



HAL
open science

**Etude des fonctions des protéines “ ubiquitin-like ”
GABARAP/LGG-1 via l’ingénierie CRISPR-Cas9 au
cours de l’autophagie et du développement chez
Caenorhabditis elegans**

Romane Leboutet

► **To cite this version:**

Romane Leboutet. Etude des fonctions des protéines “ ubiquitin-like ” GABARAP/LGG-1 via l’ingénierie CRISPR-Cas9 au cours de l’autophagie et du développement chez Caenorhabditis elegans. Biologie cellulaire. Université Paris-Saclay, 2021. Français. NNT : 2021UPASL039 . tel-03391795

HAL Id: tel-03391795

<https://theses.hal.science/tel-03391795>

Submitted on 21 Oct 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.

Etude des fonctions des protéines « ubiquitin-
like » GABARAP/LGG-1 via l'ingénierie CRISPR-
Cas9 au cours de l'autophagie et du
développement chez *Caenorhabditis elegans*

*Study of ubiquitin-like proteins GABARAP/LGG-1 functions by CRISPR-
Cas9 engineering during autophagy and development in
Caenorhabditis elegans*

Thèse de doctorat de l'université Paris-Saclay

École doctorale n° 577 : Structure et Dynamique des Systèmes vivants (SDSV)
Spécialité de doctorat : Sciences de la vie et de la santé
Unité de recherche : Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative
Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France.
Réfèrent : Faculté des sciences d'Orsay,

**Thèse présentée et soutenue à Paris-Saclay,
Le 04/06/2021, par**

Romane LEBOUTET

Composition du Jury

Isabelle GUENAL

Professeure, Université de Versailles
Saint-Quentin-en-Yvelines LGBC
- UMR 4589
Présidente

Gilles DESPOUY

Maître de conférences HDR, Université
de Franche-Comté - UMR1098
Rapporteur & Examineur

Sophie PATTINGRE

Chargé de recherche HDR, IRCM
- U1194
Rapportrice & Examinatrice

Aymeric BAILLY

Chargé de recherche, CRBM- UMR5237
Examineur

Céline MASCLAUX-DAUBRESSE

Directeur de recherche, INRA Versailles
- UMR1318
Examinatrice

Direction de la thèse

Renaud LEGOUIS

Directeur de recherche CNRS
I2BC - UMR 9198
Directeur de thèse

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse, Isabelle Guénael, Aymeric Bailly, Céline Masclaux-Daubresse, Sophie Patingre et Gilles Despouy d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Je remercie également les membres de mon comité de suivi, Gilles Despouy, Sébastien Gaumer, mon tuteur, et Svetlana Dokudovskaya d'avoir participé pendant trois ans à l'avancement de ce travail.

Merci à mon directeur de thèse Renaud Legouis, infatigable chef de chœur dont la passion et la volonté communicative accordent nos recherches et m'ont permis de réaliser ce travail. Au moins, cent-cinquante-six lundis matins, et toujours la volonté de combattre, de critiquer, de contredire, de batailler, de décortiquer, de chercher. Merci de m'avoir fait découvrir « la vie secrète » du labo et la pensée d'un scientifique du 8^{ème} siècle *Lai Gù Wì* dont je sais que certaines phrases m'accompagneront toute ma vie.

Un immense merci à Céline Largeau, pour avoir toujours été disponible (jour comme nuit et les mercredis), si bienveillante et à l'écoute pendant toutes ces années. Tu es mon rayon de soleil du quotidien. Merci pour ta motivation et ton positivisme extrême qui m'ont si souvent redonné du courage. Merci de m'avoir partagé ton amour pour la science (mais aussi tes stocks de vers, tes solutions de « bleach », tes boîtes RNAIs, tes protocoles, tes post-it, tes clefs USB, ... la liste est encore très longue) ! Je ne serai pas allée jusqu'au bout sans toi, cette thèse c'est aussi la tienne.

Merci à mon binôme de thèse Vincent Scarcelli également directeur de l'entreprise « motivation express » et « SOS coup de stress ». Merci à toi pour tous ces moments de vie partagés, ces débats, ces rigolades, ces disputes. Merci d'avoir pris le temps de me connaître et de m'avoir supportée et aidée. Pour ne pas oublier, rendez-vous le 11 mars 2029. Penses-tu qu'on aura autant grandi que pendant ces années au labo ?

Un grand merci à Emmanuel Culetto d'avoir permis la naissance du projet « GA ». Merci d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions pas toujours très scientifiques. Ton engouement et ta passion pour la recherche ont été une véritable source de motivation pour moi.

Merci à Christophe Lefebvre, véritable chevalier Jedi, pour ta bienveillance, tes conseils avisés et tes attentions quotidiennes qui m'ont aidée à rester du bon côté de la Force tout au long de ma thèse ! Merci pour ton soutien et les cafés du matin qui m'ont aidée à commencer mes journées du bon pied ! MERCI

I also would like to thank Yanfang Chen for our moments in the lab especially during the weekend were your presence was a source of good atmosphere and motivation. Thank you for the mutual discoveries, from chinese food to French administration, and mostly for the multiples laughs that we had together. Merci à Alexandre pour m'avoir encouragée dans cette période particulièrement stressante de rédaction de thèse et de préparation de la soutenance ! Un grand merci à Guillaume pour m'avoir toujours invitée à boire plus de café ! Merci aux membres passés et présents de l'équipe, et particulièrement à Siham avec qui j'ai hâte de travailler sur les mitochondries !

Un grand merci à Sophie Netter, coach aux multiples casquettes, enseignante à l'Université me faisant aimer et découvrir la génétique, maître de stage qui m'a initiée au monde de la recherche, et supportrice de tous les instants, dès le premier jour de M2 aux minutes précédant la soutenance. Merci pour tes encouragements et ta disponibilité, la justesse de tes mots m'a aidée à dépasser de nombreuses difficultés. MERCI

Merci à mon ancienne coloc et maître de stage Laurine Miscop'. Ton implication, ta joie de vivre, ton endurance ont représenté un moteur pour moi. Merci de m'avoir encouragé à toujours vivre de manière intense.

Je remercie les copains de l'UVSQ et Youri2BC. Un énorme merci à Charlotte Mallart, pour toutes les saucisses que tu as réussi à cuire le jour du barbecue de l'I2BC et d'autant plus en étant végétarienne ! Je ne pourrai pas l'oublier ! Laura pour notamment ses aventures de plomberie toujours plus folles autour des petits cafés. Merci également à Pierrick avec qui j'espère faire de la microscopie à expansion un jour peut être ;). Un grand merci à mes copains du labo Charbel, Mahnaz, Mélina, Amanda et Momo pour tous ces moments de rigolades ! Merci également aux copains de la fac : Mathilde, Johan et Jean-Youss pour vos encouragements sans failles : « La thèse c'est nul ! » .

Merci à Fabienne, Jacques, Mickael, Naima, Virginie, Cécile, Julie, Lammia, Delphine, et Valentin, d'avoir mis une super ambiance à l'étage du bâtiment 21 qui m'a permis de vivre ma thèse dans de très bonnes conditions ! Vos sourires, encouragements et danses vont beaucoup me manquer !

Je tiens à remercier chaleureusement ma famille et tout d'abord mes parents qui m'ont toujours soutenu dans mes projets et qui m'ont permis de faire des études (pourtant ce n'était pas gagné ... je confonds toujours les p et les b). Merci pour votre gentillesse et votre bienveillance à mon égard. Comme vous me le dites souvent moi qui ne « faisais pas 40 cm » ... je peux vous répondre maintenant que je suis presque devenue grande... Merci à mon premier modèle, ma grande sœur Solène sans qui je ne connaîtrais pas l'existence de la biologie. Merci à Michel, tu es mon philosophe préféré. Merci également à ma copine d'enfance Alex avec qui j'ai pu partager mes joies et mes peines du quotidien. Et bien sûr merci aux copains du SPG qui malgré ces longs mois d'absence m'ont gardé une bonne place sur le canapé.

Un grand merci à mon Gab, qui a géré notre quotidien pendant toutes ces années, je sais que ça n'a pas été facile pour toi. Merci pour ta sagesse incroyable, ta patience à toute épreuve, et surtout pour m'avoir aidée à réaliser mon rêve d'enfant. <3

Avant-propos

Romain Gary, dans la préface du livre *Le crépuscule des hommes* suggère de légaliser le cannibalisme pour constituer une ressource importante de protéines. « Puisque le besoin en protéines de l'humanité est si grand et qu'au lieu de contrôler les naissances, on préfère (..) les famines, je propose (...) de rendre le cannibalisme légal pour que l'homme puisse s'élever enfin tout à fait au niveau de lui-même ». Si cette proposition n'a pas été adoptée à l'échelle humaine, la cellule, sans considération morale, choisit l'auto dégradation pour survivre. La voie de dégradation lysosomale de l'autophagie orchestrée par la famille des protéines ATG est cruciale pour l'homéostasie cellulaire, tissulaire et organique. Ce processus de dégradation permet la survie au cours du développement, la longévité et sa dérégulation est associée à des maladies neurodégénératives et à certains cancers.

Mon travail de recherche se concentre sur la protéine de type ubiquitine LGG-1, l'homologue d'Atg8/GABARAP, essentielle à la viabilité et le développement du nématode *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*). Cette protéine contrôle le processus autophagique notamment la biogénèse des autophagosomes et le recrutement de cargos à dégrader. De plus, les protéines Atg8 sont les seules identifiées comme restant liées à la membrane des autophagosomes et font partie de la famille des protéines « ubiquitin like ». Mon projet de thèse consiste à comprendre quelles sont les fonctions spécifiques des différentes formes de LGG-1 au cours du processus autophagique et du développement chez *C. elegans*.

J'ai choisi de commencer par une introduction faisant l'inventaire des connaissances sur les protéines de la famille ubiquitine, afin de comprendre quel est le caractère commun de l'ensemble de ces protéines. Après des généralités sur les caractéristiques de l'ubiquitine j'ai répertorié les différentes classes d'«ubiquitines-like» et décrit certaines caractéristiques. Dans un second temps introductif, j'ai voulu mettre en exergue les différents membres de la famille Atg8 ainsi que leurs particularités au sein du processus autophagique. Pour cela, j'ai débuté par la description du processus, la machinerie moléculaire impliquée, les mécanismes de sélectivité. J'ai par la suite détaillé les différents attributs des membres Atg8/GABARAP/LC3 et leurs rôles au sein du processus autophagique. Cette partie introductive se termine sur l'utilisation du modèle *C. elegans* pour l'étude de l'autophagie par notamment une revue bibliographique pour laquelle je figure première auteure.

J'ai utilisé CRISPR-Cas9 pour obtenir de nouveaux allèles mutant du gène *lgg-1*. En effet LGG-1 existe sous trois formes ; le précurseur (forme P) est clivé en une protéine cytosolique (forme I) qui, via un système de conjugaison à un lipide, est localisée à la membrane des autophagosomes (forme II). Cette capacité de conjugaison à un substrat, caractéristique de certaines Ubl est de manière dogmatique liée à leur rôle cellulaire. Néanmoins plusieurs études suggèrent des rôles indépendants de l'ancrage covalent de ces protéines. Comprendre les mécanismes moléculaires sous-jacents constitue un enjeu crucial permettant d'appréhender les régulations des différents processus dans lesquels les Ubl sont impliquées. Mon projet de thèse s'inscrit dans cette thématique et consiste à comprendre quelles sont les fonctions spécifiques des différentes formes de LGG-1/GABARAP dans l'autophagie. Les résultats obtenus sont présentés sous forme d'un article en anglais dans la première partie des résultats.

La seconde partie présente les résultats complémentaires et ma contribution à un projet parallèle par notamment des expériences de vidéo-microscopie. En effet, initialement décrite comme un processus de dégradation massif et aléatoire, l'autophagie peut cibler de manière spécifique des organites entiers, comme du réticulum endoplasmique ou des mitochondries. Comprendre comment l'autophagie dite sélective, participe aux processus développementaux et d'adaptation au stress des animaux est un défi majeur. C'est dans ce cadre que s'inscrit un des projets du laboratoire qui consiste à la caractérisation du mécanisme d'autophagie à la suite d'un stress cellulaire. Y. Chen a pu mettre en évidence qu'une élévation aigüe de la température modifie l'homéostasie mitochondriale et induit un flux autophagique et des événements de mitophagie. Cette étude fait l'objet d'un article sous presse dans *Journal Cell Biology* présenté en seconde partie des résultats.

Pour terminer ce manuscrit je propose des pistes de réflexions et perspectives pour répondre aux questionnements générés dans mes recherches principales.

