLE OF ATG8 DURING ANTIGEN PRESENTATION COULD ALLOW US TO IMPROVE CD4 T CELL STIMULATION

POSTER 3 :

The role of autophagy and ATG8 proteins in MHC class I and II
presentation of endogenous peptide derived from tumours

Leila Fonderflick, Elodie Lauret Marie-Joseph, Olivier Adotévi, Michael Boyer Guittaut,
Pascale Adami and Régis Delage-Mourroux.

Club francophone de l'autophagie (CFATG). Paris, France et

Journées UMR1098, Fourmis de la recherche, Besançon

Novembre 2017

The role of autophagy and ATG8 proteins in MHC class I and II presentation of endogenous peptides

¹ INSERM UMR 1098, Interactions hôte-greffon-tumeur et ingénierie cellulaire et tissulaire, Université de Bourgogne Franche-Comté, Besançon F25000, France, ² CHRU de Besançon, service d'oncologie, Besançon, France

PROJECT

Autophagy is involved in MHC class I and II antigen presentation.

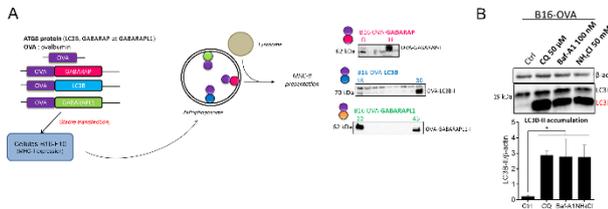
THE AIMS OF THIS STUDY ARE :

1. To target OVA antigen to autophagosome in order to increase antigen presentation on CMH-II and to generate antigen-specific CD4+ T cells,

2. To study the role of autophagosome formation involved ATG8 proteins (LC3B, GABARAP and GABARAPL1) in antigen presentation.

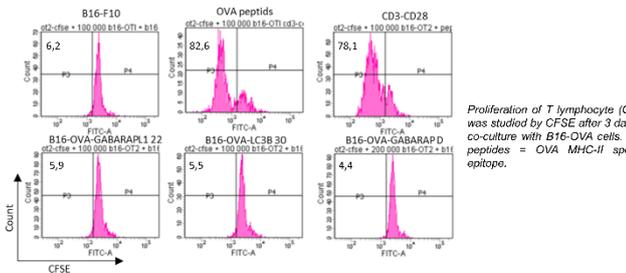
RESULTS

1. ESTABLISHMENT OF B16-F10 CELLS EXPRESSING OVA-ATG8 FUSION PROTEIN AND CHARACTERIZATION OF AUTOPHAGIC FLUX



- Stable B16-F10 cell lines expressing OVA-LC3B, OVA-GABARAP and OVA-GABARAPL1 (A)
- High basal autophagic flux in B16-OVA cells (B)
- No modification of basal or induced autophagic flux by OVA-ATG8 fusion protein overexpression (Statistic test : One way ANOVA : * : $P < 0,05$) (n=6)

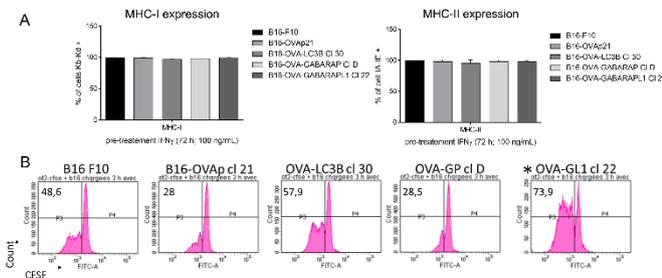
2. ARE B16-OVA-ATG8 CELLS ABLE TO ACTIVATE CD4 T CELLS ?



Proliferation of T lymphocyte (OT-I) was studied by CFSE after 3 days of co-culture with B16-OVA cells. OVA peptides = OVA MHC-II specific epitope.

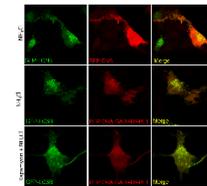
- CD4 T cells proliferation is unaffected by overexpression of OVA-ATG8 in B16 cells

3. ARE B16-OVA-ATG8 ABLE TO PRESENT OVA ANTIGEN ?



- Detection of MHC-I and II by cytometry after IFN γ stimulation (A)
- When loaded with OVA peptides, B16-OVA-ATG8 enhances CD4 T cells (OT-I) proliferation (B)
- * B16-OVA-GABARAPL1 seems to increase proliferation of CD4 T cell more than other B16-OVA-ATG8 cells

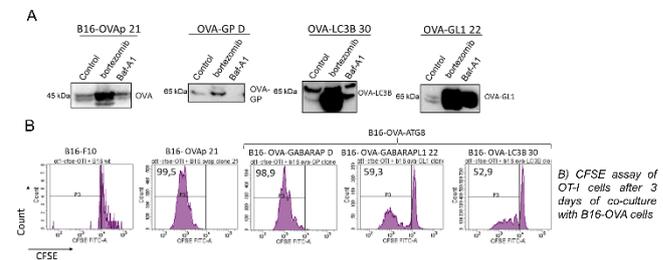
4. ARE OVA-ATG8 FUSION PROTEINS CORRECTLY DELIVERED INTO AUTOPHAGY PATHWAY ?



B16-F10 cell lines was transiently transfected by GFP-LC3B (autophagosome) and RFP-OVA or RFP-OVA ATG8. NH $_4$ Cl is inhibitor of fusion between autophagosomes and lysosomes; rapamycin is inducer of autophagy.

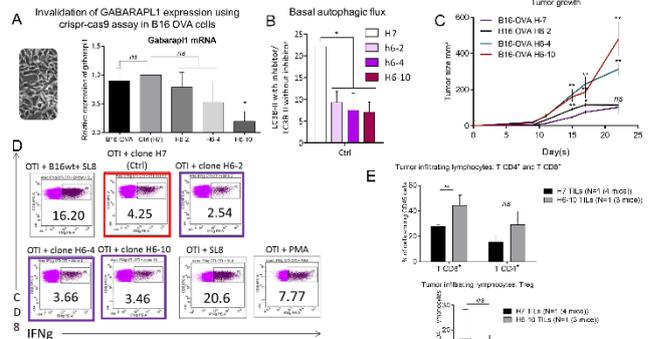
OVA-ATG8 are not sufficiently delivered to autophagosomes

5. ARE OVA-ATG8 FUSION PROTEINS DEGRADED BY PROTEASOME MACHINERY ?



- OVA-ATG8 are highly degraded by proteasome (A)
- B16-OVA-ATG8 can activate CD8 T lymphocyte (OT-I) (B)
- Because highly degraded, OVA-ATG8 fusion proteins are probably no more disposable for autophagosome formation

6. DOES GABARAPL1 HAVE A SPECIFIC EFFECT ON T CELL ACTIVATION ?



B16-OVA GABARAPL1^{-/-} cell lines co-cultured with OT-I CD8⁺ T cell, Golgi plug was added to stop IFN γ excretion during 16h of co-culture. SL8 = OVA MHC-I specific epitope PMA = Chemical cell activation

- GABARAPL1 KO (CRISPR) in B16-OVA inhibits basal autophagic flux (B) ANOVA statistic test : * : $P < 0,05$ (n=3)
- GABARAPL1 KO (CRISPR) promotes tumor growth (C) : statistic : unpaired Student t test * : $P < 0,05$; ** : $P < 0,005$ (N=2 with 5 mice per group).
- GABARAPL1 KO cells are able to activate CD8⁺ T cells (OT-I) as well as GABARAPL1+ control cells *in vitro* (D)
- Increased infiltration of CD8⁺ lymphocytes in B16-OVA GABARAPL1 KO tumors (E) : Unpaired Student t test *** : $P < 0,005$ (n=1)

PERSPECTIVES

- Modify the construction of the fusion protein in order to successfully address the antigen to the autophagosome
- Overexpression of OVA-ATG8 in dendritic cells
- Study tumoral growth in nude mice versus wild type mice
- Characterize the phenotype of tumour infiltrating lymphocytes in B16 OVA GABARAPL1^{-/-} tumour

A BETTER UNDERSTANDING OF THE ROLE OF ATG8 DURING ANTIGEN PRESENTATION COULD ALLOW US TO IMPROVE CD4+ T CELL STIMULATION

POSTER 4 :

Le rôle de l'autophagie et des protéines ATG8 dans la présentation par le
CMH de classe I et II de peptides endogènes issus de tumeurs

Leïla Fonderflick, Elodie Lauret Marie-Joseph, Olivier Adotévi, Michael Boyer Guittaut,
Pascale Adami and Régis Delage-Mourroux

Forum des jeunes chercheurs. Dijon, France

Juin 2017

Introduction

Autophagie et protéines ATG (AuTophaGy related) : Dégradation lysosomale de constituants cytoplasmiques et nucléaires.

Rôle dans l'immunité :

● Présentation d'antigènes (Ag) intracellulaires par le Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) de classe II (ex : EBNA1) et activation des lymphocytes T CD4⁺.

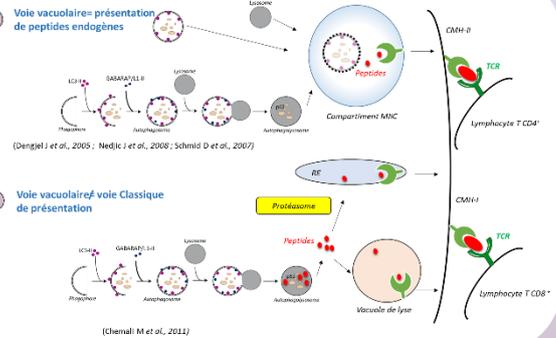
● Présentation croisée d'antigènes de tumeurs par le CMH de classe I et activation des T CD8⁺.

Les protéines de la famille ATG8 : sous famille LC3 (A, B et C) et sous famille GABARAP (GABARAP, GABARAP-L1 et -L2)

Rôle : Elongation, maturation et fermeture de l'autophagosome

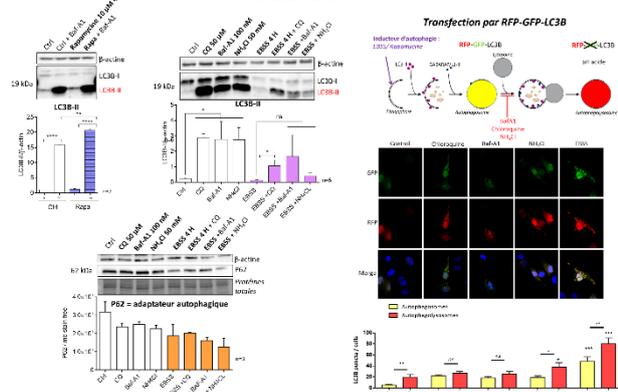
BUT : Etudier le rôle des protéines ATG8 dans la présentation d'Ag et adresser l'ovalbumine (OVA) directement dans les autophagosomes pour augmenter la réponse des T CD4⁺.

Les voies de présentation des antigènes par autophagie sur le CMH de classe I et II



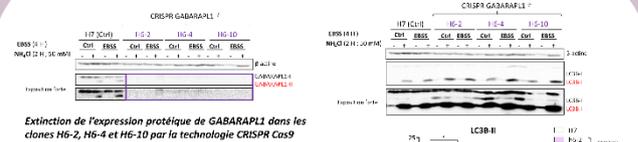
Flux autophagique basal et induit dans les cellules B16-OVA

B16-OVA



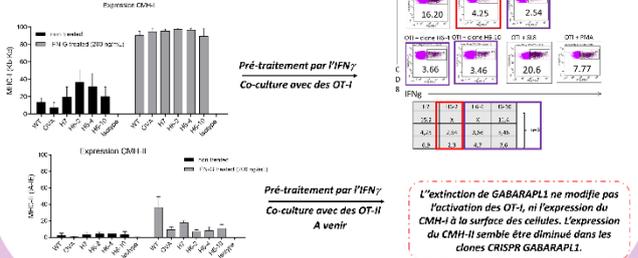
L'autophagie basale est élevée dans les cellules B16-OVA. Elle peut être induite par la rapamycine (inhibiteur de mTOR) et l'EBSS (milieu carencé en acides aminés). L'induction à l'EBSS augmente significativement le nombre d'autophagosomes et d'autophagolysosomes.

Extinction de GABARAPL1 dans les B16-OVA



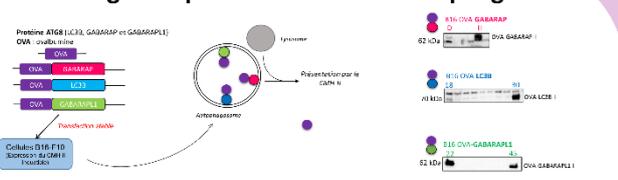
Extinction de l'expression de GABARAPL1 dans les clones H6-2, H6-4 et H6-10 par la technologie CRISPR Cas9. Etude de la croissance tumorale des cellules B16-OVA dans les souris C57BL/6. L'extinction de l'expression de GABARAPL1 augmente la croissance tumorale. Le flux basal est diminué dans les cellules B16-OVA GABARAPL1^{-/-}.

Etude de l'expression du CMH-I, CMH-II et co-culture avec les OT-I

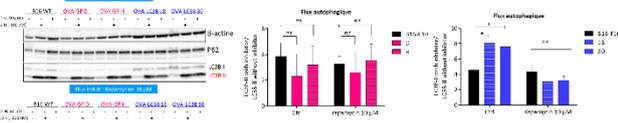


L'extinction de GABARAPL1 ne modifie pas l'activation des OT-I, ni l'expression du CMH-I à la surface des cellules. L'expression du CMH-II semble être diminuée dans les clones CRISPR GABARAPL1^{-/-}.

Adressage des protéines OVA aux autophagosomes

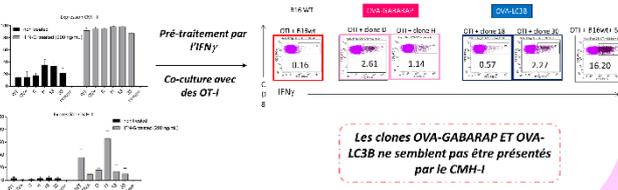


Etude du Flux autophagique : LC3B-II avec inhibiteur /LC3B-II sans inhibiteur



La surexpression de OVA-LC3B dans les cellules B16-F10 semble augmenter le flux autophagique basale.

Etude de l'expression du CMH-I, CMH-II et co-culture avec les OT-I



Les clones OVA-GABARAP ET OVA-LC3B ne semblent pas être présentés par le CMH-I.

Conclusion

- Flux autophagique basal élevé dans les cellules B16-OVA et inducible par la rapamycine et l'EBSS.
- Génération de 3 clones différents d'inactivation de GABARAPL1 par la technologie CRISPR Cas9 : H6-2, H6-4 et H6-10 :
 - Diminution du flux basal dans les cellules B16-OVA GABARAPL1^{-/-}
 - Augmentation de la croissance tumorale des cellules B16-OVA GABARAPL1^{-/-}
 - Pas de modification de l'activation des OT-I
- Les peptides de OVA-LC3B et OVA-GABARAP ne semblent pas être présentés par le CMH-I

Perspectives

- Etude de l'activation des OT-II par les différents clones OVA-LC3B, OVA-GABARAP et OVA-GABARAPL1.
- Etude de la localisation des protéines OVA-ATG8 : Ces protéines de fusion sont-elles localisées au niveau des autophagosomes ?
- Antagonisation des cellules dendritiques par les plasmides OVA-ATG8 : Les peptides OVA sont-ils présentés avec plus d'efficacité par le CMH-II ?

POSTER 5 :

The role of ATG8 protein in MHC class II presentation of tumor derived antigen

Leïla Fonderflick, Yahn Godet, Olivier Adotévi, Pascale Adami and Régis Delage-Mourroux

Oncotrans, Besançon, France

Janvier 2017 et

CFATG, Bordeaux, France

Octobre 2016

Introduction

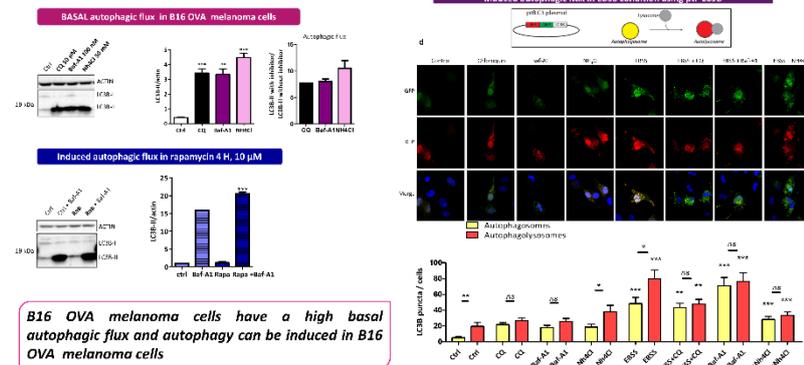
- Autophagy is involved in MHC class II restricted antigen presentation
- ATG8 family are subdivided in two subfamily : LC3 (A, B and C) and GABARAP (GABARAP, GABARAP1 and GABARAP2)
- ATG8 protein are involved in the formation and the maturation of the autophagosome
- LC3b can recruit antigens to the autophagosome for MHC class II presentation

Aim : To study the role of GABARAP and GABARAP1 proteins in the presentation of endogenous tumor specific antigen

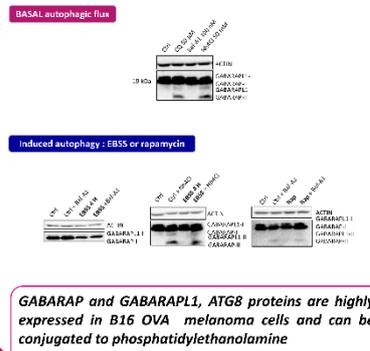
To deliver antigen (OVA) fused to GABARAP or GABARAP1 into autophagosomes in order to increase the CD4 T cells immune response

Methods: We choose ovalbumin (OVA) as an antigen and OVA expressing B16 (B16 OVA) melanoma cells as a model of MHC class II and I presentation

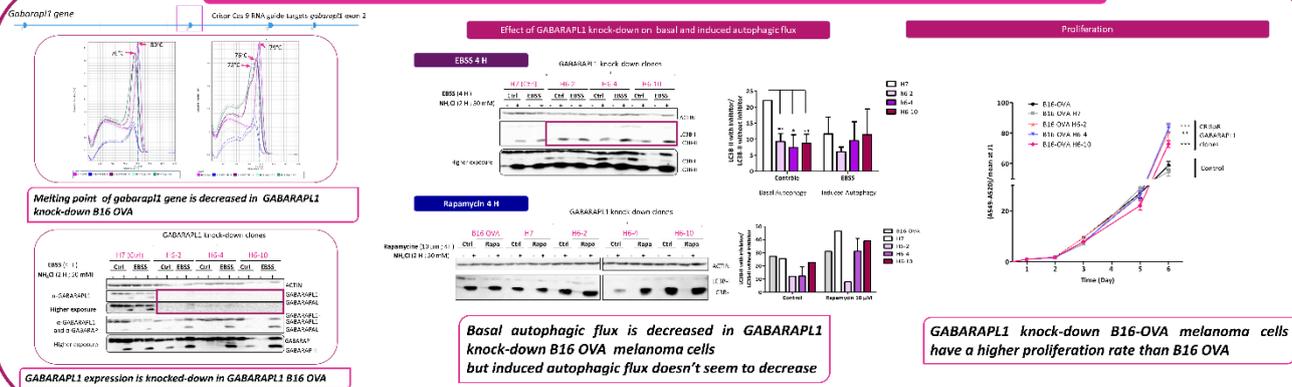
Basal and induced autophagic flux in B16 OVA melanoma cell lines



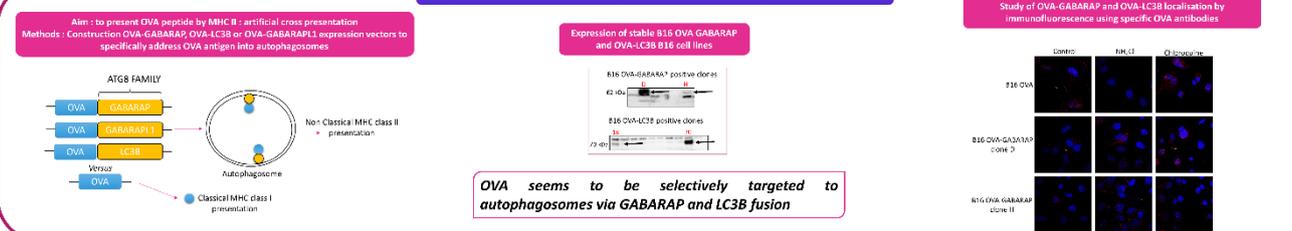
Expression of GABARAP and GABARAP1 in B16 OVA cells



Establishment of GABARAP1 knock-down in B16 OVA melanoma cell lines using Crispr/Cas 9 Technology



Targeting OVA into autophagosomes using ATG8 protein



Conclusion / Perspectives

- B16 OVA cells have a high basal autophagic flux and express GABARAP and GABARAP1 proteins
- Basal autophagic flux is decreased in GABARAP1 knock-down B16 OVA melanoma cells
- Vectors expressing OVA-GABARAP and OVA-LC3B fusion proteins can seem to address OVA antigen into autophagosomes

Ongoing :

- Transfection of mouse dendritic cells with OVA-GABARAP and OVA-LC3B expressing vectors in order to activate CD4⁺ T lymphocytes
- Performing in vivo DNA vaccination with the different DNA plasmids

Bibliographie

- 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
- Agadjanyan MG, Kim JJ, Trivedi N, Wilson DM, Monzavi-Karbassi B, Morrison LD, Nottingham LK, Dentchev T, Tsai A, Dang K, *et al* (1999) CD86 (B7-2) Can Function to Drive MHC-Restricted Antigen-Specific CTL Responses In Vivo. *J Immunol* 162: 3417–3427
- Agarraberes FA, Terlecky SR & Dice JF (1997) An Intralysosomal hsp70 Is Required for a Selective Pathway of Lysosomal Protein Degradation. *J Cell Biol* 137: 825–834
- Ahlers JD, Dunlop N, Alling DW, Nara PL & Berzofsky JA (1997) Cytokine-in-adjuvant steering of the immune response phenotype to HIV-1 vaccine constructs: granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and TNF-alpha synergize with IL-12 to enhance induction of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol Baltim Md 1950* 158: 3947–3958
- Ahn CH, Jeong EG, Lee JW, Kim MS, Kim SH, Kim SS, Yoo NJ & Lee SH (2007) Expression of beclin-1, an autophagy-related protein, in gastric and colorectal cancers. *APMIS* 115: 1344–1349
- Aita VM, Liang XH, Murty VV, Pincus DL, Yu W, Cayanis E, Kalachikov S, Gilliam TC & Levine B (1999) Cloning and genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics* 59: 59–65
- Akira S, Takeda K & Kaisho T (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol* 2: 675–680
- Allan RS, Waithman J, Bedoui S, Jones CM, Villadangos JA, Zhan Y, Lew AM, Shortman K, Heath WR & Carbone FR (2006) Migratory Dendritic Cells Transfer Antigen to a Lymph Node-Resident Dendritic Cell Population for Efficient CTL Priming. *Immunity* 25: 153–162
- Almand B, Resser JR, Lindman B, Nadaf S, Clark JI, Kwon ED, Carbone DP & Gibrilovich DI (2000) Clinical significance of defective dendritic cell differentiation in cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 6: 1755–1766
- Alters SE, Gadea JR, Holm B, Lebkowski J & Philip R (1999) IL-13 can substitute for IL-4 in the generation of dendritic cells for the induction of cytotoxic T lymphocytes and gene therapy. *J Immunother Hagerstown Md 1997* 22: 229–236
- Andersen AN, Landsverk OJ, Simonsen A, Bogen B, Corthay A & Øynebråten I (2016) Coupling of HIV-1 Antigen to the Selective Autophagy Receptor SQSTM1/p62 Promotes T-Cell-Mediated Immunity. *Front Immunol* 7
- Andrade RM, Wessendarp M, Gubbels M-J, Striepen B & Subauste CS (2006) CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J Clin Invest* 116: 2366–2377
- Apetoh L, Ghiringhelli F, Tesniere A, Obeid M, Ortiz C, Criollo A, Mignot G, Maiuri MC, Ullrich E, Saulnier P, *et al* (2007) Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. *Nat Med* 13: 1050–1059
- Artal-Martinez de Narvajás A, Gomez TS, Zhang J-S, Mann AO, Taoda Y, Gorman JA, Herreros-Villanueva M, Gress TM, Ellenrieder V, Bujanda L, *et al* (2013) Epigenetic Regulation of Autophagy by the Methyltransferase G9a. *Mol Cell Biol* 33: 3983–3993

- Ashford TP & Porter KR (1962) CYTOPLASMIC COMPONENTS IN HEPATIC CELL LYSOSOMES. *J Cell Biol* 12: 198–202
- Ashley DM, Faiola B, Nair S, Hale LP, Bigner DD & Gilboa E (1997) Bone marrow-generated dendritic cells pulsed with tumor extracts or tumor RNA induce antitumor immunity against central nervous system tumors. *J Exp Med* 186: 1177–1182
- Ashrafi G & Schwarz TL (2013) The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ* 20: 31–42
- Backer JM (2008) The regulation and function of Class III PI3Ks: novel roles for Vps34. *Biochem J* 410: 1–17
- Barnard RA, Regan DP, Hansen RJ, Maycotte P, Thorburn A & Gustafson DL (2016) Autophagy Inhibition Delays Early but Not Late-Stage Metastatic Disease. *J Pharmacol Exp Ther* 358: 282–293
- Basu S, Binder RJ, Ramalingam T & Srivastava PK (2001) CD91 is a common receptor for heat shock proteins gp96, hsp90, hsp70, and calreticulin. *Immunity* 14: 303–313
- Bekri S, Adélaïde J, Merscher S, Grosgeorge J, Caroli-Bosc F, Perucca-Lostanlen D, Kelley PM, Pébusque MJ, Theillet C, Birnbaum D, *et al* (1997) Detailed map of a region commonly amplified at 11q13-->q14 in human breast carcinoma. *Cytogenet Cell Genet* 79: 125–131
- Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, Helgason GV, Soliera AR, Ronchetti M, Galavotti S, Young KW, Selmi T, Yacobi R, *et al* (2009) Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J Clin Invest* 119: 1109–1123
- Berthier A, Seguin S, Sasco AJ, Bobin JY, De Laroche G, Datchary J, Saez S, Rodriguez-Lafrasse C, Tolle F, Fraichard A, *et al* (2010) High expression of gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 102: 1024–1031
- Bevan MJ (1976) Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay. *J Exp Med* 143: 1283–1288
- Birgisdottir ÁB, Lamark T & Johansen T (2013) The LIR motif – crucial for selective autophagy. *J Cell Sci* 126: 3237–3247
- Bishop E & Bradshaw TD (2018) Autophagy modulation: a prudent approach in cancer treatment? *Cancer Chemother Pharmacol* 82: 913–922
- Blum JS, Wearsch PA & Cresswell P (2013) Pathways of Antigen Processing. *Annu Rev Immunol* 31: 443–473
- Böhm W, Thoma S, Leithäuser F, Möller P, Schirmbeck R & Reimann J (1998) T cell-mediated, IFN-gamma-facilitated rejection of murine B16 melanomas. *J Immunol Baltim Md 1950* 161: 897–908
- Bosma MJ & Carroll AM (1991) The SCID mouse mutant: definition, characterization, and potential uses. *Annu Rev Immunol* 9: 323–350

- Boyer-Guittaut M, Poillet L, Liang Q, Bôle-Richard E, Ouyang X, Benavides GA, Chakrama F-Z, Fraichard A, Darley-Usmar VM, Despouy G, *et al* (2014) The role of GABARAPL1/GEC1 in autophagic flux and mitochondrial quality control in MDA-MB-436 breast cancer cells. *Autophagy* 10: 986–1003
- Boyle KB & Randow F (2013) The role of ‘eat-me’ signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. *Curr Opin Microbiol* 16: 339–348
- Bozic M, Bekerom L van den, Milne BA, Goodman N, Roberston L, Prescott AR, Macartney TJ, Dawe N & McEwan DG (2019) A conserved ATG2-GABARAP interaction is critical for phagophore closure. *bioRxiv*: 624627
- Brunner C, Seiderer J, Schlamp A, Bidlingmaier M, Eigler A, Haimerl W, Lehr HA, Krieg AM, Hartmann G & Endres S (2000) Enhanced dendritic cell maturation by TNF-alpha or cytidine-phosphate-guanosine DNA drives T cell activation in vitro and therapeutic anti-tumor immune responses in vivo. *J Immunol Baltim Md 1950* 165: 6278–6286
- Budida R, Stankov MV, Döhner K, Buch A, Panayotova-Dimitrova D, Tappe KA, Pohlmann A, Sodeik B & Behrens GMN (2017) Herpes simplex virus 1 interferes with autophagy of murine dendritic cells and impairs their ability to stimulate CD8+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 47: 1819–1834
- Burnet M (1957) Cancer—A Biological Approach. *Br Med J* 1: 841–847
- Cao M-D, Chen Z-D & Xing Y (2004) Gamma irradiation of human dendritic cells influences proliferation and cytokine profile of T cells in autologous mixed lymphocyte reaction. *Cell Biol Int* 28: 223–228
- Carlsson SR & Simonsen A (2015) Membrane dynamics in autophagosome biogenesis. *J Cell Sci* 128: 193–205
- Carroll B, Maetzel D, Maddocks OD, Otten G, Ratcliff M, Smith GR, Dunlop EA, Passos JF, Davies OR, Jaenisch R, *et al* (2016) Control of TSC2-Rheb signaling axis by arginine regulates mTORC1 activity. *eLife* 5: e11058
- Cella M, Sallusto F & Lanzavecchia A (1997) Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr Opin Immunol* 9: 10–16
- Celluzzi CM, Mayordomo JI, Storkus WJ, Lotze MT & Falo LD (1996) Peptide-pulsed dendritic cells induce antigen-specific CTL-mediated protective tumor immunity. *J Exp Med* 183: 283–287
- Chakrama FZ, Seguin-Py S, Le Grand JN, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Despouy G, Perez V, Jouvenot M & Boyer-Guittaut M (2010) GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles. *Autophagy* 6: 495–505
- Chatenoud L (2002) Immunité innée et immunité adaptative: un flirt bénéfique? *médecine/sciences* 18: 1183–1184
- Chen Y, Zhao L, Tian X, Liu T, Zhong J, Sun L & Liu J (2013) Autophagy Induced by the Withdrawal of Mitogens Promotes Neurite Extension in Rat Neural Stem Cells. *J Biochem Mol Toxicol* 27: 351–356
- Cherra SJ, Kulich SM, Uechi G, Balasubramani M, Mountzouris J, Day BW & Chu CT (2010) Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation. *J Cell Biol* 190: 533–539