Sommaire

AVANT-PROPOS	5
ABREVIATIONS	13
LISTE DES TABLEAUX ET FIGURES.....	18
INTRODUCTION.....	22
PARTIE 1 - L'UBIQUITINE ET LES UBIQUITIN-LIKE	24
I. GENERALITES SUR L'UBIQUITINE	24
1.1 DECOUVERTE.....	24
1.2 FAMILLE MULTIGENIQUE	24
1.3 STRUCTURE ET SEQUENCE PROTEIQUE.....	26
1.4 LE SYSTEME ENZYMATIQUE D'UBIQUITINATION	26
1.5 MONO/MULTI/POLY-UBIQUITINATION, UN CODE A DECRYPTER.....	28
1.6 LES MOTIFS DE RECONNAISSANCES A L'UBIQUITINE, UNE PISTE DE REPONSE	32
II. LA FAMILLE DES UBIQUITINE-LIKE.....	34
2.1 CLASSIFICATION	34
2.2 STRUCTURE	34
2.4 LES UDP NON CONJUGABLES	38
2.5 LES UBL CONJUGABLES	42
III. SYSTEME DE CONJUGAISON DES UBL.....	44
3.1 LA GLYCINE C-TERMINALE EST UN MOTIF COMMUN DES UBL.....	46
3.2 ACTIVATION DES UBL ET CONJUGAISON A UN SUBSTRAT	46
3.3 CONJUGAISON DES PROTEINES ATG8 AUX MEMBRANES	50
IV. LES UBL : DES SIGNAUX MULTI FONCTIONNELS	52
4.1 FONCTIONS DES PROTEINES UBL : SUMO/NEDD8.....	52
4.1.1 NEDD8	52
4.1.2 SUMO	58
4.2 MOTIFS DE RECONNAISSANCE AUX UBL.....	59
4.2.1 Les SIM	59
4.2.2 Les LIR/AIM/GIM	60
PARTIE 2 - FONCTION DES PROTEINES ATG8/ LC3/GABARAP DANS	
L'AUTOPHAGIE.....	61
I. L'AUTOPHAGIE, UN PROCESSUS DE DEGRADATION LYSOSOMAL.....	62
1.1 DECOUVERTE ET DEFINITION	62
1.2 TROIS TYPES D'AUTOPHAGIES.....	64
1.2.1 La microautophagie.....	64
1.2.2 L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes	66
1.2.3 La macroautophagie.....	66
1.3 AUTOPHAGIE SELECTIVE	68
1.4 ROLE PHYSIOLOGIQUE DE L'AUTOPHAGIE.....	78

II. LA FAMILLE LC3/GABARAP	80
2.1 LES MEMBRES : NOMBRE VARIANT D'HOMOLOGUES EN FONCTION DES ESPECES	80
2.2 L'ALIGNEMENT DES SEQUENCES PROTEIQUES DES MEMBRES ATG8 SUGGERE DES FONCTIONS DISTINCTES	82
2.3 FORTE SIMILARITE DE STRUCTURE	83
2.4 CONFORMATION	84
2.5 LES PROTEINES DE LA FAMILLE ATG8 SONT DES MARQUEURS DES AUTOPHAGOSOMES	86
III. ROLES DES LC3/GABARAP DANS L'AUTOPHAGIE	88
3.1 INITIATION, ET NUCLEATION	90
3.1.1 Le complexe d'induction Atg1/ULK et régulation par le complexe TORC	90
3.1.2 Le complexe de nucléation phosphatidylinositol 3-kinase de classe III (PI3K)	90
3.1.3 Rôle des Atg8 dans l'induction de l'autophagie	92
3.1.4 Rôle opposé des protéines LC3 et GABARAP dans l'induction de ULK1	95
3.2 ELONGATION ET FERMETURE	96
3.2.1 Atg2 et Atg9 permettent le transfert des lipides	98
3.2.2 Rôles des protéines Atg8 pour les étapes d'élongation et fermeture.....	98
3.2.3 La délipidation des membres Atg8	100
3.3 FUSION ENTRE LES AUTOPHAGOSOMES ET LES LYSOSOMES	102
3.3.1 Les GTPase Rab.....	102
3.3.2 Les facteurs d'attachements	105
3.4 LES SNARES	105
3.5 LES PHOSPHOINOSITIDES	106
3.6 REGULATIONS.....	107
3.6.1 Régulation transcriptionnelle de l'expression des Atg8.....	107
3.6.2 Modification post-traductionnelles.....	108
PARTIE 3 - C. ELEGANS UN MODELE D'ETUDE DE L'AUTOPHAGIE	112
REVUE - « MITOPHAGY DURING DEVELOPMENT AND STRESS IN C. ELEGANS »	114
PROBLEMATIQUE.....	130
RESULTATS.....	134
PARTIE I- ETUDE DES FONCTIONS AUTOPHAGIQUES ET NON AUTOPHAGIQUES DES PROTEINES UBIQUITINES-LIKE LGG-1/GABARAP .	138
I. MUTAGENESE CIBLEE : OBTENTION DE NOUVEAUX ALLELES DES GENES LGG-1 ET LGG-2.....	138
1.1 MODIFICATION DU GENOME PAR REPARATION D'UNE CASSURE DOUBLE BRIN	138
1.3 CONSTRUCTION DES MATRICES DE REPARATION D'ADN.....	140
1.4 STRATEGIE DE CO-CRISPR	142
1.5 OBTENTION DE PROTEINE DE FUSION GFP::LGG-1, MCHERRY::LGG-2.....	142
1.6 MCHERRY::LGG-2 ET GFP::LGG-1 DEFINISSENT TROIS TYPES D'AUTOPHAGOSOMES.....	144
1.7 OBTENTION DE NOUVEAUX MUTANTS DU GENE LGG-1	146
II. LES FORMES CYTOSOLIQUES DE LGG-1/GABARAP ASSURENT DES FONCTIONS SPECIFIQUES AU COURS DE L'AUTOPHAGIE ET DU DEVELOPPEMENT CHEZ C.ELEGANS.....	148
MANUSCRIT - LEBOUTET ET AL.....	152

PARTIE II – L'AUTOPHAGIE FACILITE LA RECONSTRUCTION DU RESEAU MITOCHONDRIAL ET LA RECUPERATION DEVELOPPEMENTALE APRES UN STRESS THERMIQUE VIA UN PROCESSUS DEPENDANT DE DRP-1 186

MANUSCRIT – CHEN ET AL 2021 JCB 190

DISCUSSION 214

I. LA GLYCINE 116 EST ESSENTIELLE POUR LA CONJUGAISON DE LGG-1 AUX MEMBRANES DES AUTOPHAGOSOMES..... 216

1.1 LA GLYCINE 116 EST IMPORTANTE POUR LE CLIVAGE..... 216

1.2 LA MUTATION DE LA GLYCINE 116 PROVOQUE L'ACCUMULATION D'UNE NOUVELLE FORME. 217

II. LA FORME LGG-1.I EST SUFFISANTE POUR MAINTENIR LES FONCTIONS DEVELOPPEMENTALES CHEZ *C. ELEGANS*..... 218

2.1 FONCTION DEVELOPPEMENTALE DE LGG-1 INDEPENDANTE DE LA FONCTION AUTOPHAGIQUE 218

2.2 LA FORME LIPEE DE LGG-1 EST DISPENSABLE POUR LE MAINTIEN DES FONCTIONS DEVELOPPEMENTALES CHEZ *C. ELEGANS* 218

2.3 QUEL ROLE DE LGG-1 DANS LE DEVELOPPEMENT ?..... 219

2.4 LA FONCTION DEVELOPPEMENTALE DE LGG-1.I N'EST PAS COMPENSEE PAR LGG-2 220

III. LA FORME LGG-1.II EST DISPENSABLE POUR LES FONCTIONS AUTOPHAGIQUES CHEZ *C. ELEGANS*..... 220

3.1 LA FORME LGG-1(G116A) CYTOSOLIQUE MATURE EST SUFFISANTE POUR MAINTENIR UN FLUX AUTOPHAGIQUE 221

3.1.1 Rôle d'une forme LGG-1.I dans l'induction de l'autophagie 221

3.1.2 Rôle de LGG-1 dans la reconnaissance de cargo : modèle de biogénèse des autophagosomes induits par les cargos..... 222

3.1.3 Rôle de LGG-1.I dans la maturation des autophagosomes et fusions avec les lysosomes 223

3.1.4 Rôle fonctionnel dans l'autophagie d'une forme cytosolique 224

3.2 ROLE COMPENSATOIRE DE LGG-2 226

IV. FORMATION DE DIFFERENTES POPULATIONS D'AUTOPHAGOSOMES..... 227

V. LGG-1 EST-ELLE UNE UBL COMME LES AUTRES ?..... 228

ANNEXES..... 229

ANNEXE 1 OBTENTION DE MUTATION PONCTUELLES PAR L'INGENIERIE CRISPR-CAS9 AU LOCUS *LGG-1* PAR CREATION DE MATRICES DE REPARATION SPECIFIQUES 229

ANNEXE 2 SCHEMAS DES DIFFERENTS MUTANTS *LGG-1* 229

BIBLIOGRAPHIE 229

Abréviations

AIM : Atg8 interacting motif
AMPK: Adenosine mono-phosphate -activated *protein* kinase
APAF1: Apoptotic peptidase activating factor 1
APF-1 : ATP-dependent proteolysis factor 1
APPBP1 : Amyloid Precursor Protein-Binding Protein 1
Atg1: AutoPhagy protein 1
BAG1: BCL2-Associated Athanogene
Bcl2: B-cell lymphoma 2
BECN1: Beclin1
BNIP3: Bcl2/E1B 19kDa-interacting protein 3
C. elegans: Caenorhabditis elegans
ChIP-Seq
CMA: Chaperon-mediated autophagy
CRL: Culling ring ligase
CrRNA: CRISPR Ribonucleic Acid
CRISPR : Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats
CUE : coupling of ubiquitin conjugation to ER degradation
Cvt: Cytoplasm-to-vacuole targeting
Da : Dalton
DFCP1 : double FYVE-domain containing protein 1.
DUB: deubiquitinating enzymes²⁰
DIUM (souble –sided ubiquitin-interacting motif)
DRP1 : Dynamin-related Protein Drp1
DUB: déubiquitinases
EBSS: Earle's Balanced Salt Solution
ERAD : Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation
EPG5: ectopic P-granules autophagy protein⁵
ESCRT: endosomal sorting complexes required for transport
FAT10: leukocyte antigen-F adjacent transcript 10
Fiji : Fiji IS Just Image J
FIP200 : focal adhesion kinase FAK family kinase-interacting protein of 200 kDa
FOXO3: Forkhead Box O3
FUB1: Few ubiquitin-like protein
FYCO: FYVE and coiled-coil domain containing **protein**
GABARAP : γ -AminoButyric-Acid-type-A-Receptor-Associated Protein
GATE 16 : Golgi-Associated ATPase Enhancer of 16kDa
GDP :Guanosine diphosphate
GEF Guanosine exchange factor
GFP :Green Fluorescent Protein
GIM :Gabarap interacting motif
GM130 : 130 KDa Golgi matrix protein
GTP : Guanosine triphosphate
HDAC : Une histone désacétylase
HECT: Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
HHR23A: human homologue of the yeast repair protein RAD23
Hs : Heat shock
Hsc70: Heat schock cognate 70
HDR:**Homology directed repair**
HOPS: homotypic fusion and protein sorting
IM : isolation membrane
ISG15: Interferon-stimulated gene 15

LAMP-2A: lysosome associated membrane protein type 2A
LAP : LC3-associated phagocytosis
LGG: LC3, GABARAP, GATE-16
LIR: LC3-interacting region
LRS : LC3 recognition sequence
MAP-LC3: Microtubule-Associated Protein Light Chain 3
mTORC1 : mechanistic target of rapamycin kinase complex 1
NBR1: Neighbor of BRAC1 gene
NDP52: Nuclear factor kappaB
NEDD8: neuronal precursor cell-express developmentally down-regulated protein
NHEJ : Non homologous en joining
NSF : N-ethylmaleimide-sensitive-factor **NUB1L/NUBAL**
OPTN : optineurin
OSBP: oxysterol-binding protein
PAM: Protospacer adjacent motif
PARP1: Poly [ADP-ribose] polymerase 1
PAS: Phagophore assembly site **PB1**
Pb: Paires de bases
PE : Phosphatidylethanolamine
PHD finger
PI3K: Class III phosphoinositide 3-kinase
PI4/3P : phosphatidylinositol (4/3)-phosphate
PtdIN3K: phosphatidylinositol 3-kinase
PtdIns3P : phosphatidylinositol-3-phosphate
PS: phosphatidylsérine
Raf: Rapidly Accelerated Fibrosarcoma
RE : **Reticulum Endoplasmique**
RING finger
Rub1 : related to ubiquitin-1
PLEKHM1: pleckstrin homology domain containing protein family member 1
SAMP : Small archaeal modifier proteins
SAR: selective autophagy receptor
SENP : Sentrin Specific isopeptidase »
SIM : sumo-interaction motif
SNAP29: Synaptosome Associated Protein 29
SNARE ; Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SQST1 : SeQueSTosome related
Stx 17 :: Syntaxine 17
SUMO : suppressor of MIF2 mutations-3
Tau: Tubulin-associated unit
TAX1BP1: Tax1 Binding Protein 1
UBD: ubiquitin/ubiquitin-like binding domains
UBL : Ubiquitin-like.
UBA (Ubiquitin Associates),
UBA2/3 : Ubiquiting-activating enzyme 2/3
UFM1 : ubiquitin-fold modifier 1
UIM (ubiquitin-interacting motif),
ULK1/2: Unc-51 like autophagy activating **ULD**: ubiquitin-like domains (ULDs)
kinase 1
UNC-51: UNCoordinated-protein 51
UPR: unfolded protein response

UPS: Ubiquitin proteasome system
URM1: Ubiquitin-related modifier-1
VAMP8: Vésicle associated membrane protein 8
VPS-39: Vacuolar protein sorting 39
WAC: (WW domain-cointaing adaptator with coiled coil)
WIPI2: WD Repeat Domain, Phosphoinositide Interacting 2
ZFYVE1 : Zinc Finger FYVE-Type Containing 1

Liste des tableaux et figures

Tableau 1 : Les différents types de gènes codant pour l'ubiquitine dans des espèces différentes.
Tableau 2 : Exemples de protéines Ubl de type I et II et leurs homologues
Tableau 3 : Séquence protéique C-terminale des Ubl
Tableau 4 : Les Ubl et leurs enzymes de conjugaisons et protéases
Tableau 5 : Autophagies sélectives et récepteurs autophagiques
Tableau 6 : Rôles physiologiques des protéines ATG
Tableau 7 : Membre des familles GABARAP et LC3 chez les métazoaires.
Tableau 8 : Pourcentage d'identité de séquence entre les différents membres