- Chiang HL, Terlecky SR, Plant CP & Dice JF (1989) A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science* 246: 382–385
- Chicaybam L, Sodre AL, Curzio BA & Bonamino MH (2013) An Efficient Low Cost Method for Gene Transfer to T Lymphocytes. *PLoS ONE* 8
- Clark SL (1957) Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *J Biophys Biochem Cytol* 3: 349–362
- Claude-Taupin A, Fonderflick L, Gauthier T, Mansi L, Pallandre J-R, Borg C, Perez V, Monnier F, Algros M-P, Vigneron M, *et al* (2018) ATG9A Is Overexpressed in Triple Negative Breast Cancer and Its In Vitro Extinction Leads to the Inhibition of Pro-Cancer Phenotypes. *Cells* 7
- Clausen TH, Lamark T, Isakson P, Finley K, Larsen KB, Brech A, Øvervatn A, Stenmark H, Bjørkøy G, Simonsen A, *et al* (2010) p62/SQSTM1 and ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS and their degradation by autophagy. *Autophagy* 6: 330–344
- Conner SD & Schmid SL (2002) Identification of an adaptor-associated kinase, AAK1, as a regulator of clathrin-mediated endocytosis. *J Cell Biol* 156: 921–929
- Coppola D, Khalil F, Eschrich S, Boulware D, Yeatman T & Wang H-G (2008a) Down Regulation of Bax-Interacting Factor-1 (Bif-1) in Colon Cancer. *Cancer* 113: 2665–2670
- Coppola D, Oliveri C, Sayegh Z, Boulware D, Takahashi Y, Pow-Sang J, Djeu JY & Wang H-G (2008b) BAX-INTERACTING FACTOR-1 (BIF-1) EXPRESSION IN PROSTATE CANCER. *Clin Genitourin Cancer* 6: 117–121
- Coulon P-G, Richetta C, Rouers A, Blanchet FP, Urrutia A, Guerbois M, Piguet V, Theodorou I, Bet A, Schwartz O, *et al* (2016) HIV-Infected Dendritic Cells Present Endogenous MHC Class II-Restricted Antigens to HIV-Specific CD4+ T Cells. *J Immunol* 197: 517–532
- Crotzer VL & Blum JS (2009) Autophagy and its role in MHC-mediated antigen presentation. *J Immunol Baltim Md 1950* 182: 3335
- Cruz FM, Colbert JD, Merino E, Kriegsman BA & Rock KL (2017) The Biology and Underlying Mechanisms of Cross-Presentation of Exogenous Antigens on MHC-I Molecules. *Annu Rev Immunol* 35: 149–176
- Cuervo AM & Dice JF (1996) A Receptor for the Selective Uptake and Degradation of Proteins by Lysosomes. *Science* 273: 501–503
- Cufi S, Vazquez-Martin A, Oliveras-Ferraros C, Martin-Castillo B, Vellon L & Menendez JA (2011) Autophagy positively regulates the CD44(+) CD24(-/low) breast cancer stem-like phenotype. *Cell Cycle Georget Tex* 10: 3871–3885
- De Vries IJM, Krooshoop DJEB, Scharenborg NM, Lesterhuis WJ, Diepstra JHS, Van Muijen GNP, Strijk SP, Ruers TJ, Boerman OC, Oyen WJG, *et al* (2003) Effective migration of antigen-pulsed dendritic cells to lymph nodes in melanoma patients is determined by their maturation state. *Cancer Res* 63: 12–17
- Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, Mukherjee C, Shi Y, Gélinas C, Fan Y, *et al* (2006) Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* 10: 51–64

- Deng Q, Wang Z, Wang L, Zhang L, Xiang X, Wang Z & Chong T (2013) Lower mRNA and protein expression levels of LC3 and Beclin1, markers of autophagy, were correlated with progression of renal clear cell carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 43: 1261–1268
- Dengjel J, Schoor O, Fischer R, Reich M, Kraus M, Müller M, Kreymborg K, Altenberend F, Brandenburg J, Kalbacher H, *et al* (2005) Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 102: 7922–7927
- Deretic V (2011) Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. *Immunol Rev* 240: 92–104
- Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, Pagliarini V, Matteoni S, Fuoco C, Giunta L, *et al* (2010) The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol* 191: 155–168
- Diao J, Liu R, Rong Y, Zhao M, Zhang J, Lai Y, Zhou Q, Wilz LM, Li J, Vivona S, *et al* (2015) ATG14 promotes membrane tethering and fusion of autophagosomes to endolysosomes. *Nature* 520: 563–566
- Dice JF (1990) Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem Sci* 15: 305–309
- Dice JF (2007) Chaperone-Mediated Autophagy. *Autophagy* 3: 295–299
- Diebold SS, Cotten M, Koch N & Zenke M (2001) MHC class II presentation of endogenously expressed antigens by transfected dendritic cells. *Gene Ther* 8: 487–493
- Dooley HC, Razi M, Polson HEJ, Girardin SE, Wilson MI & Tooze SA (2014) WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1. *Mol Cell* 55: 238–252
- Dörfel D, Appel S, Grünebach F, Weck MM, Müller MR, Heine A & Brossart P (2005) Processing and presentation of HLA class I and II epitopes by dendritic cells after transfection with in vitro-transcribed MUC1 RNA. *Blood* 105: 3199–3205
- Dou Z, Xu C, Donahue G, Shimi T, Pan J-A, Zhu J, Ivanov A, Capell BC, Drake AM, Shah PP, *et al* (2015) Autophagy mediates degradation of nuclear lamina. *Nature* 527: 105–109
- Dunn GP, Old LJ & Schreiber RD (2004) The Immunobiology of Cancer Immunosurveillance and Immunoediting. *Immunity* 21: 137–148
- Duraes FV, Niven J, Dubrot J, Hugues S & Gannagé M (2015) Macroautophagy in Endogenous Processing of Self- and Pathogen-Derived Antigens for MHC Class II Presentation. *Front Immunol* 6: 459
- Duve C de (2005) The lysosome turns fifty. *Nat Cell Biol* 7: 847–849
- 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
- Egan DF, Shackelford DB, Mihaylova MM, Gelino S, Kohnz RA, Mair W, Vasquez DS, Joshi A, Gwinn DM, Taylor R, *et al* (2011) Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-Activated Protein Kinase Connects Energy Sensing to Mitophagy. *Science* 331: 456–461

- English L, Chemali M, Duron J, Rondeau C, Laplante A, Gingras D, Alexander D, Leib D, Norbury C, Lippé R, *et al* (2009) Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection. *Nat Immunol* 10: 480–487
- Fahmy AM, Boulais J, Desjardins M & Matheoud D (2019) Mitochondrial antigen presentation: a mechanism linking Parkinson's disease to autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 58: 31–37
- Farré J-C, Krick R, Subramani S & Thumm M (2009) Turnover of organelles by autophagy in yeast. *Curr Opin Cell Biol* 21: 522–530
- Filimonenko M, Isakson P, Finley KD, Anderson M, Jeong H, Melia TJ, Bartlett BJ, Myers KM, Birkeland HCG, Lamark T, *et al* (2010) The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy. *Mol Cell* 38: 265–279
- Filomeni G, De Zio D & Cecconi F (2015) Oxidative stress and autophagy: the clash between damage and metabolic needs. *Cell Death Differ* 22: 377–388
- Fimia GM, Corazzari M, Antonioli M & Piacentini M (2013) Ambra1 at the crossroad between autophagy and cell death. *Oncogene* 32: 3311–3318
- Fimia GM, 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
- Finkbeiner S (2011) Huntington's Disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 3
- Fischer R, Turnquist HR, Taner T & Thomson AW (2009) Use of Rapamycin in the Induction of Tolerogenic Dendritic Cells. In *Dendritic Cells*, Lombardi G & Rizzo-Vasquez Y (eds) pp 215–232. Berlin, Heidelberg: Springer
- Fonderflick L, Adotévi O, Guittaut M, Adami P & Delage-Mourroux R (2020) Chapter 10 - Role of autophagy in antigen presentation and its involvement on cancer immunotherapy. In *Autophagy in Immune Response: Impact on Cancer Immunotherapy*, Chouaib S (ed) pp 175–196. Academic Press
- Fonteneau JF, Brilot F, Münz C & Gannagé M (2016) The Tumor Antigen NY-ESO-1 Mediates Direct Recognition of Melanoma Cells by CD4+ T Cells after Intercellular Antigen Transfer. *J Immunol* 196: 64–71
- Fu M & Holzbaur ELF (2014) MAPK8IP1/JIP1 regulates the trafficking of autophagosomes in neurons. *Autophagy* 10: 2079–2081
- Fu M-M, Nirschl JJ & Holzbaur ELF (2014) LC3 binding to the scaffolding protein JIP1 regulates processive dynein-driven transport of autophagosomes. *Dev Cell* 29: 577–590
- Fu X, Tao L & Zhang X (2010) A Short Polypeptide from the Herpes Simplex Virus Type 2 ICP10 Gene Can Induce Antigen Aggregation and Autophagosomal Degradation for Enhanced Immune Presentation. *Hum Gene Ther* 21: 1687–1696
- Fujita N, Itoh T, Omori H, Fukuda M, Noda T & Yoshimori T (2008) The Atg16L Complex Specifies the Site of LC3 Lipidation for Membrane Biogenesis in Autophagy. *Mol Biol Cell* 19: 2092–2100

- Fung C, Lock R, Gao S, Salas E & Debnath J (2008) Induction of autophagy during extracellular matrix detachment promotes cell survival. *Mol Biol Cell* 19: 797–806
- Furuya N, Yu J, Byfield M, Pattingre S & Levine B (2005) The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy* 1: 46–52
- Gabrilovich DI, Chen HL, Girgis KR, Cunningham HT, Meny GM, Nadaf S, Kavanaugh D & Carbone DP (1996) Production of vascular endothelial growth factor by human tumors inhibits the functional maturation of dendritic cells. *Nat Med* 2: 1096–1103
- Ganley IG, Lam DH, Wang J, Ding X, Chen S & Jiang X (2009) ULK1·ATG13·FIP200 Complex Mediates mTOR Signaling and Is Essential for Autophagy. *J Biol Chem* 284: 12297–12305
- Gao X, Zacharek A, Salkowski A, Grignon DJ, Sakr W, Porter AT & Honn KV (1995) Loss of heterozygosity of the BRCA1 and other loci on chromosome 17q in human prostate cancer. *Cancer Res* 55: 1002–1005
- Gao X, Zhang Y, Arrazola P, Hino O, Kobayashi T, Yeung RS, Ru B & Pan D (2002) Tsc tumour suppressor proteins antagonize amino-acid-TOR signalling. *Nat Cell Biol* 4: 699–704
- Garbar C, Mascaux C, Giustiniani J, Merrouche Y & Bensussan A (2017) Chemotherapy treatment induces an increase of autophagy in the luminal breast cancer cell MCF7, but not in the triple-negative MDA-MB231. *Sci Rep* 7: 7201
- García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero E, Ortet L, Rodríguez-Ubreva J, Rebollo E, Ruiz-Bonilla V, Gutarra S, Ballestar E, Serrano AL, *et al* (2016) Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature* 529: 37–42
- Gatica D, Lahiri V & Klionsky DJ (2018) Cargo recognition and degradation by selective autophagy. *Nat Cell Biol* 20: 233–242
- 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: e00947
- Ghiringhelli F, Apetoh L, Tesniere A, Aymeric L, Ma Y, Ortiz C, Vermaelen K, Panaretakis T, Mignot G, Ullrich E, *et al* (2009) Activation of the NLRP3 inflammasome in dendritic cells induces IL-1beta-dependent adaptive immunity against tumors. *Nat Med* 15: 1170–1178
- Gong C, Bauvy C, Tonelli G, Yue W, Deloménie C, Nicolas V, Zhu Y, Domergue V, Marin-Esteban V, Tharinger H, *et al* (2013) Beclin 1 and autophagy are required for the tumorigenicity of breast cancer stem-like/progenitor cells. *Oncogene* 32: 2261–2272, 2272e.1–11
- Goral S (2011) The three-signal hypothesis of lymphocyte activation/targets for immunosuppression. *Dial Transplant* 40: 14–16
- Goussetis DJ, Altman JK, Glaser H, McNeer JL, Tallman MS & Plataniias LC (2010) Autophagy Is a Critical Mechanism for the Induction of the Antileukemic Effects of Arsenic Trioxide. *J Biol Chem* 285: 29989–29997
- Grivennikov SI, Greten FR & Karin M (2010) Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 140: 883–899

- Gross SP, Vershinin M & Shubeita GT (2007) Cargo Transport: Two Motors Are Sometimes Better Than One. *Curr Biol* 17: R478–R486
- Guo Y, Chang C, Huang R, Liu B, Bao L & Liu W (2012) AP1 is essential for generation of autophagosomes from the trans-Golgi network. *J Cell Sci* 125: 1706–1715
- Gutierrez MG, Master SS, Singh SB, Taylor GA, Colombo MI & Deretic V (2004a) Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages. *Cell* 119: 753–766
- Gutierrez MG, Munafó DB, Berón W & Colombo MI (2004b) Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. *J Cell Sci* 117: 2687–2697
- Gwinn DM, Shackelford DB, Egan DF, Mihaylova MM, Mery A, Vasquez DS, Turk BE & Shaw RJ (2008) AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint. *Mol Cell* 30: 214
- 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
- Hanada T, Noda NN, Satomi Y, Ichimura Y, Fujioka Y, Takao T, Inagaki F & Ohsumi Y (2007) The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem* 282: 37298–37302
- Hanahan D & Weinberg RA (2011) Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646–674
- Hanna RA, Quinsay MN, Orogo AM, Giang K, Rikka S & Gustafsson ÅB (2012) Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3 (LC3) Interacts with Bnip3 Protein to Selectively Remove Endoplasmic Reticulum and Mitochondria via Autophagy. *J Biol Chem* 287: 19094–19104
- Hardie DG (2007) AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 774–785
- Harris J, Hartman M, Roche C, Zeng SG, O’Shea A, Sharp FA, Lambe EM, Creagh EM, Golenbock DT, Tschopp J, *et al* (2011) Autophagy controls IL-1beta secretion by targeting pro-IL-1beta for degradation. *J Biol Chem* 286: 9587–9597
- Hatfield P, Merrick AE, West E, O’Donnell D, Selby P, Vile R & Melcher AA (2008) Optimization of Dendritic Cell Loading With Tumor Cell Lysates for Cancer Immunotherapy. *J Immunother Hagerstown Md* 1997 31: 620–632
- He F, Ru X & Wen T (2020) NRF2, a Transcription Factor for Stress Response and Beyond. *Int J Mol Sci* 21
- Hemelaar J, Lelyveld VS, Kessler BM & Ploegh HL (2003) A Single Protease, Apg4B, Is Specific for the Autophagy-related Ubiquitin-like Proteins GATE-16, MAP1-LC3, GABARAP, and Apg8L. *J Biol Chem* 278: 51841–51850
- Henault J, Martinez J, Riggs JM, Tian J, Mehta P, Clarke L, Sasai M, Latz E, Brinkmann MM, Iwasaki A, *et al* (2012) Noncanonical Autophagy Is Required for Type I Interferon Secretion in Response to DNA-Immune Complexes. *Immunity* 37: 986–997

- Herhaus L, Bhaskara RM, Lystad AH, Gestal-Mato U, Covarrubias-Pinto A, Bonn F, Simonsen A, Hummer G & Dikic I (2020) TBK1-mediated phosphorylation of LC3C and GABARAP-L2 controls autophagosome shedding by ATG4 protease. *EMBO Rep* 21
- Hervouet E, Claude-Taupin A, Gauthier T, Perez V, Fraichard A, Adami P, Despouy G, Monnier F, Algros M-P, Jouvenot M, *et al* (2015) The autophagy GABARAPL1 gene is epigenetically regulated in breast cancer models. *BMC Cancer* 15: 729
- Heuser J (1989) Changes in lysosome shape and distribution correlated with changes in cytoplasmic pH. *J Cell Biol* 108: 855–864
- Hilton T, Sanborn R, Boulmay B, Li R, Spieler B, Happel K, Paustian C, Moudgil T, Dubay C, Fisher B, *et al* (2014) Preliminary analysis of immune responses in patients enrolled in a Phase II trial of Cyclophosphamide with Allogenic DRibble Vaccine Alone (DPV-001) or with GM-CSF or Imiquimod for adjuvant treatment of Stage IIIA or IIIB NSCLC. *J Immunother Cancer* 2: P249
- Hosokawa N, Hara T, Kaizuka T, Kishi C, Takamura A, Miura Y, Iemura S, Natsume T, Takehana K, Yamada N, *et al* (2009) Nutrient-dependent mTORC1 Association with the ULK1–Atg13–FIP200 Complex Required for Autophagy. *Mol Biol Cell* 20: 1981–1991
- Huang J, Wang QJ, Yang S, Li YF, El-Gamil M, Rosenberg SA & Robbins PF (2011) Irradiation enhances human T cell function by up-regulating CD70 expression on antigen-presenting cells in vitro. *J Immunother Hagerstown Md* 1997 34: 327–335
- Huang R, Xu Y, Wan W, Shou X, Qian J, You Z, Liu B, Chang C, Zhou T, Lippincott-Schwartz J, *et al* (2015) Deacetylation of nuclear LC3 drives autophagy initiation under starvation. *Mol Cell* 57: 456–466
- Huang X, Bai H-M, Chen L, Li B & Lu Y-C (2010) Reduced expression of LC3B-II and Beclin 1 in glioblastoma multiforme indicates a down-regulated autophagic capacity that relates to the progression of astrocytic tumors. *J Clin Neurosci Off J Neurosurg Soc Australas* 17: 1515–1519
- Hurley JH & Young LN (2017) Mechanisms of Autophagy Initiation. *Annu Rev Biochem* 86: 225–244
- Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, Mizushima N, Tanida I, Kominami E, Ohsumi M, *et al* (2000) A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* 408: 488–492
- Inaba K, Metlay JP, Crowley MT & Steinman RM (1990) Dendritic cells pulsed with protein antigens in vitro can prime antigen-specific, MHC-restricted T cells in situ. *J Exp Med* 172: 631–640
- Inami Y, Waguri S, Sakamoto A, Kouno T, Nakada K, Hino O, Watanabe S, Ando J, Iwadate M, Yamamoto M, *et al* (2011) Persistent activation of Nrf2 through p62 in hepatocellular carcinoma cells. *J Cell Biol* 193: 275–284
- Inoki K, Li Y, Xu T & Guan K-L (2003a) Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 17: 1829–1834
- Inoki K, Zhu T & Guan K-L (2003b) TSC2 Mediates Cellular Energy Response to Control Cell Growth and Survival. *Cell* 115: 577–590

- Ionov Y, Nowak N, Perucho M, Markowitz S & Cowell JK (2004) Manipulation of nonsense mediated decay identifies gene mutations in colon cancer Cells with microsatellite instability. *Oncogene* 23: 639–645
- Itakura E, Kishi C, Inoue K & Mizushima N (2008) Beclin 1 Forms Two Distinct Phosphatidylinositol 3-Kinase Complexes with Mammalian Atg14 and UVRAG. *Mol Biol Cell* 19: 5360–5372
- Itakura E, Kishi-Itakura C, Koyama-Honda I & Mizushima N (2012a) Structures containing Atg9A and the ULK1 complex independently target depolarized mitochondria at initial stages of Parkin-mediated mitophagy. *J Cell Sci* 125: 1488–1499
- Itakura E, Kishi-Itakura C & Mizushima N (2012b) The hairpin-type tail-anchored SNARE syntaxin 17 targets to autophagosomes for fusion with endosomes/lysosomes. *Cell* 151: 1256–1269
- Itoh T, Kanno E, Uemura T, Waguri S & Fukuda M (2011) OATL1, a novel autophagosome-resident Rab33B-GAP, regulates autophagosomal maturation. *J Cell Biol* 192: 839–853
- Iwata T, Kondo Y, Kimura O, Morosawa T, Fujisaka Y, Umetsu T, Kogure T, Inoue J, Nakagome Y & Shimosegawa T (2016) PD-L1+MDSCs are increased in HCC patients and induced by soluble factor in the tumor microenvironment. *Sci Rep* 6: 39296
- Jackson MP & Hewitt EW (2016) Cellular proteostasis: degradation of misfolded proteins by lysosomes. *Essays Biochem* 60: 173–180
- Jackson WT (2015) Viruses and the autophagy pathway. *Virology* 479–480: 450–456
- Jacquet M, Guittaut M, Fraichard A & Despouy G (2020) The functions of Atg8-family proteins in autophagy and cancer: linked or unrelated? *Autophagy* 0: 1–13
- Jagannath C, Lindsey DR, Dhandayuthapani S, Xu Y, Hunter RL & Eissa NT (2009) Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells. *Nat Med* 15: 267–276
- Jain A, Lamark T, Sjøttem E, Larsen KB, Awuh JA, Øvervatn A, McMahon M, Hayes JD & Johansen T (2010) p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 and creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription. *J Biol Chem* 285: 22576–22591
- Jatana N, Ascher DB, Pires DEV, Gokhale RS & Thukral L (2020) Human LC3 and GABARAP subfamily members achieve functional specificity via specific structural modulations. *Autophagy* 16: 239–255
- Ji Q, Castelli L & Goverman JM (2013) MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8⁺ T cells. *Nat Immunol* 14: 254–261
- 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* 25: 1327–1337
- Jiang Z-F, Shao L-J, Wang W-M, Yan X-B & Liu R-Y (2012) Decreased expression of Beclin-1 and LC3 in human lung cancer. *Mol Biol Rep* 39: 259–267

- Johansen T & Lamark T (2019) Selective Autophagy: ATG8 Family Proteins, LIR Motifs and Cargo Receptors. *J Mol Biol*
- Johansson M, Rocha N, Zwart W, Jordens I, Janssen L, Kuijl C, Olkkonen VM & Neefjes J (2007) Activation of endosomal dynein motors by stepwise assembly of Rab7-RILP-p150Glued, ORP1L, and the receptor β III spectrin. *J Cell Biol* 176: 459–471
- Joo JH, Dorsey FC, Joshi A, Hennessy-Walters KM, Rose KL, McCastlain K, Zhang J, Iyengar R, Jung C-H, Suen D-F, *et al* (2011) Hsp90-Cdc37 chaperone complex regulates Ulk1- and Atg13-mediated mitophagy. *Mol Cell* 43: 572
- Kabeysa Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y & Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J* 19: 5720–5728
- Kabeysa Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y & Yoshimori T (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* 117: 2805–2812
- Kaliński P, Hilkens CM, Wierenga EA & Kapsenberg ML (1999) T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20: 561–567
- Kalinski P, Muthuswamy R & Urban J (2013) Dendritic cells in cancer immunotherapy: vaccines and combination immunotherapies. *Expert Rev Vaccines* 12: 285–295
- Kanazawa N (2007) Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells. *J Dermatol Sci* 45: 77–86
- Kane LA, Lazarou M, Fogel AI, Li Y, Yamano K, Sarraf SA, Banerjee S & Youle RJ (2014) PINK1 phosphorylates ubiquitin to activate Parkin E3 ubiquitin ligase activity. *J Cell Biol* 205: 143–153
- Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, Redfern CH, Ferrari AC, Dreicer R, Sims RB, *et al* (2010) Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *N Engl J Med* 363: 411–422
- Karantza-Wadsworth V, Patel S, Kravchuk O, Chen G, Mathew R, Jin S & White E (2007) Autophagy mitigates metabolic stress and genome damage in mammary tumorigenesis. *Genes Dev* 21: 1621–1635
- Kasai M, Tanida I, Ueno T, Kominami E, Seki S, Ikeda T & Mizuochi T (2009) Autophagic Compartments Gain Access to the MHC Class II Compartments in Thymic Epithelium. *J Immunol* 183: 7278–7285
- Kawabata T & Yoshimori T (2016) Beyond starvation: An update on the autophagic machinery and its functions. *J Mol Cell Cardiol* 95: 2–10
- Keller CW, Freigang S & Lünemann JD (2017) Reciprocal Crosstalk between Dendritic Cells and Natural Killer T Cells: Mechanisms and Therapeutic Potential. *Front Immunol* 8
- Keulers TG, Schaaf MBE, Peeters HJM, Savelkoul KGM, Vooijs MA, Bussink J, Jutten B & Rouschop KMA (2015) GABARAPL1 is required for increased EGFR membrane expression during hypoxia. *Radiother Oncol* 116: 417–422

- Kiertscher SM & Roth MD (1996) Human CD14⁺ leukocytes acquire the phenotype and function of antigen-presenting dendritic cells when cultured in GM-CSF and IL-4. *J Leukoc Biol* 59: 208–218
- Kim J, Kim YC, Fang C, Russell RC, Kim JH, Fan W, Liu R, Zhong Q & Guan K-L (2013) 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 MS, Jeong EG, Ahn CH, Kim SS, Lee SH & Yoo NJ (2008) Frameshift mutation of UVRAG, an autophagy-related gene, in gastric carcinomas with microsatellite instability. *Hum Pathol* 39: 1059–1063
- Kim SB, Pandita RK, Eskiocak U, Ly P, Kaisani A, Kumar R, Cornelius C, Wright WE, Pandita TK & Shay JW (2012) Targeting of Nrf2 induces DNA damage signaling and protects colonic epithelial cells from ionizing radiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: E2949–E2955
- Kim Y-M, Jung CH, Seo M, Kim EK, Park J-M, Bae SS & Kim D-H (2015) mTORC1 Phosphorylates UVRAG to Negatively Regulate Autophagosome and Endosome Maturation. *Mol Cell* 57: 207–218
- Kimura S, Noda T & Yoshimori T (2008) Dynein-dependent Movement of Autophagosomes Mediates Efficient Encounters with Lysosomes. *Cell Struct Funct* 33: 109–122
- Kirkin V, Lamark T, Sou Y-S, Bjørkøy G, Nunn JL, Bruun J-A, Shvets E, McEwan DG, Clausen TH, Wild P, *et al* (2009a) A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates. *Mol Cell* 33: 505–516
- Kirkin V, McEwan DG, Novak I & Dikic I (2009b) A Role for Ubiquitin in Selective Autophagy. *Mol Cell* 34: 259–269
- Kissová I, Salin B, Schaeffer J, Bhatia S, Manon S & Camougrand N (2007) Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast. *Autophagy* 3: 329–336
- Kitamura H, Torigoe T, Asanuma H, Hisasue S-I, Suzuki K, Tsukamoto T, Satoh M & Sato N (2006) Cytosolic overexpression of p62 sequestosome 1 in neoplastic prostate tissue. *Histopathology* 48: 157–161
- Klebig C, Seitz S, Arnold W, Deutschmann N, Pacyna-Gengelbach M, Scherneck S & Petersen I (2005) Characterization of {gamma}-aminobutyric acid type A receptor-associated protein, a novel tumor suppressor, showing reduced expression in breast cancer. *Cancer Res* 65: 394–400
- Kleijmeer MJ, Escola J-M, UytdeHaag FGCM, Jakobson E, Griffith JM, Osterhaus ADME, Stoorvogel W, Melief CJM, Rabouille C & Geuze HJ (2001) Antigen Loading of MHC Class I Molecules in the Endocytic Tract. *Traffic* 2: 124–137
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M, *et al* (2003) A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 5: 539–545
- Knorr RL, Lipowsky R & Dimova R (2015) Autophagosome closure requires membrane scission. *Autophagy* 11: 2134–2137