Figure 1 : L'ubiquitine est codée par une famille multigénique
Figure 2 : Alignement des séquences protéiques de l'ubiquitine chez *C. elegans*, *Homo Sapiens* et *S. Cerevisiae*
Figure 3 : Structure de l'ubiquitine
Figure 4 : Système de conjugaison de l'ubiquitine
Figure 5 : L'ubiquitine est impliquée dans différents processus cellulaires
Figure 6 : Différents types de domaines de liaisons à l'ubiquitine (UBD)
Figure 7 : Classification des protéines de type ubiquitine
Figure 8 : Classification structurale de la superfamille de l'ubiquitine
Figure 9 : Les UDP non conjugables
Figure 10 : Les Ubl sont liées par leurs homologies de structures indépendamment de leur identité de séquence
Figure 11 : Les Ubl et leurs enzymes de conjugaisons et protéases
Figure 12 : Lipidation des protéines de la famille ATG8
Figure 13 : Neddylation des protéines cullines
Figure 14 : Balance entre poly-neddylation et mono-neddylation
Figure 15 : SUMO2 et SUMO3 peuvent former des chaînes poly-SUMO
Figure 16 : Rôle de SUMO dans la réparation de l'ADN
Figure 17 : Images de microscopie électronique de vésicules autophagiques
Figure 18 : Schéma des trois types d'autophagies
Figure 19 : Dégradation sélective de cargos via des récepteurs spécifiques
Figure 20 : Schéma de la voie Cvt
Figure 21 : Schéma de la voie Cvt
Figure 22 : Autophagie Sélective. REphagy
Figure 23 : Arbre phylogénétique réalisé par « Neighbor joining »
Figure 24 : Alignement des séquences des membres de la famille Atg8 chez 3 espèces. *S.cerevisiae* *C. elegans* et *Homo*
Figure 25 : Partie N-terminale LGG1 et LGG2
Figure 26 : GABARAP/LGG-1 et LC3/LGG-2, des marqueurs des autophagosomes
Figure 27 : Schéma représentant les fonctions principales des protéines de type Atg8 au cours du processus autophagique
Figure 28 : Complexe Ulk1 d'initiation
Figure 29 : Complexe PI3K
Figure 30 : Régulation du complexe Atg1 par Atg8
Figure 31 : Activation de la kinase ULK par GABARAP qui trafic à partir du centrosome régulé par WAC et GM130

Figure 32 : Modèle du transfert lipidique médié par Atg2 et Atg9 pour l'expansion du phagopore

Figure 33 : Micrographie

Figure 34: Transport bidirectionnel des autophagosomes sur les microtubules

Figure 35 : Acteurs de la fusion entre autophagosomes et lysosomes

Figure 36 : Modèle de translocation de LC3 du noyau vers le cytoplasme par dé-acétylation

Figure 37 : *C. elegans* est un modèle d'étude de l'autophagie

Figure 38 : Le complexe Cas9-crRNA-tracrRNA

Figure 39 : Mécanismes mis en place à la suite d'une cassure double brin

Figure 40 : Stratégie CRISPR pour obtenir des nouveaux allèles mutants de *lgg-1* et *lgg-2*

Figure 41 : Stratégie Co-CRISPR

Figure 42 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus suite à deux expériences de CRISPR pour l'obtention des protéines de fusion LGG-1 et LGG-2

Figure 43 : GFP::LGG-1 et mCherry::LGG-2

Figure 44 : Timelapse sur les populations positives pour LGG-1 et LGG-2

Figure 45 : Tableau récapitulatif des résultats obtenus suite à deux expériences de CRISPR pour l'obtention des mutants *lgg-1(G116AG117A)* et *lgg-1(G116AG117*)*

Introduction

PARTIE 1 - L'ubiquitine et les ubiquitin-like

I. Généralités sur l'ubiquitine

1.1 Découverte

La découverte dans les cellules eucaryotes par Avram Hershko, Aaron Ciechanover et Irwin Rose, des fonctions d'une petite protéine ubiquitaire de 76 acides aminés appelée ubiquitine (initialement nommée APF-1 (ATP-dependent proteolysis factor 1) a été récompensée par le prix Nobel de chimie en 2004. Isolé dans les années 1970, ce polypeptide est capable de s'ancrer à d'autres protéines via une liaison peptidique par un système enzymatique. (voir partie 1.4) (Cappadocia and Lima, 2018). Ce type de modification post-traductionnelle est appelée ubiquitination et intervient dans de nombreux processus biologiques. La fonction la mieux caractérisée de l'ubiquitine est son rôle de signal de dégradation des protéines par le protéasome (Hershko, Ciechanover and Rose, 1979). L'ubiquitine est l'une des protéines eucaryotes les plus conservées entre espèces. Ce polypeptide tient son nom de sa localisation dans tous les compartiments subcellulaires (Welchman, Gordon and Mayer, 2005).

1.2 Famille multigénique

L'expression génique de l'ubiquitine n'est pas commune. Chez les mammifères, il existe quatre gènes codant pour l'ubiquitine. Deux de ces gènes, *UbC* et *UbB* présentent des séquences codantes pour des précurseurs poly-ubiquitine. Ainsi, la séquence d'ubiquitine est répétée successivement 3 fois pour *UbB* et 9 fois pour *UbC*. Ce précurseur poly-ubiquitine sera par la suite clivé par une protéase spécifique appelée déubiquitinase (DUB), pour donner des mono-ubiquitines. Les gènes *UbA52* et *RPS27A* codent des précurseurs ubiquitines composés d'une séquence protéique d'ubiquitine fusionnée à une protéine ribosomales L40 et S27A/S31 respectivement (Ozkaynak *et al.*, 1987; Finley, Bartel and Varshavsky, 1989; Redman and Rechsteiner, 1989), **Figure 1**.

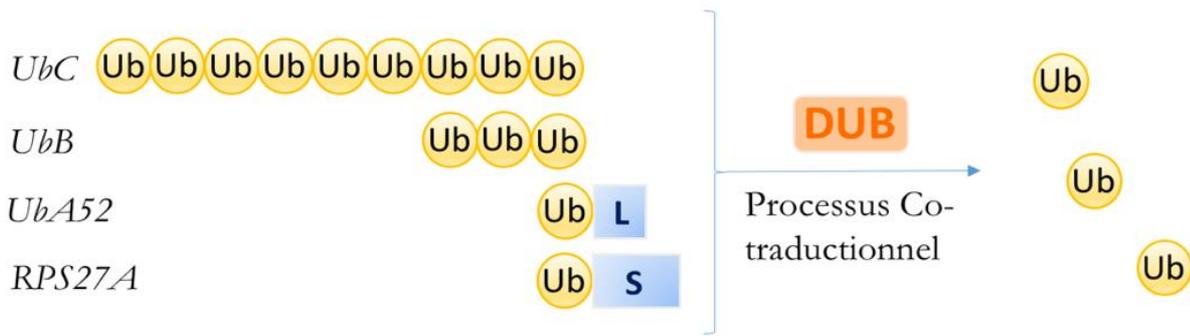


Figure 1 - L'ubiquitine est codée par une famille multigénique

Chez les mammifères, il existe 4 gènes d'ubiquitine UbC, UbB, UbA52, RPS27A. Les produits de fusion codés par ces gènes sont traités par les DUB de manière co-traductionnelle et sont à l'origine de monomères d'ubiquitine libres. (Adaptée de Radici *et al.*, 2013).

Espèces	Nom du gène	Répétitions/ fusion
Mammifère	<i>UbC</i>	9 répétitions (chez la souris) 11 (chez l'homme) de la séquence Ub
	<i>UbB</i>	3 répétitions de la séquence Ub
	<i>UbA52</i>	Fusion Ub- protéine ribosomale L40
	<i>RPS27A</i>	Fusion Ub- protéine ribosomale S27A
Levure	<i>Ubl4</i>	5 répétitions de la séquence Ub
	<i>RPL40A (UBI1)</i>	Fusion Ub- protéine ribosomale L40-B
	<i>RPL40B (UBI2)</i>	Fusion Ub- protéine ribosomale L40-B
	<i>RPS31 (UBI3)</i>	Fusion Ub- protéine ribosomale S31
<i>C.elegans</i>	<i>ubq-1</i>	11 répétitions de la séquence Ub
	<i>ubq-2</i>	Fusion avec la protéine ribosomale L40

Tableau 1 - Les différents types de gènes codant pour l'ubiquitine dans des espèces différentes

Le nombre d'ubiquitine codées par le gène polyubiquitine est instable dans l'évolution et varie selon les espèces. Le nom des gènes provient de la base de donnée Uniprot.

	6	11		27	29	33		48		63	
C.e. Ub:	MQIFVKTLTGKTITLEVEASDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLGG										76
H.s. Ub:	MQIFVKTLTGKTITLEVEPSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLGG										76
S.c. Ub:	MQIFVKTLTGKTITLEVESSDTIENVKAKIQDKEGIPPDQORLIFAGKQLEDGRTLSDYNIQKESTLHLVLRRLGG										76

Figure 2 - Alignement des séquences protéiques de l'ubiquitine chez *C. elegans*, *Homo Sapiens* et *S. Cerevisiae*

Alignement des séquences individuelles d'ubiquitine. Les acides aminés différents encadrés en jaunes. Les lysines importantes pour l'ancrage d'une autre Ub sont mentionnées par leurs positions. Alignement est fourni par wormbook.org.

Le nombre de gènes codant pour l'ubiquitine ainsi que le nombre de répétitions est variable en fonction des espèces. Le **tableau 1** répertorie les gènes codant pour l'ubiquitine chez les mammifères, la levure, et le nématode *C.elegans*. Pourquoi les ubiquitines sont générées sous la forme d'un poly-précurseur n'est pas bien connu. Néanmoins la présence d'un seul transcrit, traduit en plusieurs protéines pourrait permettre d'augmenter la vitesse de réponse suite à un stress et également d'avoir une réserve d'ubiquitine libre à disposition. Une étude a pu montrer que la variation du nombre de répétitions module la résistance au stress. En effet, chez la levure la création de variants d'Ubi4, avec un nombre de répétitions plus court montrent une sensibilité plus forte au stress, contrairement aux variants plus longs permettant une meilleure résistance (Gemayel *et al.*, 2017).

1.3 Structure et séquence protéique

L'ubiquitine est une petite protéine de 8,5kDa dont la séquence et la structure secondaire sont bien caractérisées. L'ubiquitine est retrouvée chez tous les eucaryotes mais pas chez les procaryotes. La séquence de ce polypeptide est extrêmement conservée entre espèces. A titre d'exemple, un seul acide aminé diffère (en position 19) entre les séquences chez *C. elegans* et *Homo Sapiens*, **Figure 2**. Il a été découvert que l'ubiquitine contient sept lysines (K) qui peuvent être elle-même ubiquitinées, ce qui entraîne la formation de chaînes d'ubiquitines. La structure de l'ubiquitine comprend une hélice α entourée de 5 feuillets β appelée « β graps fold ». Ce domaine est caractéristique des protéines de type ubiquitine et est très conservé entre espèces. La queue en partie C-terminale est exposée pour permettre sa conjugaison sur des substrats protéiques, **Figure 3**.

1.4 Le système enzymatique d'ubiquitination

Le système d'ancrage de l'ubiquitine fait intervenir de manière séquentielle et transitoire les enzymes de conjugaison E1, E2 et E3. La cascade enzymatique se déroule en trois étapes : l'activation, la conjugaison et le transfert, **Figure 4**. Ces étapes sont bien caractérisées et font l'objet de plusieurs revues.

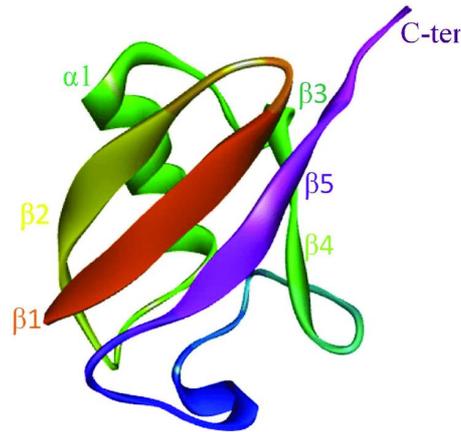


Figure 3 - Structure de l'ubiquitine

L'hélice alpha est entourée de 5 feuillets β . Cette structure est appelée « β grasp fold » et est conservée dans le règne eucaryotes (Hacisuleyman and Erman, 2017).

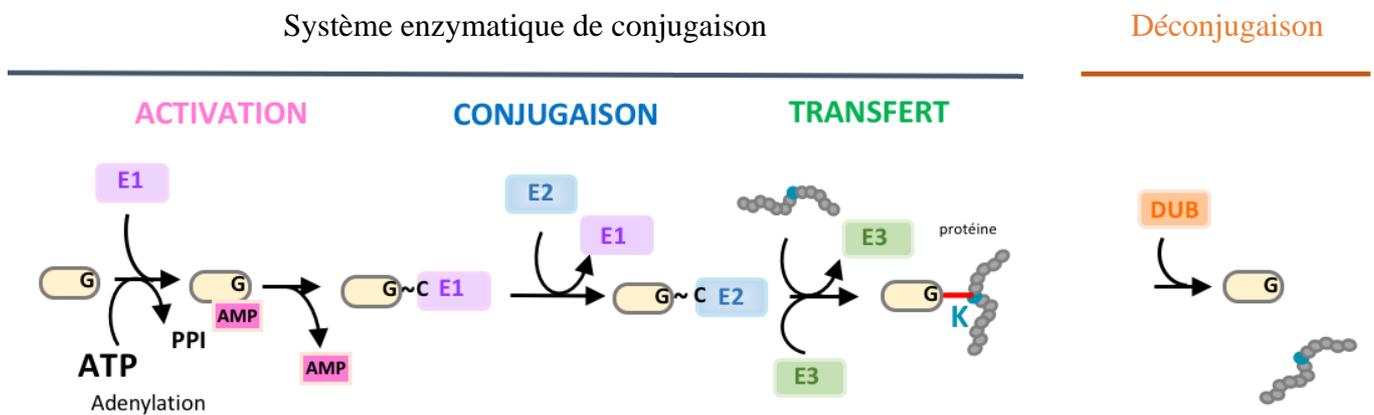


Figure 4 - Système de conjugaison de l'ubiquitine

Pour être ancrée de manière covalente à une protéine, l'ubiquitine subit un système de conjugaison faisant intervenir de manière successive trois enzymes : l'enzyme E1 active l'ubiquitine permettant son transfert sur l'E2, puis via l'E3 l'ancrage au substrat. (Adaptée de Geng and Klionsky, 2008).

La première étape de conjugaison consiste en l'activation d'une glycine C-terminale de l'Ub par une enzyme E1 via l'hydrolyse de l'ATP. Chez l'homme, il existe deux E1 spécifiques de l'ubiquitine, Ube1 (appelé Uba1 chez la levure) et Uba6. L'ubiquitine se lie à un ATP pour former un intermédiaire ubiquitine-adenylate capable d'interagir avec l'E1. La glycine en partie C-ter subit une attaque nucléophile par l'atome de sulfure de la cystéine du site actif de l'enzyme (Hochstrasser, 1996). Ce processus permet la formation d'une liaison thioester entre la glycine et la cystéine du site actif de l'E1. Après activation, l'Ub est transférée à l'E2 via juxtaposition des sites actifs E1 et E2. Les E2 récupèrent l'Ub à travers une réaction de transthioesterification, au niveau d'une cystéine située au cœur du domaine catalytique. Après cette étape, dans certaines conditions, l'ubiquitine peut être liée directement à une lysine d'une cible. Les E3 ont un rôle crucial dans la reconnaissance de la cible appropriée et permettent l'ancrage covalent avec le substrat. Le groupement amine d'une lysine cible est conjugué à la partie carboxylique de la glycine. Quatre familles de E3 existent : HECT, RING finger, U box et PHD finger, ayant des caractéristiques structurales spécifiques que je ne vais pas détailler ici mais qui peuvent être retrouvées dans différentes revues. (Ardley and Robinson, 2005; Zheng and Shabek, 2017).

D'autre part, plusieurs ubiquitines peuvent être conjuguées aux mêmes substrats et cette réaction requiert une enzyme spécifique permettant la liaison (E4). Ce mécanisme de conjugaison est transitoire et réversible. Certaines protéases : les déubiquitinases (DUB) permettent de recycler l'Ub par libération de la forme mature.

1.5 Mono/multi/poly-ubiquitination, un code à décrypter

Le type de liaison et le nombre d'ubiquitine ajoutées définissent le devenir des substrats que l'ubiquitine cible. L'ubiquitination fait référence à la formation d'une liaison peptidique entre une glycine située en partie C-terminale de l'ubiquitine et, la plupart du temps, le groupement amine d'une lysine en position N-ter d'un substrat protéique. (Welchman, Gordon and Mayer, 2005) (le mécanisme moléculaire de conjugaison est développé partie 1.4). L'ubiquitination fait référence à la formation d'une liaison peptidique entre une glycine située en partie C-terminale de l'ubiquitine et dans la majorité des cas, le groupement amine d'une lysine en position N-ter d'un substrat protéique (Welchman, Gordon and Mayer, 2005). Le mécanisme moléculaire de conjugaison est développé partie 1.4.

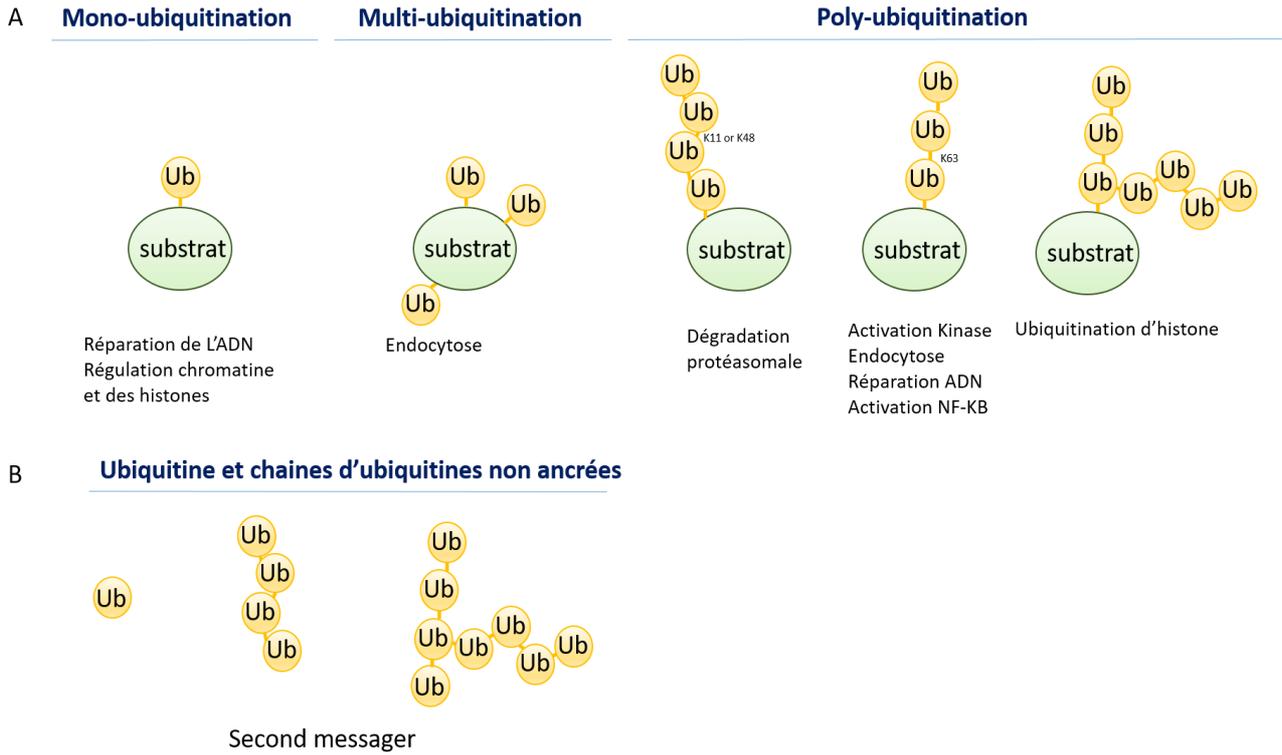


Figure 5 - L'ubiquitine est impliquée dans différents processus cellulaires

A- La polyvalence de l'Ub dans la régulation de différents processus provient de sa capacité à pouvoir se lier à des substrats en tant que monomère sur une lysine (mono-ubiquitination) ou sur plusieurs lysines différentes (multi-ubiquitination). L'Ub peut s'ancrer également en tant que polymère (poly-ubiquitination) par l'addition séquentielle d'Ub les uns aux autres. Les chaînes peuvent être linéaires ou ramifiées avec différentes topologies. La mono-ubiquitination a été retrouvée dans des processus tels que la réparation de l'ADN, le bourgeonnement viral et l'expression génique. La multi-ubiquitination peut réguler l'endocytose de récepteurs. La polyubiquitination par K11 ou K47 d'Ub entraîne la dégradation par le protéasome alors que les chaînes d'Ub liées entre elles à la K63 sont impliquées dans la signalisation et l'endocytose.

B- L'Ubiquitine et des chaînes d'ubiquitines avec ou sans modifications peuvent servir de second messenger. (Adaptée de *Sadowski et al., 2012; Swatek and Komander, 2016*).

L'une des caractéristiques de l'ubiquitine est la présence de ses sept résidus lysine (K) qui peuvent être tous ubiquitinylés, donnant naissance à des chaînes d'ubiquitines. Les chaînes liées à la lysine48 représentent la liaison prédominante dans les cellules, considérées comme le signal de dégradation des protéines vers le protéasome (Hershko and Ciechanover, 1998; Swatek and Komander, 2016). Une protéine peut être **multi-ubiquitinylée**, par l'addition de plusieurs ubiquitines sur différentes lysines d'une même protéines ou **poly-ubiquitinylée** par l'ajout d'une chaîne d'ubiquitine sur la même lysine. Selon la liaison ubiquitine, les chaînes polyUb peuvent cibler les protéines pour la dégradation via le protéasome ou peuvent servir d'échafaudages pour la formation de complexes protéiques par exemple. En revanche, la conjugaison avec une seule Ub (mono) peut réguler l'activité ou la localisation des protéines. (Streich and Lima, 2014), **Figure 5**.

L'ubiquitine peut également se conjuguer à une sérine, thréonine, cystéine et influencer le devenir du substrat de différente manière. Par ailleurs, l'ubiquitine peut être non seulement ubiquitinylée mais aussi subir d'autres modifications telles que des phosphorylations, des acétylations ou encore des sumoylations et neddylation. (Kwon and Ciechanover, 2017), **Figure 6B**.

L'ubiquitine est majoritairement étudiée via son attachement à des substrats, mais il existe aussi dans les cellules, des mono ubiquitines ou des chaînes d'ubiquitines capables d'effectuer des fonctions indépendamment de leurs conjugaisons sur un cargo (autre que l'ubiquitine), **Figure 5B**. Deux études ont montré que des chaînes de polyubiquitines non ancrées étaient capables d'activer le complexe IKK (Xia *et al.*, 2009) ou encore des mono ubiquitines non ancrées dans des processus de réplication virale (Rajsbaum and García-Sastre, 2014).

« Craquer » le code de l'ubiquitine est un enjeu majeur. La fonction d'ancrage covalent de l'ubiquitine, telle une étiquette, est connue depuis des décennies mais la découverte des multiples couches de régulations est récente et peu connue. Certaines questions restent en suspens. Pourquoi et comment certaines chaînes sont préférablement créées plutôt que d'autres ? Comment ces chaînes sont-elles sélectivement reconnues ? Chaque type de chaîne a-t-elle une fonction spécifique et une importance physiologique ? Le code de l'ubiquitine garde encore de nombreux mystères.

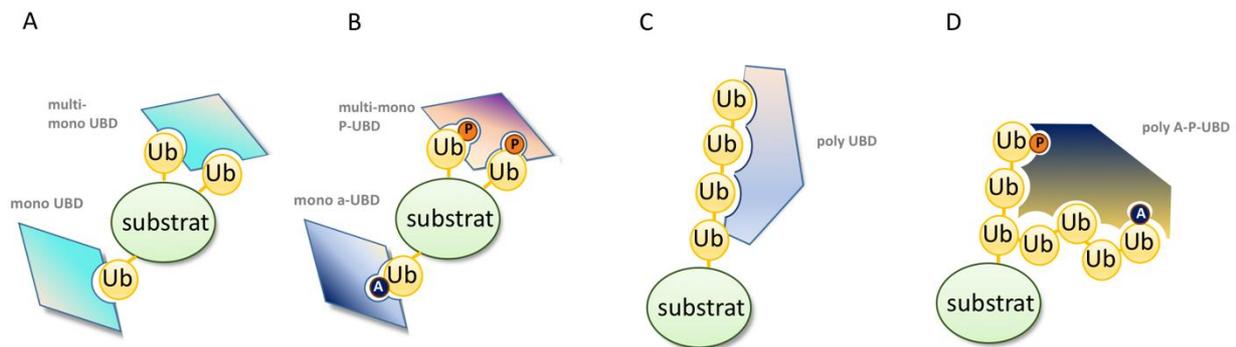


Figure 6 - Différents types de domaines de liaisons à l'ubiquitine (UBD)

L'ubiquitine se lie covalamment au substrat soit en chaîne soit en molécule seule. Des protéines permettent de reconnaître l'ubiquitine et peuvent être de plusieurs types. Certains possèdent **A**- un ou plusieurs mono domaines de reconnaissance à l'ubiquitine. **B**- Certains domaines sont capables de reconnaître des molécules seules d'ubiquitine ayant subi une modification post-traductionnelle telle que l'acétylation ou la phosphorylation. **C**- Certaines chaînes peuvent être reconnues via plusieurs UBD. **D**- Protéines hypothétiques possédant plusieurs domaines de reconnaissance à l'ubiquitine capables de reconnaître un type de chaîne ancrée à un substrat. (Adaptée de Dikic, Wakatsuki and Walters, 2009; et Fennell, Rahighi and Ikeda, 2018).

1.6 Les motifs de reconnaissances à l'ubiquitine, une piste de réponse

Les protéines Ub sont capables d'agir comme des signaux cellulaires contrôlant une myriade de processus biologiques. Des protéines de liaisons reconnaissent, décodent et transforment ces signaux en différentes cascades biochimiques (Ikeda, Crosetto and Dikic, 2010). Les protéines de liaison sont donc capables de lire et interpréter, grâce au domaine de liaison à l'ubiquitine, les différents messages et codes portés par ces protéines modificatrices. Plus de 20 domaines de liaison à l'ubiquitine (UBD: ubiquitin domain protein) ont été caractérisés sur différents substrats. Compris entre 20 et 150 acides aminés, ces motifs sont hétérogènes à la fois en termes de structures et de profils de reconnaissance à l'ubiquitine et peuvent être regroupés en plusieurs classes. Ces différents domaines sont très bien décrits et plusieurs revues détaillent leurs caractéristiques. (Hicke, Schubert and Hill, 2005; Dikic, Wakatsuki and Walters, 2009; Husnjak and Dikic, 2012; Randles and Walters, 2012).

La majorité des UBD présentent une base hélicale dont le domaine le plus connu est UBA (Ubiquitin Associates) présent dans l'Enzyme E1. En plus de leurs ressemblances structurelles, ces UBD hélicoïdaux partagent une attraction commune pour la même surface de liaison à l'ubiquitine formée d'un patch hydrophobe entourant l'isoleucine 44. D'autres domaines de reconnaissance à l'ubiquitine existent tels que ceux en doigts de zinc (ZnF), tel que UBC présent dans certaines enzymes E2. De plus, alors que certains UBD semblent être liés à une fonction telle que la présence exclusive de domaines UBZ (Znf) et UBM (hélicoïdal) dans les ADN polymérase, d'autres ne suivent aucune généralité fonctionnelle.

Sur la base de la corrélation apparente entre la spécificité de liaison et la fonctionnalité cellulaire, il est proposé que des conformations différentes de chaînes d'ubiquitine devraient être reconnues par des UBD distincts, **Figure 6**.