- Komatsu M, Kurokawa H, Waguri S, Taguchi K, Kobayashi A, Ichimura Y, Sou Y-S, Ueno I, Sakamoto A, Tong KI, *et al* (2010) The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1. *Nat Cell Biol* 12: 213–223
- Komatsu M, Waguri S, Koike M, Sou Y-S, Ueno T, Hara T, Mizushima N, Iwata J-I, Ezaki J, Murata S, *et al* (2007) Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell* 131: 1149–1163
- Kondapalli C, Kazlauskaitė A, Zhang N, Woodroof HI, Campbell DG, Gourlay R, Burchell L, Walden H, MacArtney TJ, Deak M, *et al* (2012) PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65. *Open Biol* 2: 120080
- Koneri K, Goi T, Hirono Y, Katayama K & Yamaguchi A (2007) Beclin 1 gene inhibits tumor growth in colon cancer cell lines. *Anticancer Res* 27: 1453–1457
- Kongara S, Kravchuk O, Teplova I, Lozy F, Schulte J, Moore D, Barnard N, Neumann CA, White E & Karantza V (2010) Autophagy regulates keratin 8 homeostasis in mammary epithelial cells and in breast tumors. *Mol Cancer Res MCR* 8: 873–884
- Korolchuk VI, Saiki S, Lichtenberg M, Siddiqi FH, Roberts EA, Imarisio S, Jahreiss L, Sarkar S, Futter M, Menzies FM, *et al* (2011) Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses. *Nat Cell Biol* 13: 453–460
- Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Sivridis E, Pitiakoudis M, Gatter KC & Harris AL (2010) Beclin 1 over- and underexpression in colorectal cancer: distinct patterns relate to prognosis and tumour hypoxia. *Br J Cancer* 103: 1209–1214
- Krick R, Muehe Y, Prick T, Bremer S, Schlotterhose P, Eskelinen E-L, Millen J, Goldfarb DS & Thumm M (2008) Piecemeal Microautophagy of the Nucleus Requires the Core Macroautophagy Genes. *Mol Biol Cell* 19: 4492–4505
- Kroemer G, Galluzzi L, Kepp O & Zitvogel L (2013) Immunogenic cell death in cancer therapy. *Annu Rev Immunol* 31: 51–72
- Krysko DV, Garg AD, Kaczmarek A, Krysko O, Agostinis P & Vandenabeele P (2012) Immunogenic cell death and DAMPs in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 12: 860–875
- Kvam E, Gable K, Dunn TM & Goldfarb DS (2005) Targeting of Tsc13p to nucleus-vacuole junctions: a role for very-long-chain fatty acids in the biogenesis of microautophagic vesicles. *Mol Biol Cell* 16: 3987–3998
- Kvam E & Goldfarb DS (2004) Nvj1p is the outer-nuclear-membrane receptor for oxysterol-binding protein homolog Osh1p in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 117: 4959–4968
- Kvam E & Goldfarb DS (2007) Nucleus-vacuole junctions and piecemeal microautophagy of the nucleus in *S. cerevisiae*. *Autophagy* 3: 85–92
- Lamb CA, Nühlen S, Judith D, Frith D, Snijders AP, Behrends C & Tooze SA (2016) TBC1D14 regulates autophagy via the TRAPP complex and ATG9 traffic. *EMBO J* 35: 281–301
- Landajuela A, Hervás JH, Antón Z, Montes LR, Gil D, Valle M, Rodríguez JF, Goñi FM & Alonso A (2016) Lipid Geometry and Bilayer Curvature Modulate LC3/GABARAP-Mediated Model Autophagosomal Elongation. *Biophys J* 110: 411–422

- Lau A, Wang X-J, Zhao F, Villeneuve NF, Wu T, Jiang T, Sun Z, White E & Zhang DD (2010) A noncanonical mechanism of Nrf2 activation by autophagy deficiency: direct interaction between Keap1 and p62. *Mol Cell Biol* 30: 3275–3285
- 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
- Lazarus MB, Novotny CJ & Shokat KM (2015) Structure of the Human Autophagy Initiating Kinase ULK1 in Complex with Potent Inhibitors. *ACS Chem Biol* 10: 257–261
- Le Grand JN, Chakrama FZ, Seguin-Py S, Fraichard A, Delage-Mourroux R, Jouvenot M & Boyer-Guittaut M (2011) GABARAPL1 (GEC1): original or copycat? *Autophagy* 7: 1098–1107
- Lee HK, Mattei LM, Steinberg BE, Alberts P, Lee YH, Chervonsky A, Mizushima N, Grinstein S & Iwasaki A (2010) In vivo requirement for Atg5 in antigen presentation by dendritic cells. *Immunity* 32: 227–239
- Lee IH & Finkel T (2009) Regulation of Autophagy by the p300 Acetyltransferase. *J Biol Chem* 284: 6322–6328
- Lee JW, Jeong EG, Soung YH, Nam SW, Lee JY, Yoo NJ & Lee SH (2006) Decreased expression of tumour suppressor Bax-interacting factor-1 (Bif-1), a Bax activator, in gastric carcinomas. *Pathology (Phila)* 38: 312–315
- Lefort S, Joffre C, Kieffer Y, Givel A-M, Bourachot B, Zago G, Bieche I, Dubois T, Meseure D, Vincent-Salomon A, *et al* (2014) Inhibition of autophagy as a new means of improving chemotherapy efficiency in high-LC3B triple-negative breast cancers. *Autophagy* 10: 2122–2142
- Lenz P, Bacot SM, Frazier-Jessen MR & Feldman GM (2003) Nucleoporation of dendritic cells: efficient gene transfer by electroporation into human monocyte-derived dendritic cells. *FEBS Lett* 538: 149–154
- Li B, Lei Z, Lichty BD, Li D, Zhang G-M, Feng Z-H, Wan Y & Huang B (2009a) Autophagy facilitates major histocompatibility complex class I expression induced by IFN- γ in B16 melanoma cells. *Cancer Immunol Immunother* 59: 313
- Li H, Li Y, Jiao J & Hu H-M (2011a) Alpha-alumina nanoparticles induce efficient autophagy-dependent cross-presentation and potent antitumour response. *Nat Nanotechnol* 6: 645–650
- Li W, Zhou M, Ren H, Hu H-M, Lu L, Cao M & Wang L (2013) Tumor-Derived Autophagosomes (DRibbles) Induce B Cell Activation in a TLR2-MyD88 Dependent Manner. *PLOS ONE* 8: e53564
- Li Y, Hahn T, Garrison K, Cui Z-H, Thorburn A, Thorburn J, Hu H-M & Akporiaye ET (2012) The vitamin E analog alpha-TEA stimulates tumor autophagy and enhances antigen cross-presentation. *Cancer Res* 72: 3535–3545
- Li Y, Wang L, Pang P, Twitty C, Fox BA, Aung S, Urba WJ & Hu H-M (2009b) Cross-presentation of tumor associated antigens through tumor-derived autophagosomes. *Autophagy* 5: 576–577

- Li Y, Wang L-X, Pang P, Cui Z, Aung S, Haley D, Fox BA, Urba WJ & Hu H-M (2011b) Tumor-derived autophagosome vaccine: mechanism of cross-presentation and therapeutic efficacy. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 17: 7047–7057
- Li Y, Wang L-X, Yang G, Hao F, Urba WJ & Hu H-M (2008) Efficient cross-presentation depends on autophagy in tumor cells. *Cancer Res* 68: 6889–6895
- Liang C, Lee J, Inn K, Gack MU, Li Q, Roberts EA, Vergne I, Deretic V, Feng P, Akazawa C, *et al* (2008) Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nat Cell Biol* 10: 776–787
- Liang 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
- Liao X, Li Y, Bonini C, Nair S, Gilboa E, Greenberg PD & Yee C (2004) Transfection of RNA Encoding Tumor Antigens Following Maturation of Dendritic Cells Leads to Prolonged Presentation of Antigen and the Generation of High-Affinity Tumor-Reactive Cytotoxic T Lymphocytes. *Mol Ther* 9: 757–764
- Lin X, Yang T, Wang S, Wang Z, Yun Y, Sun L, Zhou Y, Xu X, Akazawa C, Hong W, *et al* (2014) RILP interacts with HOPS complex via VPS41 subunit to regulate endocytic trafficking. *Sci Rep* 4: 1–12
- Liu C, Xia Y, Jiang W, Liu Y & Yu L (2014a) Low expression of GABARAPL1 is associated with a poor outcome for patients with hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep* 31: 2043–2048
- Liu H, He Z, von Rütte T, Yousefi S, Hunger RE & Simon H-U (2013a) Down-regulation of autophagy-related protein 5 (ATG5) contributes to the pathogenesis of early-stage cutaneous melanoma. *Sci Transl Med* 5: 202ra123
- Liu K-P, Zhou D, Ouyang D-Y, Xu L-H, Wang Y, Wang L-X, Pan H & He X-H (2013b) LC3B-II deacetylation by histone deacetylase 6 is involved in serum-starvation-induced autophagic degradation. *Biochem Biophys Res Commun* 441: 970–975
- Liu L, Feng D, Chen G, Chen M, Zheng Q, Song P, Ma Q, Zhu C, Wang R, Qi W, *et al* (2012) Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol* 14: 177–185
- Liu S, Yin L, Stroopinsky D, Rajabi H, Puissant A, Stegmaier K, Avigan D, Kharbanda S, Kufe D & Stone R (2014b) MUC1-C oncoprotein promotes FLT3 receptor activation in acute myeloid leukemia cells. *Blood* 123: 734–742
- Lock R, Roy S, Kenific CM, Su JS, Salas E, Ronen SM & Debnath J (2011) Autophagy facilitates glycolysis during Ras-mediated oncogenic transformation. *Mol Biol Cell* 22: 165–178
- Loi M, Gannagé M & Münz C (2016) ATGs help MHC class II, but inhibit MHC class I antigen presentation. *Autophagy* 12: 1681–1682
- 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 Q, Yang P, Huang X, Hu W, Guo B, Wu F, Lin L, Kovács AL, Yu L & Zhang H (2011) The WD40 Repeat PtdIns(3)P-Binding Protein EPG-6 Regulates Progression of Omegasomes to Autophagosomes. *Dev Cell* 21: 343–357

- Lu Z, Luo RZ, Lu Y, Zhang X, Yu Q, Khare S, Kondo S, Kondo Y, Yu Y, Mills GB, *et al* (2008) The tumor suppressor gene ARHI regulates autophagy and tumor dormancy in human ovarian cancer cells. *J Clin Invest* 118: 3917–3929
- Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T & Thompson CB (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120: 237–248
- Lutz MB, Kukutsch N, Ogilvie AL, Rössner S, Koch F, Romani N & Schuler G (1999) An advanced culture method for generating large quantities of highly pure dendritic cells from mouse bone marrow. *J Immunol Methods* 223: 77–92
- Lv M, Wang C, Li F, Peng J, Wen B, Gong Q, Shi Y & Tang Y (2017) Structural insights into the recognition of phosphorylated FUNDC1 by LC3B in mitophagy. *Protein Cell* 8: 25–38
- Lystad AH, Ichimura Y, Takagi K, Yang Y, Pankiv S, Kanegae Y, Kageyama S, Suzuki M, Saito I, Mizushima T, *et al* (2014) Structural determinants in GABARAP required for the selective binding and recruitment of ALFY to LC3B-positive structures. *EMBO Rep* 15: 557–565
- Ma Y, Galluzzi L, Zitvogel L & Kroemer G (2013) Autophagy and cellular immune responses. *Immunity* 39: 211–227
- Macintosh RL, Timpson P, Thorburn J, Anderson KI, Thorburn A & Ryan KM (2012) Inhibition of autophagy impairs tumor cell invasion in an organotypic model. *Cell Cycle Georget Tex* 11: 2022–2029
- Mahmutefendić H, Blagojević G, Kučić N & Lučin P (2007) Constitutive internalization of murine MHC class I molecules. *J Cell Physiol* 210: 445–455
- Malampati S, Song J-X, Chun-Kit Tong B, Nalluri A, Yang C-B, Wang Z, Gopalkrishnashetty Sreenivasmurthy S, Zhu Z, Liu J, Su C, *et al* (2020) Targeting Aggrephagy for the Treatment of Alzheimer’s Disease. *Cells* 9
- Mansuy V, Boireau W, Fraichard A, Schlick J-L, Jouvenot M & Delage-Mourroux R (2004) GEC1, a protein related to GABARAP, interacts with tubulin and GABAA receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 325: 639–648
- Mantovani A, Allavena P, Sica A & Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454: 436–444
- Martinez J, Cunha LD, Park S, Yang M, Lu Q, Orchard R, Li Q-Z, Yan M, Janke L, Guy C, *et al* (2016) Noncanonical autophagy inhibits the auto-inflammatory, lupus-like response to dying cells. *Nature* 533: 115–119
- Martinez-Vicente M, Tallozy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, de Vries R, Arias E, Harris S, Sulzer D, *et al* (2010) CARGO RECOGNITION FAILURE IS RESPONSIBLE FOR INEFFICIENT AUTOPHAGY IN HUNTINGTON’S DISEASE. *Nat Neurosci* 13: 567–576
- Martins I, Michaud M, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Shen S, Kepp O, Menger L, Vacchelli E, Galluzzi L, *et al* (2012) Premortem autophagy determines the immunogenicity of chemotherapy-induced cancer cell death. *Autophagy* 8: 413–415
- Martins I, Wang Y, Michaud M, Ma Y, Sukkurwala AQ, Shen S, Kepp O, Métivier D, Galluzzi L, Perfettini J-L, *et al* (2014) Molecular mechanisms of ATP secretion during immunogenic cell death. *Cell Death Differ* 21: 79–91

- Mathew R, Karp CM, Beaudoin B, Vuong N, Chen G, Chen H-Y, Bray K, Reddy A, Bhanot G, Gelinas C, *et al* (2009) Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62. *Cell* 137: 1062–1075
- Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, Chen G, Jin S & White E (2007) Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev* 21: 1367–1381
- Matsumoto G, Shimogori T, Hattori N & Nukina N (2015) TBK1 controls autophagosomal engulfment of polyubiquitinated mitochondria through p62/SQSTM1 phosphorylation. *Hum Mol Genet* 24: 4429–4442
- Matsunaga K, Morita E, Saitoh T, Akira S, Ktistakis NT, Izumi T, Noda T & Yoshimori T (2010) Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J Cell Biol* 190: 511–521
- Matsunaga K, Saitoh T, Tabata K, Omori H, Satoh T, Kurotori N, Maejima I, Shirahama-Noda K, Ichimura T, Isobe T, *et al* (2009) Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* 11: 385–396
- Mauthe M, Jacob A, Freiburger S, Hentschel K, Stierhof Y-D, Codogno P & Proikas-Cezanne T (2011) Resveratrol-mediated autophagy requires WIPI-1-regulated LC3 lipidation in the absence of induced phagophore formation. *Autophagy* 7: 1448–1461
- McEwan DG, Popovic D, Gubas A, Terawaki S, Suzuki H, Stadel D, Coxon FP, Miranda de Stegmann D, Bhogaraju S, Maddi K, *et al* (2015) PLEKHM1 Regulates Autophagosome-Lysosome Fusion through HOPS Complex and LC3/GABARAP Proteins. *Mol Cell* 57: 39–54
- Meacham CE & Morrison SJ (2013) Tumor heterogeneity and cancer cell plasticity. *Nature* 501: 328–337
- Miao Y, Zhang Y, Chen Y, Chen L & Wang F (2010) GABARAP is overexpressed in colorectal carcinoma and correlates with shortened patient survival. *Hepatology* 57: 257–261
- Michaud M, Martins I, Sukkurwala AQ, Adjemian S, Ma Y, Pellegatti P, Shen S, Kepp O, Scoazec M, Mignot G, *et al* (2011) Autophagy-dependent anticancer immune responses induced by chemotherapeutic agents in mice. *Science* 334: 1573–1577
- Mitchener JS, Shelburne JD, Bradford WD & Hawkins HK (1976) Cellular autophagocytosis induced by deprivation of serum and amino acids in HeLa cells. *Am J Pathol* 83: 485–492
- Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, Natsume T, Ohsumi Y & Yoshimori T (2003) Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* 116: 1679–1688
- Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, Klionsky DJ, Ohsumi M & Ohsumi Y (1998) A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* 395: 395–398

- Mizushima N, Yamamoto A, Hatano M, Kobayashi Y, Kabeya Y, Suzuki K, Tokuhiya T, Ohsumi Y & Yoshimori T (2001) Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 152: 657–668
- Mortimore GE & Schworer CM (1977) Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. *Nature* 270: 174–176
- Mukherjee A, Patel B, Koga H, Cuervo AM & Jenny A (2016) Selective endosomal microautophagy is starvation-inducible in *Drosophila*. *Autophagy* 12: 1984–1999
- Müller AJ & Proikas-Cezanne T (2015) Function of human WIPI proteins in autophagosomal rejuvenation of endomembranes? *FEBS Lett* 589: 1546–1551
- Mungai PT, Waypa GB, Jairaman A, Prakriya M, Dokic D, Ball MK & Schumacker PT (2011) Hypoxia Triggers AMPK Activation through Reactive Oxygen Species-Mediated Activation of Calcium Release-Activated Calcium Channels ν . *Mol Cell Biol* 31: 3531–3545
- Munz C (2012) Antigen Processing for MHC Class II Presentation via Autophagy. *Front Immunol* 3
- Nakamura S & Yoshimori T (2017) New insights into autophagosome–lysosome fusion. *J Cell Sci* 130: 1209–1216
- Nakatogawa H (2013) Two ubiquitin-like conjugation systems that mediate membrane formation during autophagy. *Essays Biochem* 55: 39–50
- Narendra D, Kane LA, Hauser DN, Fearnley IM & Youle RJ (2010a) p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy* 6: 1090–1106
- Narendra DP, Jin SM, Tanaka A, Suen D-F, Gautier CA, Shen J, Cookson MR & Youle RJ (2010b) PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol* 8: e1000298
- Nedjic J, Aichinger M, Emmerich J, Mizushima N & Klein L (2008) Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance. *Nature* 455: 396–400
- Nemos C, Mansuy V, Vernier-Magnin S, Fraichard A, Jouvenot M & Delage-Mourroux R (2003) Expression of *gac1*/GABARAPL1 versus GABARAP mRNAs in human: predominance of *gac1*/GABARAPL1 in the central nervous system. *Mol Brain Res* 119: 216–219
- Nguyen TN, Padman BS, Usher J, Oorschot V, Ramm G & Lazarou M (2016) Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome-lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *J Cell Biol* 215: 857–874
- Nikitina EY, Clark JI, Van Beynen J, Chada S, Virmani AK, Carbone DP & Gibrilovich DI (2001) Dendritic cells transduced with full-length wild-type p53 generate antitumor cytotoxic T lymphocytes from peripheral blood of cancer patients. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 7: 127–135

- Nimmerjahn F, Milosevic S, Behrends U, Jaffee EM, Pardoll DM, Bornkamm GW & Mautner J (2003) Major histocompatibility complex class II-restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur J Immunol* 33: 1250–1259
- 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
- Noda T, Fujita N & Yoshimori T (2009) The late stages of autophagy: how does the end begin? *Cell Death Differ* 16: 984–990
- Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, Rogov V, Löhr F, Popovic D, Occhipinti A, *et al* (2010) Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* 11: 45–51
- Novikoff AB (1959) The proximal tubule cell in experimental hydronephrosis. *J Biophys Biochem Cytol* 6: 136–138
- Novikoff AB & Essner E (1962) Cytolysosomes and mitochondrial degeneration. *J Cell Biol* 15: 140–146
- Obeid M, Tesniere A, Ghiringhelli F, Fimia GM, Apetoh L, Perfettini J-L, Castedo M, Mignot G, Panaretakis T, Casares N, *et al* (2007) Calreticulin exposure dictates the immunogenicity of cancer cell death. *Nat Med* 13: 54–61
- Obermajer N, Muthuswamy R, Lesnock J, Edwards RP & Kalinski P (2011) Positive feedback between PGE2 and COX2 redirects the differentiation of human dendritic cells toward stable myeloid-derived suppressor cells. *Blood* 118: 5498–5505
- Oku M & Sakai Y (2018) Three Distinct Types of Microautophagy Based on Membrane Dynamics and Molecular Machineries. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 40: e1800008
- Olsvik HL, Lamark T, Takagi K, Larsen KB, Evjen G, Øvervatn A, Mizushima T & Johansen T (2015) FYCO1 Contains a C-terminally Extended, LC3A/B-preferring LC3-interacting Region (LIR) Motif Required for Efficient Maturation of Autophagosomes during Basal Autophagy. *J Biol Chem* 290: 29361–29374
- Orsi A, Razi M, Dooley HC, Robinson D, Weston AE, Collinson LM & Tooze SA (2012) Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol Biol Cell* 23: 1860–1873
- Osada T, Clay T, Hobeika A, Lyerly HK & Morse MA (2006) NK cell activation by dendritic cell vaccine: a mechanism of action for clinical activity. *Cancer Immunol Immunother* 55: 1122–1131
- Ostrand-Rosenberg S, Horn LA & Haile ST (2014) The Programmed Death-1 Immune Suppressive Pathway: Barrier to Anti-Tumor Immunity. *J Immunol Baltim Md* 193: 3835–3841
- Palucka AK, Ueno H, Connolly J, Kerneis-Norvell F, Blanck J-P, Johnston DA, Fay J & Banchereau J (2006) Dendritic Cells Loaded With Killed Allogeneic Melanoma Cells can Induce Objective Clinical Responses and MART-1 Specific CD8+ T-cell Immunity. *J Immunother* 29: 545–557

- Paludan C, Schmid D, Landthaler M, Vockerodt M, Kube D, Tuschl T & Münz C (2005) Endogenous MHC Class II Processing of a Viral Nuclear Antigen After Autophagy. *Science* 307: 593–596
- Pankiv S, Alemu EA, Brech A, Bruun J-A, Lamark T, Øvervatn A, Bjørkøy G & Johansen T (2010) FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport. *J Cell Biol* 188: 253–269
- 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
- Parekh VV, Pabbisetty SK, Wu L, Sebzda E, Martinez J, Zhang J & Kaer LV (2017) Autophagy-related protein Vps34 controls the homeostasis and function of antigen cross-presenting CD8 α ⁺ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci* 114: E6371–E6380
- Park J-M, Seo M, Jung CH, Grunwald D, Stone M, Otto NM, Toso E, Ahn Y, Kyba M, Griffin TJ, *et al* (2018) ULK1 phosphorylates Ser30 of BECN1 in association with ATG14 to stimulate autophagy induction. *Autophagy* 14: 584–597
- Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD & Levine B (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122: 927–939
- Pellerin I, Vuillermoz C, Jouvenot M, Ordener C, Royez M & Adessi GL (1993) Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells. *Mol Cell Endocrinol* 90: R17-21
- Peng Y-F, Shi Y-H, Ding Z-B, Ke A-W, Gu C-Y, Hui B, Zhou J, Qiu S-J, Dai Z & Fan J (2013a) Autophagy inhibition suppresses pulmonary metastasis of HCC in mice via impairing anoikis resistance and colonization of HCC cells. *Autophagy* 9: 2056–2068
- Peng Y-F, Shi Y-H, Shen Y-H, Ding Z-B, Ke A-W, Zhou J, Qiu S-J & Fan J (2013b) Promoting colonization in metastatic HCC cells by modulation of autophagy. *PLoS One* 8: e74407
- Pérez L, McLetchie S, Gardiner GJ, Deffit SN, Zhou D & Blum JS (2016) LAMP-2C Inhibits MHC Class II Presentation of Cytoplasmic Antigens by Disrupting Chaperone-Mediated Autophagy. *J Immunol* 196: 2457–2465
- Perlmutter DH (2009) Autophagic disposal of the aggregation-prone protein that causes liver inflammation and carcinogenesis in α -1-antitrypsin deficiency. *Cell Death Differ* 16: 39–45
- Pickford F, Masliah E, Britschgi M, Lucin K, Narasimhan R, Jaeger PA, Small S, Spencer B, Rockenstein E, Levine B, *et al* (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
- Pinan-Lucarré B, Balguerie A & Clavé C (2005) Accelerated cell death in *Podospora* autophagy mutants. *Eukaryot Cell* 4: 1765–1774
- Poillet-Perez L, Jacquet M, Hervouet E, Gauthier T, Fraichard A, Borg C, Pallandre J-R, Gonzalez BJ, Ramdani Y, Boyer-Guittaut M, *et al* (2017) GABARAPL1 tumor suppressive function is independent of its conjugation to autophagosomes in MCF-7 breast cancer cells. *Oncotarget* 8: 55998–56020

- Polson HEJ, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Urbé S, Clague MJ & Tooze SA (2010) Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy* 6: 506–522
- Popovic D, Akutsu M, Novak I, Harper JW, Behrends C & Dikic I (2012) Rab GTPase-activating proteins in autophagy: regulation of endocytic and autophagy pathways by direct binding to human ATG8 modifiers. *Mol Cell Biol* 32: 1733–1744
- Popovic D & Dikic I (2014) TBC1D5 and the AP2 complex regulate ATG9 trafficking and initiation of autophagy. *EMBO Rep* 15: 392–401
- Poüs C & Codogno P (2011) Lysosome positioning coordinates mTORC1 activity and autophagy. *Nat Cell Biol* 13: 342–344
- Puente C, Hendrickson RC & Jiang X (2016) Nutrient-regulated Phosphorylation of ATG13 Inhibits Starvation-induced Autophagy. *J Biol Chem* 291: 6026–6035
- Qian W, Liu J, Jin J, Ni W & Xu W (2007) Arsenic trioxide induces not only apoptosis but also autophagic cell death in leukemia cell lines via up-regulation of Beclin-1. *Leuk Res* 31: 329–339
- Qiu D-M, Wang G-L, Chen L, Xu Y-Y, He S, Cao X-L, Qin J, Zhou J-M, Zhang Y-X & E Q (2014) The expression of beclin-1, an autophagic gene, in hepatocellular carcinoma associated with clinical pathological and prognostic significance. *BMC Cancer* 14: 327
- Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, Rosen J, Eskelinen E-L, Mizushima N, Ohsumi Y, *et al* (2003) Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest* 112: 1809–1820
- Rabinowitz JD & White E (2010) Autophagy and Metabolism. *Science* 330: 1344–1348
- Rahn JJ, Dabbagh L, Pasdar M & Hugh JC (2001) The importance of MUC1 cellular localization in patients with breast carcinoma: an immunohistologic study of 71 patients and review of the literature. *Cancer* 91: 1973–1982
- Rausch V, Liu L, Apel A, Rettig T, Gladkich J, Labsch S, Kallifatidis G, Kaczorowski A, Groth A, Gross W, *et al* (2012) Autophagy mediates survival of pancreatic tumour-initiating cells in a hypoxic microenvironment. *J Pathol* 227: 325–335
- 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
- Ravikumar B, Vacher C, Berger Z, Davies JE, Luo S, Oroz LG, Scaravilli F, Easton DF, Duden R, O’Kane CJ, *et al* (2004) Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat Genet* 36: 585–595
- Rho SB, Byun H-J, Kim B-R, Kim IS, Lee JH, Yoo R, Park ST & Park SH (2013) GABAA receptor-binding protein promotes sensitivity to apoptosis induced by chemotherapeutic agents. *Int J Oncol* 42: 1807–1814
- Richter B, Sliter DA, Herhaus L, Stolz A, Wang C, Beli P, Zaffagnini G, Wild P, Martens S, Wagner SA, *et al* (2016) Phosphorylation of OPTN by TBK1 enhances its binding to Ub chains

- and promotes selective autophagy of damaged mitochondria. *Proc Natl Acad Sci* 113: 4039–4044
- Riedel A, Nimmerjahn F, Burdach S, Behrends U, Bornkamm GW & Mautner J (2008) Endogenous presentation of a nuclear antigen on MHC class II by autophagy in the absence of CRM1-mediated nuclear export. *Eur J Immunol* 38: 2090–2095
- Riley BE, Lougheed JC, Callaway K, Velasquez M, Brecht E, Nguyen L, Shaler T, Walker D, Yang Y, Regnstrom K, *et al* (2013) Structure and function of Parkin E3 ubiquitin ligase reveals aspects of RING and HECT ligases. *Nat Commun* 4
- Robb GB, Carson AR, Tai SC, Fish JE, Singh S, Yamada T, Scherer SW, Nakabayashi K & Marsden PA (2004) Post-transcriptional Regulation of Endothelial Nitric-oxide Synthase by an Overlapping Antisense mRNA Transcript. *J Biol Chem* 279: 37982–37996
- Robert J (2013) mTOR, une protéine multifonctionnelle impliquée (entre autres) dans l'angiogenèse. 8
- Roberts P, Moshitch-Moshkovitz S, Kvam E, O'Toole E, Winey M & Goldfarb DS (2003) Piecemeal microautophagy of nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 14: 129–141
- Roberts SS, Mori M, Pattee P, Lapidus J, Mathews R, O'Malley JP, Hsieh YC, Turner MA, Wang Z, Tian Q, *et al* (2004) GABAergic system gene expression predicts clinical outcome in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol Off J Am Soc Clin Oncol* 22: 4127–4134
- Rodgers MA, Bowman JW, Liang Q & Jung JU (2014) Regulation where autophagy intersects the inflammasome. *Antioxid Redox Signal* 20: 495–506
- Rogov V, Dötsch V, Johansen T & Kirkin V (2014) Interactions between Autophagy Receptors and Ubiquitin-like Proteins Form the Molecular Basis for Selective Autophagy. *Mol Cell* 53: 167–178
- Rogov VV, Stolz A, Ravichandran AC, Rios-Szwed DO, Suzuki H, Kniss A, Löhr F, Wakatsuki S, Dötsch V, Dikic I, *et al* (2017) Structural and functional analysis of the GABARAP interaction motif (GIM). *EMBO Rep* 18: 1382–1396
- Rojas-Sepúlveda D, Tittarelli A, Gleisner MA, Ávalos I, Pereda C, Gallegos I, González FE, López MN, Butte JM, Roa JC, *et al* (2018) Tumor lysate-based vaccines: on the road to immunotherapy for gallbladder cancer. *Cancer Immunol Immunother* 67: 1897–1910
- Romao S, Gasser N, Becker AC, Guhl B, Bajagic M, Vanoaica D, Ziegler U, Roesler J, Dengjel J, Reichenbach J, *et al* (2013) Autophagy proteins stabilize pathogen-containing phagosomes for prolonged MHC II antigen processing. *J Cell Biol* 203: 757–766
- Russell RC, Tian Y, Yuan H, Park HW, Chang Y-Y, Kim J, Kim H, Neufeld TP, Dillin A & Guan K-L (2013) ULK1 induces autophagy by phosphorylating Beclin-1 and activating VPS34 lipid kinase. *Nat Cell Biol* 15: 741–750
- Ryan BJ, Hoek S, Fon EA & Wade-Martins R (2015) Mitochondrial dysfunction and mitophagy in Parkinson's: from familial to sporadic disease. *Trends Biochem Sci* 40: 200–210
- Sabado RL & Bhardwaj N (2013) Dendritic cell immunotherapy. *Ann N Y Acad Sci* 1284: 31–45
- Sabado RL & Bhardwaj N (2015) Dendritic-cell vaccines on the move. *Nature* 519: 300–301