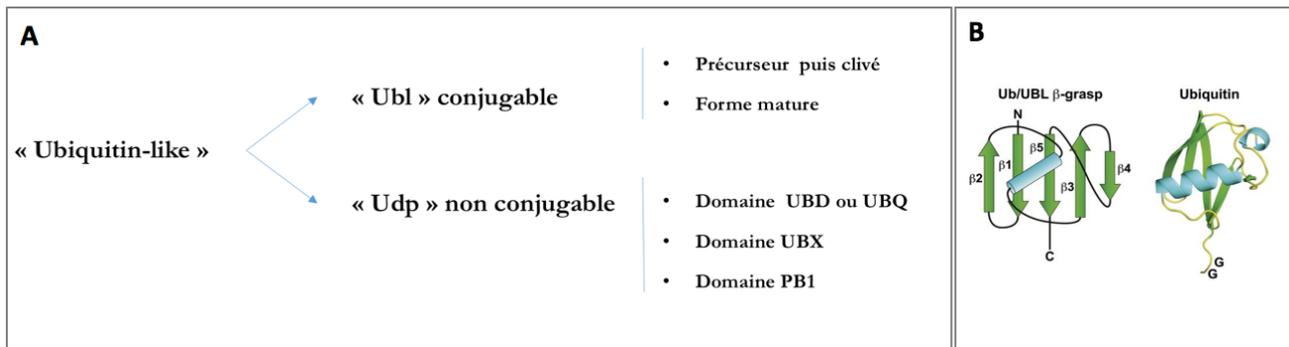


Figure 7- Classification des protéines de type ubiquitine

A Représentation schématique de la classification des Ubl. Il existe deux types de protéines Ubl : les conjuable et les non conjuable. Les Ubl sont généralement des petites protéines à monodomaine, certaines sont d'abord produites sous la forme d'un précurseur et d'autres directement matures. Les UDP sont des protéines à multidomaine et qui possèdent différents variants structurels « β grasp fold » : UBD, UBX, PB1. **B** La caractéristique commune des Ubl et UDP est la présence d'au moins un domaine structurel « β grasp fold » avec la présence d'une hélice alpha entourée de 5 feuillets. (Adaptée de Vierstra, 2012).

	Famille	<i>H. sapiens</i>	<i>S.cerevisiae</i>	<i>C.elegans</i>
Type I	Ubiquitine	UBB, UBC, UBA80, Uba52	Ubi4, Ubi1	UBQ-1, UBQ-2
	ATG8	LC3A, LC3B, LC3B2, LC3C, GABARAP, GABARAPL1, GATE16 *	Atg8	LGG-1, LGG-2
	ATG12	Atg12	Atg12	LGG-3
	FAT10	FAT10	/	/
	FUB1	FUB1/FAU/ MNSF	/	?
	ISG15	ISG15	?	?
	NEDD8	NEDD8	Rub1	NEDD8
	SUMO	SUMO1, SUMO2, SUMO3, SUMO4*	Smt3	SMO-1
	UBL	UBL3, UBL4, UBL5	?	?
	UFM1	UFM1	?	UFM-1
	URM1	URM1/C9orf74	Urm1	URM-1
Type II	RAD23	HHR23A	RAD 23	RAD-23
	DSK2	UBQLN2	DSK2	?
	PLIC-1	PLIC-1	?	PLK-1
	BAG-1	BAG-1	Sn11	UNC-23
	UIP28/RBCK1	UIP28/RBCK1	?	?
	UBP6	Usp14	Ubp6	usp-14
	Elongin B	Elongin B	Elongin B	ELB-1
	PARKIN	PARKIN	PARKIN	PARKIN
	P62/SQSTM1	P62	p62	SQST-1

Tableau 2 : Exemples de protéines Ubl de type I et II et leurs homologues

II. La famille des Ubiquitine-like

2.1 Classification

Plusieurs familles protéiques partageant des liens évolutifs avec l'ubiquitine ont été découvertes à partir des années 1990 et sont regroupées sous le terme de « protéine de type ubiquitine » (« Ubiquitine-like protein » ou « Ubl ») ou plus récemment « protéine à domaine ubiquitine » (« Ubiquitin-like domain protein » ou « Uld »). Ces protéines ont été historiquement divisées en deux groupes. Les conjugables (**type I** appelés aussi « les modificateurs de type ubiquitine » (« Ubiquitin like modifier ») Ublm) et les non conjuguées (**type II** nommés également « protéine à domaine ubiquitine » (« Ubiquitin domain proteins ») ou « UDP » (Jentsch and Pyrowolakis, 2000; Larsen and Wang, 2002; Schwartz and Hochstrasser, 2003; Grabbe and Dikic, 2009). La famille Ubiquitine-like regroupe un grand nombre de protéines ayant des fonctions distinctes, identifiables par la présence d'un domaine conservé : « l'Ubiquitin like domain » (Ud) (Cappadocia and Lima, 2018).

Néanmoins, dans la littérature le terme Ubl est majoritairement simplifié pour désigner les protéines de type I capables de s'ancrer à un substrat. J'utiliserai dans la suite de ce manuscrit le terme « Ubl » pour qualifier les protéines capables de se conjuguer et « Udp » pour les protéines non conjuguées, **Figure 7**. Le **Tableau n°2** répertorie les protéines de type ubiquitine les plus couramment retrouvées dans la bibliographie et leurs homologues. La base de données iUUCD2 (<http://iuucd.biocuckoo.org/>) mise à jour en 2017 liste 11099 protéines de type ubiquitine dans 148 espèces eucaryotes différentes (Zhou *et al.*, 2018).

2.2 Structure

Les protéines de type II Udp sont généralement des protéines à multi domaines, alors que les modificateurs de type I Ubl sont des petites protéines à mono domaine, activées et conjuguées par un système enzymatique similaire à celui de l'ubiquitine. L'ensemble des protéines de type ubiquitine sont liées par leurs homologues de structures, indépendamment de leur pourcentage d'identité de séquence. La caractéristique commune est la présence d'une structure similaire à la structure tertiaire de l'ubiquitine dans laquelle une hélice alpha est maintenue entre cinq

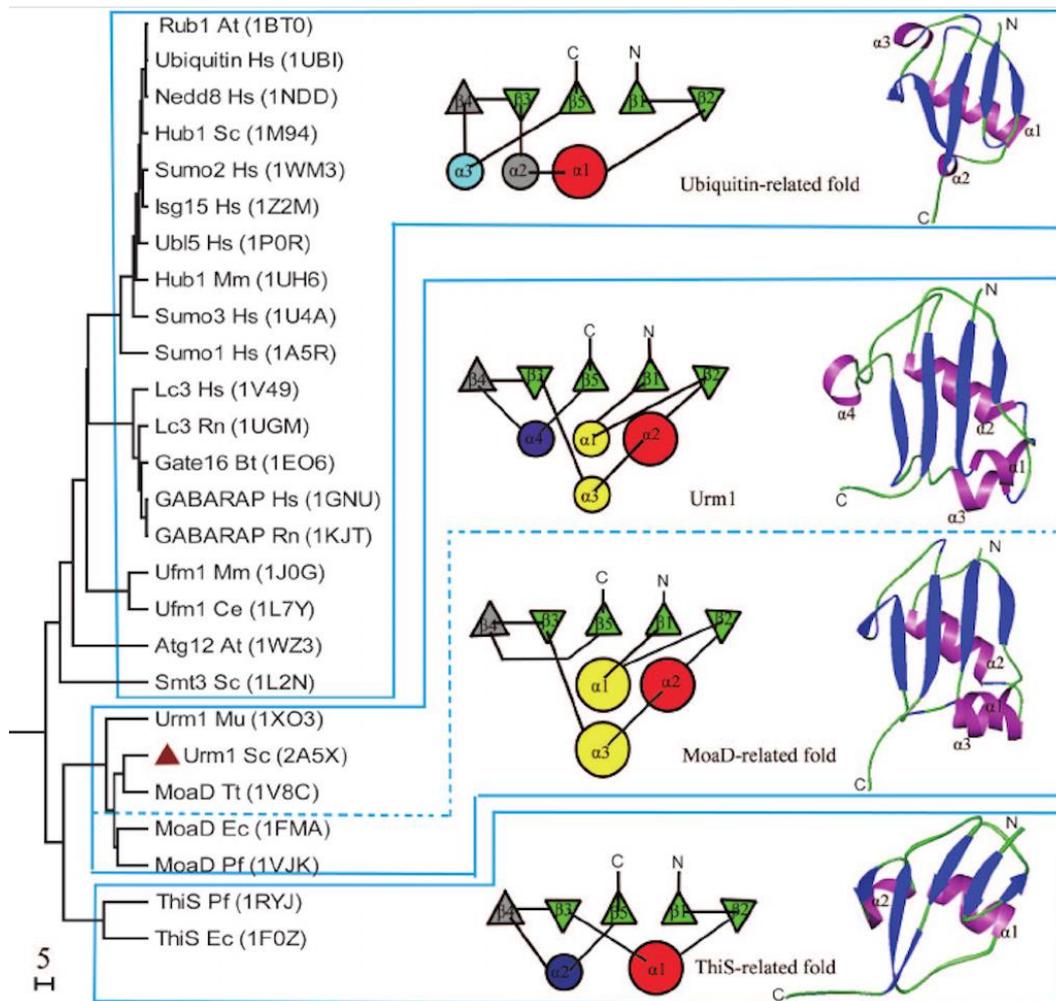


Figure 8 - Classification structurelle de la superfamille de l'ubiquitine

Les homologues de l'ubiquitine ont été classés en trois groupes de repliement en fonction de leurs similitudes structurelles. Les triangles et les cercles désignent respectivement des brins et des hélices. (Xu et al., 2006).

feuilletés bêta appelée « β -grasp fold » d'environ 70 acides aminés (Welchman, Gordon and Mayer, 2005) **Figure 7B**.

2.3 Phylogénie des Ubl

Les origines évolutives des Ubl ne sont pas clairement déterminées. Certaines familles sont identifiées chez tous les eucaryotes alors que d'autres sont moins conservées. A titre d'exemple, les familles ISG15 et FAT10 semblent jouer un rôle important dans le système immunitaire des eucaryotes supérieurs mais sont absentes chez les champignons. Par ailleurs certains organismes eucaryotes possèdent plusieurs gènes Ubl, par exemple l'Homme possède au moins 4 gènes codant la protéine SUMO (SUMO1, SUMO2, SUMO3 et SUMO4) et 6 pour ATG8 (LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAPL1 et GATE-16) alors que la levure *S. Cerevisiae* possède un unique gène *Sumo* et un unique gène *atg8* (Cappadocia and Lima, 2018), **Table 1**. Chez les bactéries les protéines MOaD et ThiS partagent uniquement des similarités structurelles avec l'ubiquitine alors que MoeB et ThiF possèdent à la fois des similarités structurelles et mécanistiques avec l'ubiquitine (Xu *et al.*, 2006; Cappadocia and Lima, 2018), **Figure 8**. Ces protéines sont impliquées dans le métabolisme du soufre plutôt que dans la conjugaison des protéines. Chez les Archae, deux petites protéines SAMP1 et SAMP2 (Small archaeal modifier proteins) possèdent un B-grasp fold et un motif diglycine carboxy-terminal capable de former des conjugués chez *archaeon Haloferax volcanii* (Humbard *et al.*, 2010).

Par ailleurs, un groupe de gènes a été identifié chez *Candidatus Caldiarchaeum subterraneum* comme codant des Ubl et des protéines similaires aux E1, E2 et E3 (Hennell James *et al.*, 2017). Ces observations suggèrent que les Ubl ont évolué à partir de protéines procaryotes impliquées dans le transfert du soufre. La découverte de composants protéiques ubiquitine de type E1, de type E2 et de petit anneau (srfp) chez l'*Aigarchaeota* et l'*Asgard archaea superphyla* rajoute un argument quant à l'origine procaryote. Codés en opérons, ces composants sont probablement représentatifs de l'appareil progéniteur qui a fondé les systèmes modernes de modification de l'ubiquitine eucaryote. L'ensemble de ces observations soutient l'hypothèse selon laquelle des voies de signalisation d'ubiquitination eucaryotes complexes se sont développées à partir de systèmes compacts hérités à l'origine d'un ancêtre archéen. (Nunoura *et al.*, 2011; Spang *et al.*, 2015).

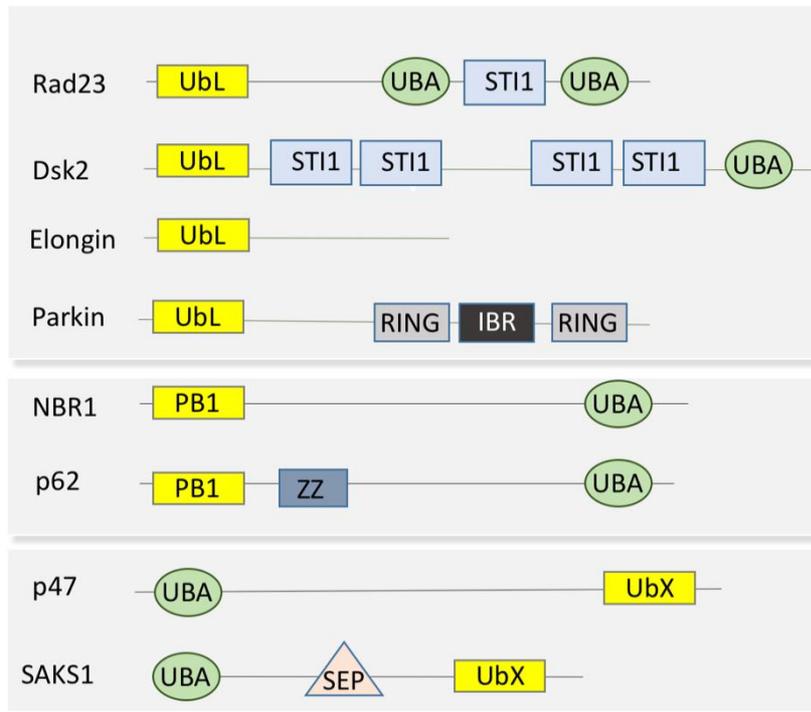


Figure 9 - Les UDP non conjugables

Schéma représentant différentes UDP. Ces protéines ne sont pas capables de se conjuguer et possèdent plusieurs variants structuraux homologues de l'ubiquitine : domaine UBL, PB1, UbX (rectangles jaunes). Certaines possèdent en plus un domaine de reconnaissance de l'ubiquitine UBA (ovales verts). (Adaptée de Jentsch and Pyrowolakis, 2000; Grabbe and Dikic, 2009).