- Sadanaga N, Nagashima H, Mashino K, Tahara K, Yamaguchi H, Ohta M, Fujie T, Tanaka F, Inoue H, Takesako K, *et al* (2001) Dendritic cell vaccination with MAGE peptide is a novel therapeutic approach for gastrointestinal carcinomas. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res* 7: 2277–2284
- Sahu R, Kaushik S, Clement CC, Cannizzo ES, Scharf B, Follenzi A, Potolicchio I, Nieves E, Cuervo AM & Santambrogio L (2011) Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell* 20: 131–139
- Saini NK, Baena A, Ng TW, Venkataswamy MM, Kennedy SC, Kunnath-Velayudhan S, Carreño LJ, Xu J, Chan J, Larsen MH, *et al* (2016) Suppression of autophagy and antigen presentation by *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS47. *Nat Microbiol* 1: 16133
- Saito H, Inazawa J, Saito S, Kasumi F, Koi S, Sagae S, Kudo R, Saito J, Noda K & Nakamura Y (1993) Detailed deletion mapping of chromosome 17q in ovarian and breast cancers: 2-cM region on 17q21.3 often and commonly deleted in tumors. *Cancer Res* 53: 3382–3385
- Saito T, Ichimura Y, Taguchi K, Suzuki T, Mizushima T, Takagi K, Hirose Y, Nagahashi M, Iso T, Fukutomi T, *et al* (2016) p62/Sqstm1 promotes malignancy of HCV-positive hepatocellular carcinoma through Nrf2-dependent metabolic reprogramming. *Nat Commun* 7: 12030
- Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang B-G, Satoh T, Omori H, Noda T, Yamamoto N, Komatsu M, *et al* (2008) Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production. *Nature* 456: 264–268
- 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
- Sanjuan MA, Dillon CP, Tait SWG, Moshiah S, Dorsey F, Connell S, Komatsu M, Tanaka K, Cleveland JL, Withoff S, *et al* (2007) Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. *Nature* 450: 1253–1257
- Scherz-Shouval R, Sagiv Y, Shorer H & Elazar Z (2003) The COOH Terminus of GATE-16, an Intra-Golgi Transport Modulator, Is Cleaved by the Human Cysteine Protease HsApg4A. *J Biol Chem* 278: 14053–14058
- Schmid D, Pypaert M & Münz C (2007) MHC class II antigen loading compartments continuously receive input from autophagosomes. *Immunity* 26: 79–92
- Schweers RL, Zhang J, Randall MS, Loyd MR, Li W, Dorsey FC, Kundu M, Opferman JT, Cleveland JL, Miller JL, *et al* (2007) NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci* 104: 19500–19505
- Schworer CM & Mortimore GE (1979) Glucagon-induced autophagy and proteolysis in rat liver: mediation by selective deprivation of intracellular amino acids. *Proc Natl Acad Sci* 76: 3169–3173
- Segovia J, Sabbah A, Mgbemena V, Tsai S-Y, Chang T-H, Berton MT, Morris IR, Allen IC, Ting JP-Y & Bose S (2012) TLR2/MyD88/NF-κB pathway, reactive oxygen species, potassium efflux activates NLRP3/ASC inflammasome during respiratory syncytial virus infection. *PLoS One* 7: e29695
- Sekine S & Youle RJ (2018) PINK1 import regulation; a fine system to convey mitochondrial stress to the cytosol. *BMC Biol* 16: 2

- Seliger B, Wollscheid U, Momburg F, Blankenstein T & Huber C (2001) Characterization of the Major Histocompatibility Complex Class I Deficiencies in B16 Melanoma Cells. *Cancer Res* 61: 1095–1099
- Shen W-C, Li H-Y, Chen G-C, Chern Y & Tu P (2015) Mutations in the ubiquitin-binding domain of OPTN/optineurin interfere with autophagy-mediated degradation of misfolded proteins by a dominant-negative mechanism. *Autophagy* 11: 685–700
- Shen Y, Li D-D, Wang L-L, Deng R & Zhu X-F (2008) Decreased expression of autophagy-related proteins in malignant epithelial ovarian cancer. *Autophagy* 4: 1067–1068
- Shi C-S, Shenderov K, Huang N-N, Kabat J, Abu-Asab M, Fitzgerald KA, Sher A & Kehrl JH (2012) Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1 β production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction. *Nat Immunol* 13: 255–263
- Shi J, Fung G, Deng H, Zhang J, Fiesel FC, Springer W, Li X & Luo H (2015) NBR1 is dispensable for PARK2-mediated mitophagy regardless of the presence or absence of SQSTM1. *Cell Death Dis* 6: e1943–e1943
- Shibue T & Weinberg RA (2017) EMT, CSCs, and drug resistance: the mechanistic link and clinical implications. *Nat Rev Clin Oncol* 14: 611–629
- Simon GG, Hu Y, Khan AM, Zhou J, Salmon J, Chikhlikar PR, Jung K-O, Marques ETA & August JT (2010) Dendritic cell mediated delivery of plasmid DNA encoding LAMP/HIV-1 Gag fusion immunogen enhances T cell epitope responses in HLA DR4 transgenic mice. *PLoS One* 5: e8574
- Simonsen A, Birkeland HCG, Gillooly DJ, Mizushima N, Kuma A, Yoshimori T, Slagsvold T, Brech A & Stenmark H (2004) Alfy, a novel FYVE-domain-containing protein associated with protein granules and autophagic membranes. *J Cell Sci* 117: 4239–4251
- Singh B, Chatterjee A, Ronghe AM, Bhat NK & Bhat HK (2013) Antioxidant-mediated up-regulation of OGG1 via NRF2 induction is associated with inhibition of oxidative DNA damage in estrogen-induced breast cancer. *BMC Cancer* 13: 253
- Singh R & Cuervo AM (2011) Autophagy in the cellular energetic balance. *Cell Metab* 13: 495–504
- Sistigu A, Yamazaki T, Vacchelli E, Chaba K, Enot DP, Adam J, Vitale I, Goubar A, Baracco EE, Remédios C, *et al* (2014) Cancer cell-autonomous contribution of type I interferon signaling to the efficacy of chemotherapy. *Nat Med* 20: 1301–1309
- Skytte MR, Moulleron S, Kumar BS, Wirth M, Lee R, Bowitz KL, Abudu YP, O'Reilly N, Sjøttem E, Tooze SA, *et al* (2017) ATG4B contains a C-terminal LIR motif important for binding and efficient cleavage of mammalian orthologs of yeast Atg8. *Autophagy* 13: 834–853
- Son Y, Cheong Y-K, Kim N-H, Chung H-T, Kang DG & Pae H-O (2011) Mitogen-Activated Protein Kinases and Reactive Oxygen Species: How Can ROS Activate MAPK Pathways? *J Signal Transduct* 2011
- Song J, Qu Z, Guo X, Zhao Q, Zhao X, Gao L, Sun K, Shen F, Wu M & Wei L (2009) Hypoxia-induced autophagy contributes to the chemoresistance of hepatocellular carcinoma cells. *Autophagy* 5: 1131–1144

- Sonpavde G, Wang M, Peterson LE, Wang HY, Joe T, Mims MP, Kadmon D, Ittmann MM, Wheeler TM, Gee AP, *et al* (2014) HLA-restricted NY-ESO-1 peptide immunotherapy for metastatic castration resistant prostate cancer. *Invest New Drugs* 32: 235–242
- Sosa MS, Bragado P & Aguirre-Ghiso JA (2014) Mechanisms of disseminated cancer cell dormancy: an awakening field. *Nat Rev Cancer* 14: 611–622
- Stober D, Trobonjaca Z, Reimann J & Schirmbeck R (2002) Dendritic cells pulsed with exogenous hepatitis B surface antigen particles efficiently present epitopes to MHC class I-restricted cytotoxic T cells. *Eur J Immunol* 32: 1099–1108
- Strappazon F, Nazio F, Corrado M, Cianfanelli V, Romagnoli A, Fimia GM, Campello S, Nardacci R, Piacentini M, Campanella M, *et al* (2015) AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death Differ* 22: 419–432
- Su S, Zhou H, Xue M, Liu J-Y, Ding L, Cao M, Zhou Z-X, Hu H-M & Wang L-X (2013) Anti-tumor efficacy of a hepatocellular carcinoma vaccine based on dendritic cells combined with tumor-derived autophagosomes in murine models. *Asian Pac J Cancer Prev APJCP* 14: 3109–3116
- Su W, Li S, Chen X, Yin L, Ma P, Ma Y & Su B (2016) GABARAPL1 suppresses metastasis by counteracting PI3K/Akt pathway in prostate cancer. *Oncotarget* 8: 4449–4459
- Su Y, Qian H, Zhang J, Wang S, Shi P & Peng X (2005) The diversity expression of p62 in digestive system cancers. *Clin Immunol Orlando Fla* 116: 118–123
- Sumimoto H, Kamakura S & Ito T (2007) Structure and Function of the PB1 Domain, a Protein Interaction Module Conserved in Animals, Fungi, Amoebas, and Plants. *Sci STKE* 2007: re6–re6
- Sun Q, Westphal W, Wong KN, Tan I & Zhong Q (2010) Rubicon controls endosome maturation as a Rab7 effector. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 19338–19343
- Sun Q, Zhang J, Fan W, Wong KN, Ding X, Chen S & Zhong Q (2011) The RUN domain of rubicon is important for hVps34 binding, lipid kinase inhibition, and autophagy suppression. *J Biol Chem* 286: 185–191
- Sun QF, Zhao XN, Peng CL, Hao YT, Zhao YP, Jiang N, Xue H, Guo JZ, Yun CH, Cong B, *et al* (2015) Immunotherapy for Lewis lung carcinoma utilizing dendritic cells infected with CK19 gene recombinant adenoviral vectors. *Oncol Rep* 34: 2289
- Sun W-L (2016) Ambra1 in autophagy and apoptosis: Implications for cell survival and chemotherapy resistance (Review). *Oncol Lett* 12: 367–374
- Suri A, Walters JJ, Rohrs HW, Gross ML & Unanue ER (2008) First signature of islet beta-cell-derived naturally processed peptides selected by diabetogenic class II MHC molecules. *J Immunol Baltim Md 1950* 180: 3849–3856
- Symposium on Lysosomes, De Duve C, De Reuck AVS, Cameron MP, & Ciba Foundation eds. (1963) Ciba Foundation Symposium: Lysosomes: [proceedings Boston, Mass.: Little, Brown
- Tabata K, Matsunaga K, Sakane A, Sasaki T, Noda T & Yoshimori T (2010) Rubicon and PLEKHM1 negatively regulate the endocytic/autophagic pathway via a novel Rab7-binding domain. *Mol Biol Cell* 21: 4162–4172

- Taguchi K, Motohashi H & Yamamoto M (2011) Molecular mechanisms of the Keap1–Nrf2 pathway in stress response and cancer evolution. *Genes Cells Devoted Mol Cell Mech* 16: 123–140
- Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cualing HD, Sun M, Sato Y, Liang C, Jung JU, Cheng JQ, Mulé JJ, *et al* (2007) Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 9: 1142–1151
- Takahashi Y, He H, Tang Z, Hattori T, Liu Y, Young MM, Serfass JM, Chen L, Gebru M, Chen C, *et al* (2018) An autophagy assay reveals the ESCRT-III component CHMP2A as a regulator of phagophore closure. *Nat Commun* 9
- Takahashi Y, Liang X, Hattori T, Tang Z, He H, Chen H, Liu X, Abraham T, Imamura-Kawasawa Y, Buchkovich NJ, *et al* (2019) VPS37A directs ESCRT recruitment for phagophore closure. *J Cell Biol* 218: 3336–3354
- Takahashi Y, Meyerkord CL, Hori T, Runkle K, Fox TE, Kester M, Loughran TP & Wang H-G (2011) Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy* 7: 61–73
- 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, Piracs K, Nagy P, Varga Á, Kárpáti M, Hegedűs K, Kramer H, Kovács AL, Sass M & Juhász G (2014) Interaction of the HOPS complex with Syntaxin 17 mediates autophagosome clearance in *Drosophila*. *Mol Biol Cell* 25: 1338–1354
- Takehige 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
- Tanida I, Ueno T & Kominami E (2004) Human light chain 3/MAP1LC3B is cleaved at its carboxyl-terminal Met121 to expose Gly120 for lipidation and targeting to autophagosomal membranes. *J Biol Chem* 279: 47704–47710
- Tey S-K & Khanna R (2012) Autophagy mediates transporter associated with antigen processing-independent presentation of viral epitopes through MHC class I pathway. *Blood* 120: 994–1004
- Thomas L (1982) On immunosurveillance in human cancer. *Yale J Biol Med* 55: 329–333
- Thumm M, Egner R, Koch B, Schlumpberger M, Straub M, Veenhuis M & Wolf DH (1994) Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 349: 275–280
- 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
- Tong Y, You L, Liu H, Li L, Meng H, Qian Q & Qian W (2013) Potent antitumor activity of oncolytic adenovirus expressing Beclin-1 via induction of autophagic cell death in leukemia. *Oncotarget* 4: 860–874

- Torgersen ML, Engedal N, Bøe S-O, Hokland P & Simonsen A (2013) Targeting autophagy potentiates the apoptotic effect of histone deacetylase inhibitors in t(8;21) AML cells. *Blood* 122: 2467–2476
- Trempe J-F, Sauvé V, Grenier K, Seirafi M, Tang MY, Ménade M, Al-Abdul-Wahid S, Krett J, Wong K, Kozlov G, *et al* (2013) Structure of parkin reveals mechanisms for ubiquitin ligase activation. *Science* 340: 1451–1455
- Trombetta ES & Mellman I (2004) Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo. *Annu Rev Immunol* 23: 975–1028
- Tsuboyama K, Koyama-Honda I, Sakamaki Y, Koike M, Morishita H & Mizushima N (2016) The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane. *Science* 354: 1036–1041
- Tsukada M & Ohsumi Y (1993) Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 333: 169–174
- Twitty CG, Jensen SM, Hu H-M & Fox BA (2011) Tumor-Derived Autophagosome Vaccine: Induction of Cross-Protective Immune Responses against Short-lived Proteins through a p62-Dependent Mechanism. *Clin Cancer Res* 17: 6467–6481
- Uhl M, Kepp O, Jusforgues-Saklani H, Vicencio J-M, Kroemer G & Albert ML (2009) Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8⁺ T cells. *Cell Death Differ* 16: 991–1005
- Valencia T, Kim JY, Abu-Baker S, Moscat-Pardos J, Ahn CS, Reina-Campos M, Duran A, Castilla EA, Metallo CM, Diaz-Meco MT, *et al* (2014) Metabolic reprogramming of stromal fibroblasts through p62-mTORC1 signaling promotes inflammation and tumorigenesis. *Cancer Cell* 26: 121–135
- Van Tendeloo VF, Ponsaerts P, Lardon F, Nijs G, Lenjou M, Van Broeckhoven C, Van Bockstaele DR & Berneman ZN (2001) Highly efficient gene delivery by mRNA electroporation in human hematopoietic cells: superiority to lipofection and passive pulsing of mRNA and to electroporation of plasmid cDNA for tumor antigen loading of dendritic cells. *Blood* 98: 49–56
- van de Ven K & Borst J (2015) Targeting the T-cell co-stimulatory CD27/CD70 pathway in cancer immunotherapy: rationale and potential. *Immunotherapy* 7: 655–667
- Vernier-Magnin S, Muller S, Sallot M, Radom J, Musard JF, Adami P, Dulieu P, Rémy-Martin JP, Jouvenot M & Fraichard A (2001) A novel early estrogen-regulated gene *gec1* encodes a protein related to GABARAP. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 118–125
- von Muhlinen N, Akutsu M, Ravenhill BJ, Foeglein Á, Bloor S, Rutherford TJ, Freund SMV, Komander D & Randow F (2012) LC3C, Bound Selectively by a Noncanonical LIR Motif in NDP52, Is Required for Antibacterial Autophagy. *Mol Cell* 48: 329–342
- Wang H, Bedford FK, Brandon NJ, Moss SJ & Olsen RW (1999) GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton. *Nature* 397: 69–72
- Wang H, Sun H-Q, Zhu X, Zhang L, Albanesi J, Levine B & Yin H (2015) GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome:lysosome fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112: 7015–7020