2.4 Les Udp non conjugables

Les Ubl de type II « Udp », sont des protéines à multi domaines, incapables de se conjuguer et possédant au moins un domaine structurel homologue à l'ubiquitine « Ubiquitin-like domains » (Ud), **Figure 9**. Ces domaines Ud peuvent être de plusieurs types, le domaine appelé ULD/UBQ, le domaine UBX et le domaine PB1. Les différentes caractéristiques structurales de ces domaines ont pu être détaillées dans certaines revues et articles (Grabbe and Dikic, 2009; Husnjak and Dikic, 2012). J'ai choisi d'aborder et répertorier ici plutôt des aspects de fonction. En effet, il serait intéressant de savoir si la présence de ces différents domaines est liée à une fonction particulière ou non. (Cappadocia and Lima, 2018).

- Le domaine UBQ (également appelé Ubl ou ULD (Schauber *et al.*, 1998) ou Ubl de type 2 (Tanaka *et al.*, 2003) ou UBL (base de donnée PROSITE) ou UBQ est retrouvé au niveau de la partie N-terminale et est défini par une séquence de 45 à 80 résidus présentant une homologie de séquence significative avec l'ubiquitine (Buchberger, 2002). A titre d'exemple, les domaines UBQ de hPLIC et HHR23A (RAD23 humain) possèdent des structures tridimensionnelles similaires à l'ubiquitine (Walters *et al.*, 2002). Une étude a pu mettre en évidence qu'une fusion de l'ubiquitine est capable de remplacer fonctionnellement le domaine UBQ de Rad23 (Watkins *et al.*, 1993). RAD23 est identifiée comme impliquée dans la réparation de l'ADN et dans la dégradation de protéines. Rad 23 se lie au protéasome via son domaine Ud et présente également un domaine de liaison à l'ubiquitine (UBA) lui permettant de jouer un rôle d'adaptateur (Nakatogawa *et al.*, 2012)(Watkins *et al.*, 1993).

- Une fonction des UBX a pu être mise en évidence en 2017 en tant qu'adaptateur de substrat de l'ATPase Cdc48 et d'activateur de la voie ERAD (Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation). Chez *Pichia pastoris* Ubx1 et Ubx2 sont importantes pour la synthèse d'acide gras insaturés, et sont impliquées dans la formation des gouttelettes lipidiques et la dégradation protéique (Zhang *et al.*, 2017). Cdc48/p97 hautement conservé agit sur les substrats ubiquitylés impliqués dans des processus aussi divers que la fusion de membranes homotypiques et la dégradation de protéines mal repliées (Schuberth and Buchberger, 2008).
- Un troisième variant retrouvé proche de la structure de l'ubiquitine est le domaine PB1, présent au sein des protéines telles que p62, MEK5, PKC importantes pour la transmission du signal (Terasawa *et al.*, 2001; Sumimoto, Kamakura and Ito, 2007).

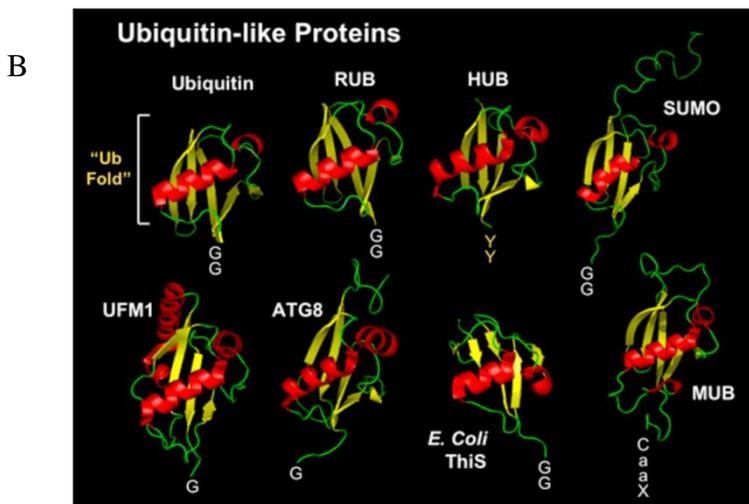
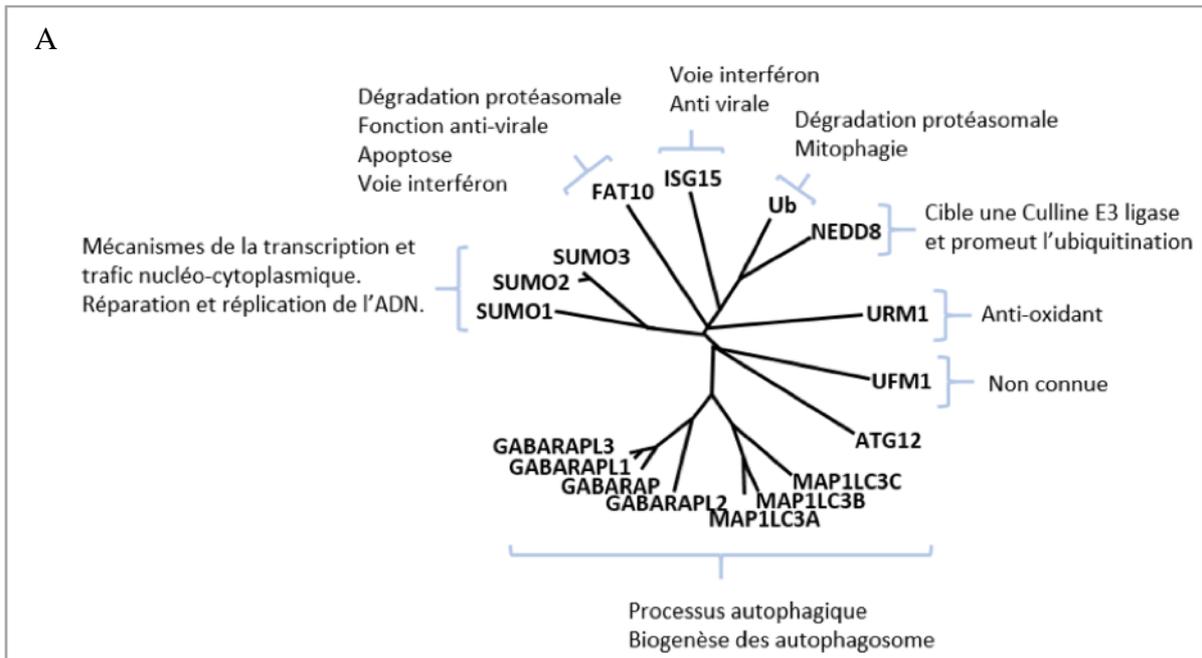
Les fonctions de ces protéines sont diverses et hétérogènes et aucun lien clair n'a pu être établi entre la présence d'un domaine structurel particulier et la fonction de ces protéines. Néanmoins la plupart des protéines Udp possèdent des fonctions relatives à la voie ubiquitine-protéasome, remplissant des rôles d'adaptateurs (Jentsch and Pyrowolakis, 2000) et certaines de liants au protéasome (à la sous unité 26S) de manière dépendante du domaine Ud (Wilkinson *et al.*, 2001).

Certaines études ont démontré un lien fonctionnel entre des UDP, le protéasome, les chaperonnes et l'apoptose. A titre d'exemple, BAG-1 est capable d'interagir avec Bcl2 et la kinase Raf et agit comme cofacteur des Hsp70. En effet, BAG-1 agit comme facteur anti-apoptotique et recrute les chaperonnes au niveau du protéasome. Par ailleurs, certaines UDP sont impliquées dans le système ubiquitine : UBP6 est une protéine permettant le clivage et la déconjugaison de l'ubiquitine, Parkin est une E3 ligase importante pour le recrutement des enzymes de conjugaison et permet notamment de maintenir l'intégrité de la membrane mitochondriale (Kaye *et al.*, 2000).

Contrairement aux Ubl capables de se conjuguer, les UDP à multi domaines ne possèdent pas de motif glycine ou di-glycine en partie C-terminale et sont dans l'incapacité de s'ancrer à un substrat.

Il est intéressant de mentionner que certaines UDP en plus de leur domaine UD possèdent un domaine de liaison à l'ubiquitine (de type UBA). C'est par exemple le cas des protéines Rad23 et Dsk2. Ces protéines sont donc appelées UBL/UBA. Dsk2 est une protéine de levure homologue des Ubiquilins 1-4 chez l'homme (Madsen *et al.*, 2007). Chez l'homme au moins une soixantaine de protéines sont considérées comme Ubl de type 2 (au moins 20 chez la levure)

(Dohmen and Varshavsky, 2005). La liste des protéines possédant des domaines Ud est en continuelle évolution.



C

Ubl	% d'identité de séquence à l'ubiquitine
ATG8	10
ATG12	17
FAT10	29,36
FUB1	37
ISG15	29,37
NEDD8	58
SUMO	18
Hub1	22
UFM1	?
URM1	12

Figure 10 - Les Ubl sont liées par leurs homologies de structures indépendamment de leur identité de séquence

A- Arbre phylogénique des protéines "Ubiquitin like modifier". Ces protéines partagent des liens évolutifs avec l'Ub et possèdent au moins un domaine Ub-like. Ces Ubl sont impliquées dans des processus différents. (Figure inspirée de Schulman and Harper, 2009) **B-** Schéma représentant la structure cristallographique de certaines Ubl et leurs motifs glycine ou di-glycine en partie C-terminale. **C-** Pourcentage d'identité de séquence de certaines Ubl avec l'ubiquitine. ISG15 et FAT10 contiennent deux domaines Ub-like. Figure 10B provient du laboratoire de Viestra <https://vierstra.genetics.wisc.edu/sumo.html>

2.5 Les Ubl conjugables

Les Ubl de type I sont des petites protéines qui ont la capacité de pouvoir se conjuguer à un substrat par un système enzymatique similaire à celui de l'ubiquitine (partie 1.4). Neuf classes distinctes d'Ubl ont été identifiées incluant SUMO, NEDD8, ISG15, FUB1, FAT10, Atg8, Atg12, URM et UFM1 (Cajee, Hull and Ntwasa, 2012). Ces petites protéines ont des fonctions différentes, partagent un faible pourcentage d'identité de séquence à l'ubiquitine mais un domaine structural « β -grasp fold » similaire, **Figure 10**. Les fonctions de certaines d'entre elles sont détaillées dans la partie 4.1.

Certaines variations de structures existent via l'ajout d'éléments conservés ou non. Par exemple FAT10 et ISG15 sont composées de deux « β -grasp fold ». Atg8 comprend, en plus de cette structure Ub-like, deux hélices alpha en partie N-terminale.

Ces Ubl conjugables peuvent être divisées en deux groupes :

- celles produites à l'état de précurseur puis clivées pour permettre l'exposition d'un motif glycine ou diglycine en partie C-terminale de la protéine
- et celles directement produites sous forme mature, prêtes à être conjuguées.

Les familles géniques Atg8, Ufm1, ISG15, NEDD8, et SUMO codent majoritairement pour des pré-protéines, alors que les familles ATG12, FAT10 et URM1 codent pour des protéines matures. Les formes matures des protéines Ubl présentent une région C-terminale flexible avec au moins un résidu glycine, **Tableau 3**. Comprendre pourquoi certaines sont produites à l'état de précurseur alors que d'autres directement matures reste une réelle question, suggérant un rôle différent de la forme précurseur versus mature.

L'ensemble de ces polypeptides sont capables de se lier à des substrats protéiques à l'exception de la famille ATG8, lipidable à la phosphatidylethanolamine (PE) (et la phosphatidylserine (PS) *in vitro* et *in vivo*) (Ichimura *et al.*, 2004; Sou *et al.*, 2006; Durgan *et al.*, 2020). Le nombre de substrats identifiés varie entre les différentes Ubl, par exemple l'ubiquitine compte des milliers de cibles identifiées alors que seulement deux substrats sont reconnus pour ATG12 (Cappadocia and Lima, 2018).

Protéine	Partie C-terminale
Hs SUMO1	GGHSTV*
Hs SUMO2	GGVY*
Hs SUMO3	GHSF*
Hs SUMO4	GG*
Sc SMT3	GGATY*
Ce SMO-1	GGF*
Hs ISG15	GGRS*
Hs FAT-10	GG*
Hs NEDD8	GGGGLRQ*
Ce NEDD8	GGF*
Sc Rub1	GN*
Hs MAPLC3A	GF*
Hs MAPLC3B	GMKLSV*
Hs MAPLC3C	GDDLEDRPCNPL*
Hs GABARAP	GL*
Hs GABARAPL1	GK*
Sc Atg8	GR*
Ce LGG-1	GGEVEKKE*
Ce LGG-2	G*
Hs Atg12	G*
Sc Atg12	G*
Ce LGG-3	G*

Tableau 3 - Séquence protéique C-terminale des Ubl

Certaines Ubl sont produites à l'état de précurseur puis clivées au niveau d'une glycine C-terminale (gris clair). Ce motif glycine ou di glycine est commun entre ces Ubl conjuguables. Certaines protéines sont directement produites sous forme mature avec une glycine exposée en partie C-terminale (gris foncé).

Les Ubl comme l'ubiquitine, peuvent également être assujetties à d'autres modifications post traductionnelles telles que des phosphorylations et des acétylations (Cherra *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2015; Herhaus *et al.*, 2020). Les mécanismes de conjugaisons sont dynamiques et comprennent de nombreuses couches de régulation. De plus, certaines Ubl telles que NEDD8, UFM1 et SUMO sont capables de former des chaînes *in vivo*, processus non constaté à ce jour

Le rôle des Ubl est lié à leurs ancrages covalents à un substrat, néanmoins le clivage et la conjugaison des Ubl ne semble pas être un prérequis à toutes leurs fonctions. Par exemple, la forme non clivée humaine d'ISG15 stabilise la protéase USP18 prévenant ainsi l'auto inflammation de manière non covalente, indépendamment d'un système de conjugaison (Zhang *et al.*, 2015).

pour d'autres (Tatham *et al.*, 2001). Par ailleurs, des interactions non covalentes peuvent être à l'origine de plusieurs fonctions. La liste des Ubl est encore débattue, par exemple les petites protéines à mono domaine Hub1 et Esc2 partagent également des similarités de structures avec l'ubiquitine mais n'ont jamais été retrouvées comme conjuguées de manière covalente à un substrat et sont difficilement classables (Ammon *et al.*, 2014).

III. Système de conjugaison des Ubl

La conjugaison de l'ubiquitine ou des Ubl aux substrats est un mécanisme de régulation important pour l'homéostasie cellulaire. Ces systèmes de conjugaisons sont différents, extrêmement régulés mais ne sont pas totalement indépendants les uns des autres. Ce chapitre décrit les mécanismes moléculaires de la conjugaison des Ubl similaires à l'ubiquitine, met en avant l'importance d'une glycine C-terminale essentielle à l'ancrage de la protéine et dresse certaines différences et similarités étudiées entre les conjugaisons des Ubl. Toutefois, les différences et similitudes structurelles des enzymes de conjugaison ne seront pas traitées ici mais sont bien étudiées : des revues détaillent très bien les différentes caractéristiques de structures (Streich and Lima, 2014; Cappadocia and Lima, 2018).

Famille	E1	E2	E3
Ubiquitine	Uba1 Uba6	Ubc1-8,-10,-11, Ubc13-Mms2 35	HECT (28) RBR (14) RING >600
Atg8	Atg7	Atg3	Atg5/Atg12
Atg12	Atg7	Atg10	Pas de E3
ISG15	UBEL1	UbcH8	HERC5, EFP
Nedd8/rub1	Hétérodimère : BA3/APPBP1 Uba1	UBC12 UBE2M(UBC12) UBE2F	DCNL5 RING = 2
SUMO1-4	SAE1/SAE2	Ubc9	RING = 6 Non RING = 3
UFM1	Uba5	Ufc1	UFL1

Tableau 4 - Les Ubl et leurs enzymes de conjugaisons et protéases

3.1 La glycine C-terminale est un motif commun des Ubl

Une marque commune des Ubl capables de se conjuguer, est la présence d'un motif glycine ou diglycine en position C-terminale. **Tableau 3.** La glycine est conservée entre espèces et est importante pour la conjugaison covalente à un substrat. Des études ont montré que ce motif C-terminal est essentiel pour le clivage et la conjugaison des Ubl à l'origine de nombreuses fonctions. A titre d'exemple, le clivage du précurseur de Nedd8 et de l'ubiquitine s'effectue au niveau de la dernière glycine C-terminale laissant exposer un motif di-glycine. A contrario, les protéines de type Atg8 présentent une unique glycine exposée.

Chez *C. elegans*, la particularité de la protéine LGG-1 est la présence de deux glycines consécutives : G116-G117. La glycine conservée entre espèce est la première glycine G116 et est essentielle à la lipidation de LGG-1. (F. Wu *et al.*, 2012; Manil-Ségalen *et al.*, 2014; Wu *et al.*, 2015). Le clivage est effectué entre les deux glycines laissant exposer uniquement la glycine 116 C-terminale.

3.2 Activation des Ubl et conjugaison à un substrat

Les Ubl utilisent le même type de mécanisme que celui de l'ubiquitine pour s'ancrer de manière covalente à des substrats (voir partie 1.4), à savoir l'utilisation successive de plusieurs types d'enzymes permettant l'activation et la conjugaison des Ubl aux substrats. Le **tableau 4** répertorie les différents acteurs de conjugaison des Ubl. Même si les mécanismes d'activation de l'Ub et Ubl sont similaires, la cascade enzymatique ne peut pas être remplacée par une autre, suggérant une régulation spécifique de chaque mécanisme. Les protéines E1 sont des enzymes captivantes qui sont à la fois capables de sélectionner l'Ubl, de l'activer au niveau de l'extrémité C-terminale, et d'orchestrer les événements en aval pour permettre le transfert sur l'E2. Chaque Ubl a son enzyme activatrice spécifique, néanmoins certaines E1 sont capables d'activer plusieurs Ubl/Ub. Chez l'homme, il existe deux E1 spécifiques de l'ubiquitine, Ube1 (appelé Uba1 chez la levure) et Uba6. Ube1 est capable d'activer l'ubiquitine et d'autres Ubl alors que Uba6 peut uniquement activer l'Ub et FAT10 (Pelzer and Groettrup, 2010). Les deux Ubl impliquées dans la formation des autophagosomes : Atg8 et Atg12 partagent une enzyme E1 : Atg7 (Ichimura *et al.* 2000). C'est le seul exemple où une seule enzyme E1 active deux Ubl différentes. Inversement, deux différentes E1 peuvent partager une E2. C'est le cas pour l'Ubl ISG15 et l'ubiquitine qui utilisent des E1 différentes mais une E2 commune (Zhao *et al.*, 2004).

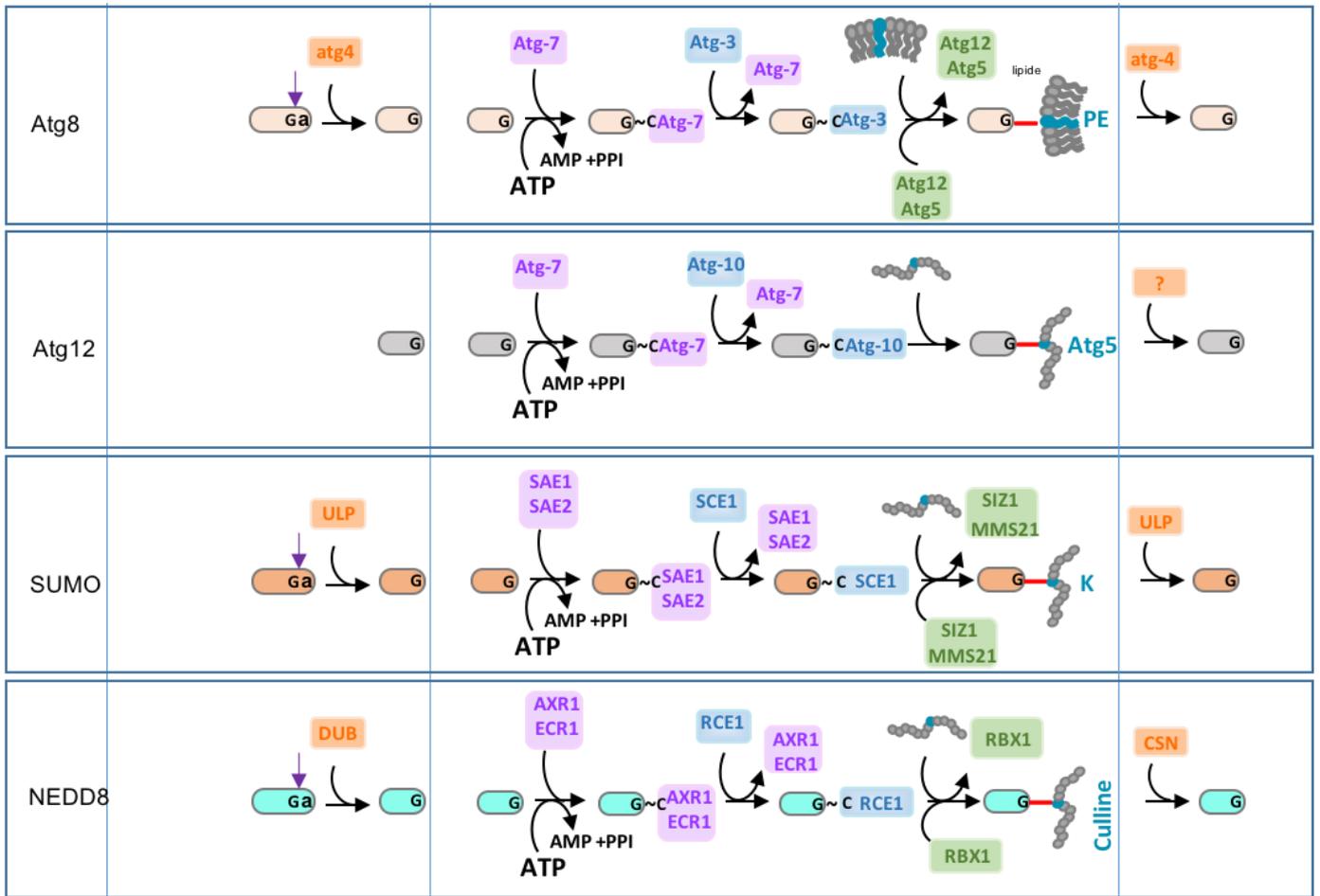


Figure 11 - Les Ubl et leurs enzymes de conjugaisons et protéases

La lettre « a » correspond à un acide aminé présent après la glycine. Le précurseur de l'Ubl est clivé pour permettre l'exposition d'une glycine en C-terminal. La flèche violette correspond au site de coupure du précurseur par la protéase spécifique. L'enzyme E1 (rectangles roses) active l'Ubl sur l'enzyme E2 (rectangles bleus), puis sur l'enzyme E3 pour permettre l'accrochage covalent au substrat. Cet ancrage est réversible et peut être déconjugué par des protéases (rectangles orange).

Par ailleurs, les enzymes de type E1 ont été divisées en deux groupes : les canoniques et les non canoniques (Schulman and Harper, 2009). Les E1 dites canoniques, activent la famille des protéines SUMO, NEDD8, l'ubiquitine, FAT10 et ISG15, a contrario les enzymes dites non canoniques E1 forment des homodimères et permettent l'activation d'ATG8, ATG12 UFM1 et URM (Cappadocia and Lima, 2018).

Comme décrit dans le chapitre sur les généralités de la conjugaison de l'ubiquitine (voir partie 1.4) les E3 reconnaissent et recrutent les substrats modifiés par l'Ub et Ubl et définissent donc la cible. Même si l'ubiquitine est étudiée depuis plus longtemps que les autres Ubl, une différence frappante entre l'Ub et les Ubl est le nombre de E3 et de substrats identifiés. En effet plusieurs centaines d'E3 sont retrouvées pour l'ubiquitination et plus de 10000 cibles. A contrario les Ubl présentent moins d'une dizaine d'E3 et peu de substrats suggérant des fonctions précises et dépendant d'un processus particulier. Ce message est à prendre avec précaution car de plus en plus de substrats sont identifiés chaque année. Un exemple est la sumoylation avec aujourd'hui plus de 3000 cibles identifiées chez l'homme (1000 chez la levure). A contrario, Atg8 ne présente que deux conjugués la phosphatidylsérine et la phosphatidyléthanolamine. Certaines Ubl peuvent se passer d'enzyme E3 pour se lier au substrat.

J'ai choisi de représenter schématiquement les systèmes de conjugaison des Ubl les plus étudiées : SUMO, NEDD8 et Atg8, **Figure 11**. Par ailleurs il me semble important de rajouter le mécanisme de conjugaison d'Atg12. Premièrement parce qu'Atg12 n'est pas produite à l'état de précurseur et ne possède pas d'E3 et d'autant plus que la conjugaison d'Atg12 sur Atg5 est un élément essentiel à la conjugaison d'Atg8, (Hanada *et al.*, 2007). En effet, le conjugué Atg12-Atg5 est l'enzyme E3 d'Atg8. A titre informatif, les acteurs connus sont répertoriés dans le **tableau 4**. Les Ubl sont capables de se lier à des substrats protéiques à l'exception de la famille Atg8, lipidable à la phosphatidylethanolamine (PE) et la phosphatidylserine (PS) *in vitro* et *in vivo* (Ichimura *et al.*, 2000; Sou *et al.*, 2006; Durgan *et al.*, 2020).