- Wang Z, Xu L, Duan Z, Zeng L, Yan N & Peng Z (2007) Beclin 1-mediated macroautophagy involves regulation of caspase-9 expression in cervical cancer HeLa cells. *Gynecol Oncol* 107: 107–113
- Webber JL & Tooze SA (2010) Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 and p38IP. *EMBO J* 29: 27–40
- Wei Y, Pattingre S, Sinha S, Bassik M & Levine B (2008) JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy. *Mol Cell* 30: 678–688
- 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
- Welters MJP, Kenter GG, Piersma SJ, Vloon APG, Löwik MJG, Meer DMAB der, Drijfhout JW, Valentijn ARPM, Wafelman AR, Oostendorp J, *et al* (2008) Induction of Tumor-Specific CD4+ and CD8+ T-Cell Immunity in Cervical Cancer Patients by a Human Papillomavirus Type 16 E6 and E7 Long Peptides Vaccine. *Clin Cancer Res* 14: 178–187
- Wen Z-F, Liu H, Gao R, Zhou M, Ma J, Zhang Y, Zhao J, Chen Y, Zhang T, Huang F, *et al* (2018) Tumor cell-released autophagosomes (TRAPs) promote immunosuppression through induction of M2-like macrophages with increased expression of PD-L1. *J Immunother Cancer* 6: 151
- White E, Karp C, Strohecker AM, Guo Y & Mathew R (2010) Role of autophagy in suppression of inflammation and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 22: 212–217
- 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. *Nat Commun* 7: 1–14
- Wild P, Farhan H, McEwan DG, Wagner S, Rogov VV, Brady NR, Richter B, Korac J, Waidmann O, Choudhary C, *et al* (2011) Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. *Science* 333: 228–233
- Winslow AR, Chen C-W, Corrochano S, Acevedo-Arozena A, Gordon DE, Peden AA, Lichtenberg M, Menzies FM, Ravikumar B, Imarisio S, *et al* (2010) α -Synuclein impairs macroautophagy: implications for Parkinson's disease. *J Cell Biol* 190: 1023–1037
- Wolfel T, Hauer M, Schneider J, Serrano M, Wolfel C, Klehmann-Hieb E, Plaen ED, Hankeln T, Buschenfelde KM zum & Beach D (1995) A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. *Science* 269: 1281–1284
- Wong YC & Holzbaur ELF (2014) Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: E4439–4448
- Wu F, Watanabe Y, Guo X-Y, Qi X, Wang P, Zhao H-Y, Wang Z, Fujioka Y, Zhang H, Ren J-Q, *et al* (2015a) Structural Basis of the Differential Function of the Two *C. elegans* Atg8 Homologs, LGG-1 and LGG-2, in Autophagy. *Mol Cell* 60: 914–929
- Wu S, Sun C, Tian D, Li Y, Gao X, He S & Li T (2015b) Expression and clinical significances of Beclin1, LC3 and mTOR in colorectal cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 8: 3882–3891

- Würtzen PA, Nissen MH & Claesson MH (2001) Maturation of dendritic cells by recombinant human CD40L-trimer leads to a homogeneous cell population with enhanced surface marker expression and increased cytokine production. *Scand J Immunol* 53: 579–587
- Xh L, Lk K, Hh J, G G, Je G, G B, B H & B L (1998) Protection Against Fatal Sindbis Virus Encephalitis by Beclin, a Novel Bcl-2-interacting Protein. *J Virol* 72
- Xing Y, Cao R & Hu H-M (2016) TLR and NLRP3 inflammasome-dependent innate immune responses to tumor-derived autophagosomes (DRibbles). *Cell Death Dis* 7: e2322
- Yamada T, Carson AR, Caniggia I, Umabayashi K, Yoshimori T, Nakabayashi K & Scherer SW (2005) Endothelial Nitric-oxide Synthase Antisense (NOS3AS) Gene Encodes an Autophagy-related Protein (APG9-like2) Highly Expressed in Trophoblast. *J Biol Chem* 280: 18283–18290
- Yamamoto K, Venida A, Yano J, Biancur DE, Kakiuchi M, Gupta S, Sohn ASW, Mukhopadhyay S, Lin EY, Parker SJ, *et al* (2020) Autophagy promotes immune evasion of pancreatic cancer by degrading MHC-I. *Nature* 581: 100–105
- Yang J-Y, Cao D-Y, Xue Y, Yu Z-C & Liu W-C (2010) Improvement of dendritic-based vaccine efficacy against hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma by two tumor-associated antigen gene-infected dendritic cells. *Hum Immunol* 71: 255–262
- Yang Z & Klionsky DJ (2009) An Overview of the Molecular Mechanism of Autophagy. *Curr Top Microbiol Immunol* 335: 1–32
- Yang Z & Klionsky DJ (2010) Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 22: 124–131
- Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E & Eskelinen E-L (2009) 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 5: 1180–1185
- Yoon M-S (2017) The Role of Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) in Insulin Signaling. *Nutrients* 9
- Youn J-I, Nagaraj S, Collazo M & Gabrilovich DI (2008) Subsets of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Tumor Bearing Mice. *J Immunol Baltim Md 1950* 181: 5791–5802
- Young ARJ, Chan EYW, Hu XW, Köchl R, Crawshaw SG, High S, Hailey DW, Lippincott-Schwartz J & Tooze SA (2006) Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* 119: 3888–3900
- Young ARJ, Narita M, Ferreira M, Kirschner K, Sadaie M, Darot JFJ, Tavaré S, Arakawa S, Shimizu S, Watt FM, *et al* (2009) Autophagy mediates the mitotic senescence transition. *Genes Dev* 23: 798–803
- Yu G, Li Y, Cui Z, Morris NP, Weinberg AD, Fox BA, Urba WJ, Wang L & Hu H-M (2016) Combinational Immunotherapy with Allo-DRibble Vaccines and Anti-OX40 Co-Stimulation Leads to Generation of Cross-Reactive Effector T Cells and Tumor Regression. *Sci Rep* 6: 37558
- Yu G, Moudgil T, Cui Z, Mou Y, Wang L, Fox BA & Hu H-M (2017) Ubiquitinated Proteins Isolated From Tumor Cells Are Efficient Substrates for Antigen Cross-Presentation. *J Immunother Hagerstown Md 1997* 40: 155–163

- Yu Z-Q, Ni T, Hong B, Wang H-Y, Jiang F-J, Zou S, Chen Y, Zheng X-L, Klionsky DJ, Liang Y, *et al* (2012) Dual roles of Atg8-PE deconjugation by Atg4 in autophagy. *Autophagy* 8: 883–892
- 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* 100: 15077–15082
- Zeng H, Zhang W, Gong Y & Xie C (2019) Radiotherapy activates autophagy to increase CD8+ T cell infiltration by modulating major histocompatibility complex class-I expression in non-small cell lung cancer. *J Int Med Res* 47: 3818–3830
- Zhang J, Culp ML, Craver JG & Darley-Usmar V (2018) Mitochondrial function and autophagy: integrating proteotoxic, redox, and metabolic stress in Parkinson's disease. *J Neurochem* 144: 691–709
- Zhen Y, Spangenberg H, Munson MJ, Brech A, Schink KO, Tan K-W, Sørensen V, Wenzel EM, Radulovic M, Engedal N, *et al* (2020) ESCRT-mediated phagophore sealing during mitophagy. *Autophagy* 16: 826–841
- Zhong Y, Wang QJ, Li X, Yan Y, Backer JM, Chait BT, Heintz N & Yue Z (2009) Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol 3-kinase complex. *Nat Cell Biol* 11: 468–476
- Zhong Z, Sanchez-Lopez E & Karin M (2016) Autophagy, Inflammation and Immunity: A Troika Governing Cancer and Its Treatment. *Cell* 166: 288–298
- Zhou C, Ma K, Gao R, Mu C, Chen L, Liu Q, Luo Q, Feng D, Zhu Y & Chen Q (2017) Regulation of mATG9 trafficking by Src- and ULK1-mediated phosphorylation in basal and starvation-induced autophagy. *Cell Res* 27: 184–201
- Zhou D, Li P, Lin Y, Lott JM, Hislop AD, Canaday DH, Brutkiewicz RR & Blum JS (2005) Lamp-2a facilitates MHC class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity* 22: 571–581
- Zhou M, Wen Z, Cheng F, Ma J, Li W, Ren H, Sheng Y, Dong H, Lu L, Hu H-M, *et al* (2016) Tumor-released autophagosomes induce IL-10-producing B cells with suppressive activity on T lymphocytes via TLR2-MyD88-NF- κ B signal pathway. *Oncoimmunology* 5: e1180485
- Zhu Y, Massen S, Terenzio M, Lang V, Chen-Lindner S, Eils R, Novak I, Dikic I, Hamacher-Brady A & Brady NR (2013) Modulation of Serines 17 and 24 in the LC3-interacting Region of Bnip3 Determines Pro-survival Mitophagy versus Apoptosis. *J Biol Chem* 288: 1099–1113
- Zois CE & Koukourakis MI (2009) Radiation-induced autophagy in normal and cancer cells: towards novel cytoprotection and radio-sensitization policies? *Autophagy* 5: 442–450

Résumé

L'autophagie joue un rôle important dans l'immunité en fournissant des peptides pour la présentation antigénique. Parmi les acteurs essentiels de l'autophagie, les protéines ATG8 jouent un rôle clé dans l'élongation et la maturation de l'autophagosome, avant sa fusion avec le lysosome. La famille ATG8 chez les mammifères comprend la sous-famille LC3 et la sous-famille GABARAP. En 2016, une étude a montré que la fusion de l'antigène de tumeur NY-ESO-1 à la partie N-ter de ATG8/LC3B pouvait améliorer la réponse des lymphocytes T (LT) CD4⁺ restreints à NY-ESO-1. Le premier objectif de la thèse était de démontrer que GABARAP et GABARAPL1, comme LC3B, pouvaient être utilisés pour cibler un antigène sur la voie autophagique pour favoriser la présentation peptidique par les molécules de CMH de classe II. L'OVALBUMINE (OVA) a été choisie comme antigène afin de tirer parti des souris transgéniques pour leur récepteur à l'antigène OT-I et OT-II qui stimulent respectivement les LT CD8⁺ et LT CD4⁺ spécifiques de peptides issus de OVA. Des lignées cellulaires stables de cellules tumorales de mélanome murin B16-F10 surexprimant les antigènes OVA, OVA-LC3B, OVA-GABARAP ou OVA-GABARAPL1 ont été établies et utilisées pour activer des LT CD4⁺ OT-II spécifiques du peptide OVA. Toutefois, la surexpression de l'antigène OVA-ATG8 dans les cellules B16 n'a pas permis de déclencher une réponse CD4⁺. Des cellules dendritiques dérivées de moelle osseuse (DC) en culture primaire constituant un modèle physiologique de présentation antigénique ont été choisies par la suite pour adresser OVA aux autophagosomes. Dans ce modèle, les protéines GABARAP et GABARAPL1 comme LC3B peuvent cibler l'antigène OVA aux autophagosomes et augmenter sa présentation par les molécules du CMH-II améliorant la réponse CD4. Le deuxième objectif de cette thèse a été d'étudier le rôle de la protéine GABARAPL1 exprimée par les cellules B16-OVA dans la croissance tumorale. L'expression de GABARAPL1 a été invalidée dans ces cellules par la technologie CRISPR-Cas9 et le rôle spécifique de GABARAPL1 dans la présentation des antigènes par les protéines du CMH-II a été étudié. Chez les cellules B16-OVA GL1^{-/-}, le flux autophagique basal est significativement diminué. Ces cellules ont montré une augmentation significative de leur croissance tumorale dans des souris immunocompétentes C57BL/6N mais pas dans des souris immunodéprimés (SCID) suggérant un rôle de GABARAPL1 dans l'implication du système immunitaire contrôlant la prolifération cellulaire.

Autophagy plays an important role in immunity by delivering peptides for the antigen presentation. Among the effectors of autophagy, the ATG8 proteins have been described to play a key role in the elongation and maturation of the autophagosome, before its fusion with the lysosome. The mammalian ATG8 family comprises the LC3 subfamily (LC3A, B and C) and the GABARAP subfamily (GABARAP, GABARAPL1 and GABARAPL2). In 2016, a study reported that the fusion between the cancer testis antigen NY-ESO-1 and the N-ter of the autophagy protein LC3B could enhanced NY-ESO-1-restricted CD4⁺ T cell response. The aim of our study was to demonstrate that GABARAP/GABARAPL1, as well as LCB could be used to target antigens to the autophagic pathway. The OVALBUMIN (OVA) antigen was chosen to take advantage of the OT-I and OT-II mice which express a transgenic TCR specific for OVA peptides in their CD4 and CD8 T cells. B16-F10 stable cell lines overexpressing OVA, OVA-LC3B, OVA-GABARAP or OVA-GABARAPL1 antigens have been established to confirm the ability of the ATG8 proteins to target OVA proteins into the autophagosomes and to present peptides on their class II MHC molecules. However, B16-OVA-ATG8 overexpressing failed to activate specific CD4⁺ T cell response. Primary cell cultures of a more physiological antigen presenting cells i.e. bone marrow-derived dendritic cells (DC) were developed to address OVA to the autophagosomes. Here we report for the first time that other members of the ATG8 family proteins, GABARAP and GABARAPL1 can target OVA to the autophagosomes and enhanced MHC class II presentation to activate specific CD4⁺ T cells. The second aim of our study was to investigate the role of GABARAPL1 protein in the presentation of OVA peptides in B16-OVA cells. We generated B16-OVA GABARAPL1-Knock-down (KD) using the CRISPR-Cas9 technology. In GABARAPL1 KD cells, the basal autophagic flux was significantly decreased. When injected into mice, these GABARAPL1 KD cells developed a tumour faster in immunocompetent C57BL/6N mice than in immunocompromised (SCID) mice suggesting the involvement of GABARAPL1 in the tumour cell proliferation control by the immune system.