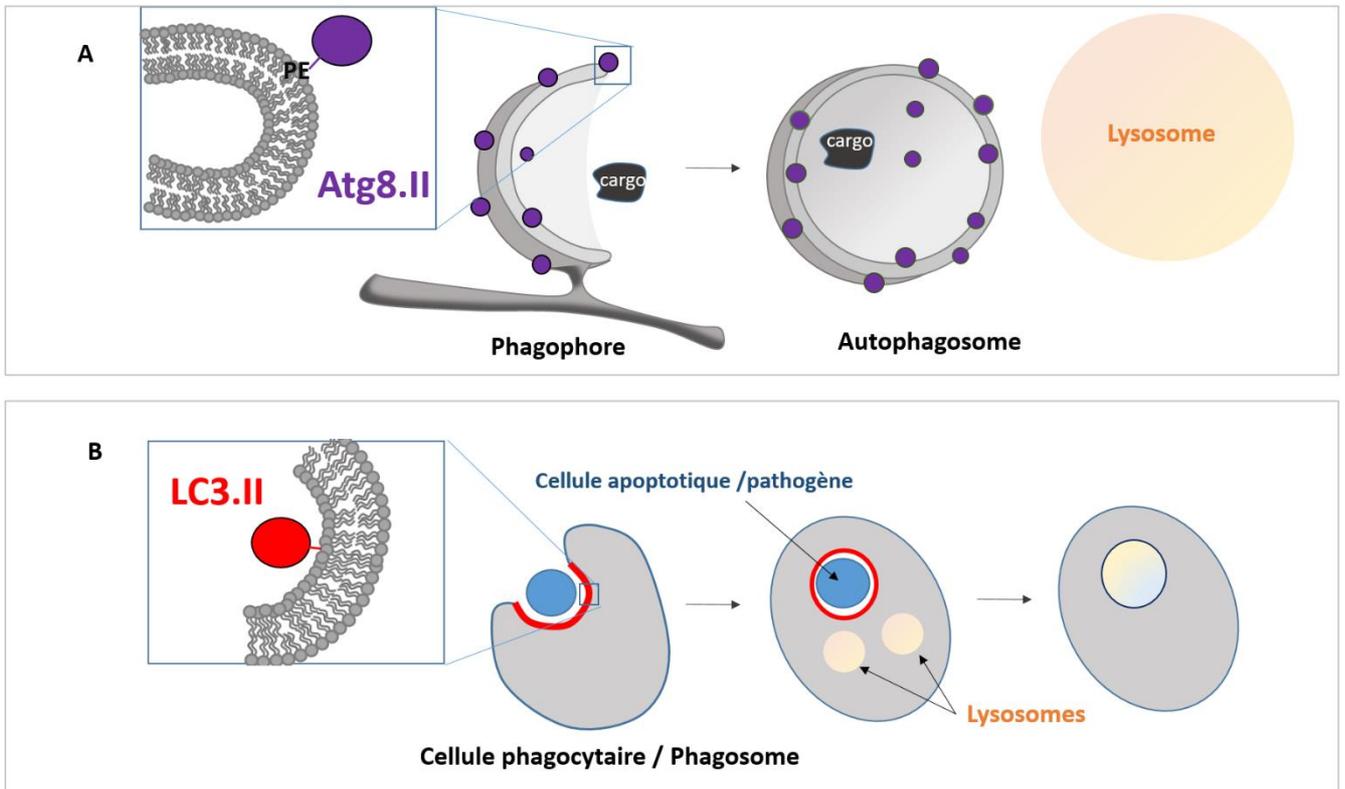


Figure 12 - Lipidation des protéines de la famille ATG8

A- La famille des protéines ATG8 se lipide à la membrane interne et externe des autophagosomes.

B- Au cours de la phagocytose des corps apoptotiques, la cellule apoptotique est reconnue par une cellule phagocytaire permettant la formation du phagosome. Le recrutement de LC3 au niveau du phagosome, indépendamment de la formation d'autophagosome permet de faciliter la fusion entre le phagosome et le lysosome LC3 est capable de se lier au phagosome. Ce processus est nommé LAP (LC3-associated phagocytosis)

3.3 Conjugaison des protéines Atg8 aux membranes

- Membranes autophagosomales

Les phospholipides peuvent être impliqués dans la formation de membranes et la transduction d'un signal. Néanmoins, la modification covalente par une protéine d'un phospholipide est rare. Un exemple connu est l'attachement covalent des Atg8 à la PE. La conjugaison d'Atg8 à la PE est importante pour la croissance des membranes autophagosomales et est permise par deux systèmes de conjugaison intervenant de manière successive. Le premier système de conjugaison fait intervenir Atg12 qui expose une glycine en partie C-terminale. Atg12 est activée par Atg7, l'enzyme de type E1, puis est transférée sur Atg10 de type E2. Atg12 est ensuite conjuguée de manière covalente à une lysine d'Atg5 par Atg10. Le complexe Atg12-Atg5 se lie par la suite à Atg16 via une interaction directe et s'homodimérise. Ce complexe Atg12-Atg5-Atg16 sert d'enzyme de transfert E3 pour le système de conjugaison d'Atg8. Chez la levure, la partie C-terminale d'Atg8 est initialement clivée par la protéase Atg4 au niveau de la glycine 116 (Kirisako *et al.*, 2000). La même enzyme E1 Atg7 est utilisée et permet son activation. Une fois activée Atg8 est transférée sur l'enzyme Atg3 de type E2 par une liaison thioester. Le complexe Atg12-Atg5-Atg16 permet de conjuguer la glycine 116 à la PE. Ce mécanisme de conjugaison est transitoire et réversible. Certaines protéases permettent de recycler les Ubl/Ub par libération de la forme mature. Les enzymes de déubiquitination (DUB) et les protéases spécifiques aux Ubl (ULP) catalysent le clivage de formes précurseur en formes matures. Les DUB et ULP présentent une grande spécificité de substrats. (Ronau, Beckmann and Hochstrasser, 2016). La déconjugaison est une étape cruciale et essentielle au processus d'autophagie. (Nair *et al.*, 2012; Fracchiolla, Zens and Martens, 2017).

- Autres membranes

La conjugaison des protéines Atg8 aux simples membranes a été identifiée pour la première fois en 2011 dans un processus endocytaire appelé LAP (LC3 associated phagocytosis), **Figure 12**. Ce processus permet la phagocytose de pathogènes ou de cellules apoptotiques. Cet ancrage d'Atg8 au cours du processus de LAP est indépendant des complexes d'initiation de l'autophagie telle que ULK1 et ATG9 mais nécessite la machine de conjugaison Atg5, Atg7, Atg16 présente dans le système dégradatif d'autophagie (Florey *et al.*, 2011) (Jacquin *et al.*, 2017). Ce processus permet de localiser LC3 à la simple membrane au phagosome pour

favoriser sa dégradation. Par ailleurs, en plus de la PE, des expériences *in vitro* utilisant des liposomes ont pu mettre en évidence que la phosphatidylserine (PS) peut aussi être une cible de LC3, GABARAP et GATE-16 (Sou *et al.*, 2006). Une forme alternative de lipidation d'ATG8 fournit un nouvel aperçu de ce système de conjugaison. La lipidation alternative à la PS a été montrée au cours d'un processus de LAP du virus Influenza A, et dépend d'ATG16L1. De plus, les formes Atg8-PS et ATG8-PE sont différenciellement déconjuguées par la famille ATG4 (Durgan *et al.*, 2020).

IV. Les Ubl : des signaux multi fonctionnels

4.1 Fonctions des protéines Ubl : SUMO/NEDD8

Les modifications post-traductionnelles représentent des régulateurs majeurs des fonctions cellulaires eucaryotes. Ces modifications peuvent inclure des éléments phosphates, acétyles méthyles, la conjugaison de lipides ou de sucres et l'attachement de poly-peptides comme l'ubiquitine et les Ubl. Parmi les Ubl les membres de la famille SUMO régulent la localisation subcellulaire des protéines, la transcription et la réparation de l'ADN. FAT10, ISG15 et FUB1 sont des régulateurs des réponses immunitaires et inflammatoires. URM1 peut fonctionner comme un régulateur du stress oxydatif. NEDD8 a notamment une fonction de ligase de type E3. Atg8 et Atg12 participent à la régulation du flux autophagique. J'ai décidé de détailler certaines fonctions de deux Ubl les plus étudiées SUMO et NEDD8. La partie 2 de ce manuscrit est consacrée à l'étude des Ubl de la famille Atg8.

4.1.1 NEDD8

NEDD8 (Neural precursor cell expressed developmentally down-regulated 8) a été découvert à l'origine comme un gène régulé négativement dans le cerveau de souris au cours du développement et est l'une des Ubl la mieux caractérisée. NEDD8 est l'Ubl présentant le plus grand pourcentage d'identité avec l'ubiquitine. Cette protéine principalement nucléaire n'est pas un signal de dégradation direct, mais a un rôle essentiel dans l'ubiquitination de nombreux substrats impliqués notamment dans le cycle cellulaire, et des facteurs de survie comme I κ B α l'inhibiteur de NF- κ B (Sarikas, Hartmann and Pan, 2011).

Cette Ubl est très conservée et ses fonctions ont été bien caractérisées à travers la mono-NEDDylation des protéines cullines et la stimulation de l'activité des ligases « culin-RING », mais également à travers des modifications d'autres substrats impliqués notamment dans la réponse aux dommages de l'ADN, le contrôle du cycle cellulaire ou encore dans la maturation des neurones (Abidi and Xirodimas, 2015; Enchev, Schulman and Peter, 2015).

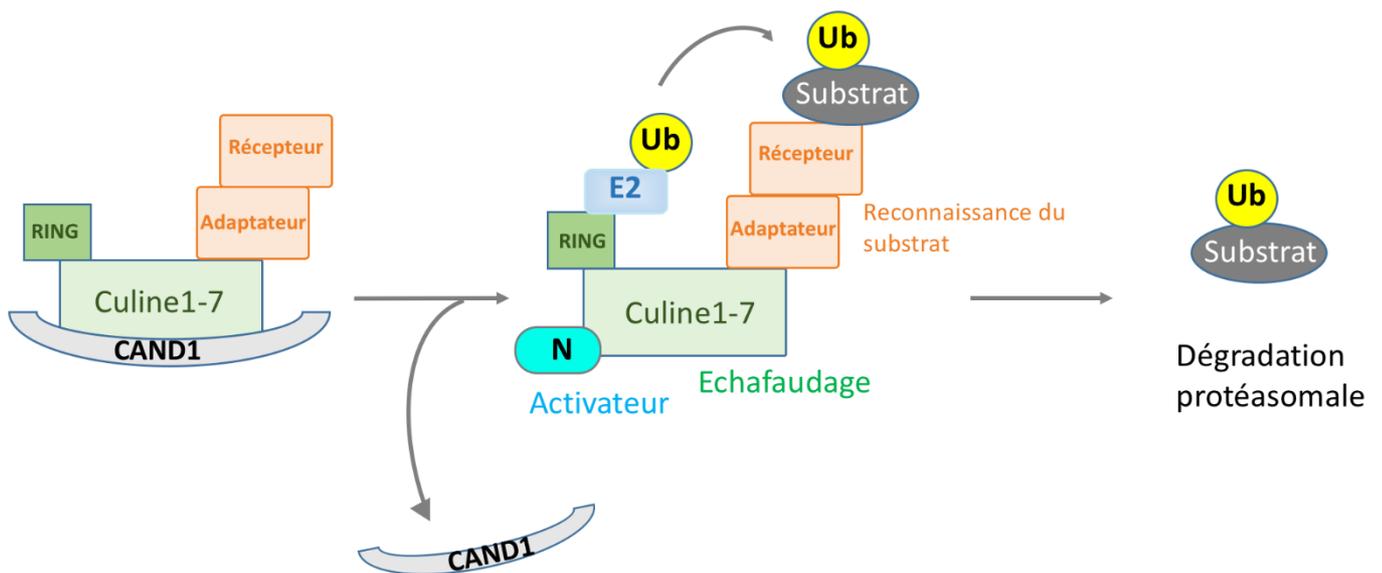


Figure 13 - Neddylation des protéines cullines

Le CRL (« Culling Ring Ligase ») se compose d'une protéine d'échafaudage culline, d'une protéine type RING Rbx1 qui recrute l'ubiquitine E2, d'une protéine adaptatrice Skp1 qui interagit avec une protéine F-box et d'une protéine F-box reconnaissant le substrat. La neddylation médiée de la culline maintient le CRL dans une conformation active pour permettre l'ubiquitination du substrat ce qui empêche la liaison d'une protéine inhibitrice des CRL CAND1 à la culline. L'assemblage d'un CRL fonctionnel amène l'ubiquitine chargée en E2 et le substrat à proximité, permettant le transfert de l'ubiquitine sur le substrat. Après ubiquitination, la deneddylase CSN supprime le NEDD8 de la culline, conduisant au désassemblage du CRL. La culline libérée est alors prête à recruter une autre ubiquitine chargée d'E2 pour le prochain cycle d'ubiquitination. Un cycle dynamique de neddylation et de dénédylation est essentiel pour une activité CRL optimale. L'accumulation de divers substrats de CRL impliqués dans des processus cellulaires clés peuvent conduire à des stress cellulaires provoquant par exemple l'induction de l'apoptose ou de l'autophagie. (Adaptée de Kandala, Kim and Su, 2014; Yang, Hamid and Carvajal, 2018).

NEDD8 utilise le même système enzymatique que l'ubiquitine, **Figure 11** et comprend une glycine C-terminale activée par l'E1 hétérodimérique APPBP1 (Alzheimer-precursor-protein-binding protein-1) – UBA3 (Ubiquitinating-activating enzyme 3) également appelé NAE1. L'enzyme E2, UBC12 et l'enzyme E3 RING RBX1/2. (Cappadocia and Lima, 2018). Les protéines cullines sont des protéines dites d'échafaudage, support des ubiquitines ligases E3 et sont actives seulement quand elles sont neddyées. Ces protéines sont capables de former des complexes avec des protéines de type E3 RING formant un complexe CRL (cullin-RING ligase). RBX1 est un composant du complexe CRL qui régule de nombreux processus cellulaires, incluant le cycle cellulaire, la dégradation protéique, la transduction du signal, la transcription et le développement (van der Veen and Ploegh, 2012; Enchev, Schulman and Peter, 2015). L'activation des CRL est permise par l'attachement covalent de NEDD8 sur les cullines. La neddylation est importante pour le recrutement d'enzymes de type E2 permettant de faciliter la conjugaison de l'ubiquitine (Kawakami *et al.*, 2001; Pan *et al.*, 2004; Sakata *et al.*, 2007), **Figure 13**.

Plusieurs études ont pu mettre en évidence que NEDD8 est capable de former des chaînes *in vitro* et *in vivo*. Néanmoins la fonction spécifique de polyneddylation est mal définie (Ohki *et al.*, 2009). Ce processus de neddylation est réversible et NEDD8 peut être recyclée via une enzyme spécifique. Cette balance entre neddylation et déneddylation doit être extrêmement régulée. Des défauts dans ce cycle peuvent être à l'origine d'une augmentation du niveau de neddylation, reportée dans certains cancers (Abidi and Xirodimas, 2015; Delgado *et al.*, 2018). L'équipe de D.P Xirodimas a pu montrer en 2019 que la déneddylation des chaînes NEDD8 est requise pour l'augmentation du niveau d'HSP70. Cette étude combinant le modèle *C. elegans* et les cellules humaines a pu montrer que la restriction des chaînes NEDD8 par NEDP1, une déneddylase, est nécessaire à l'induction de l'apoptose qui fait suite à des dommages à l'ADN.

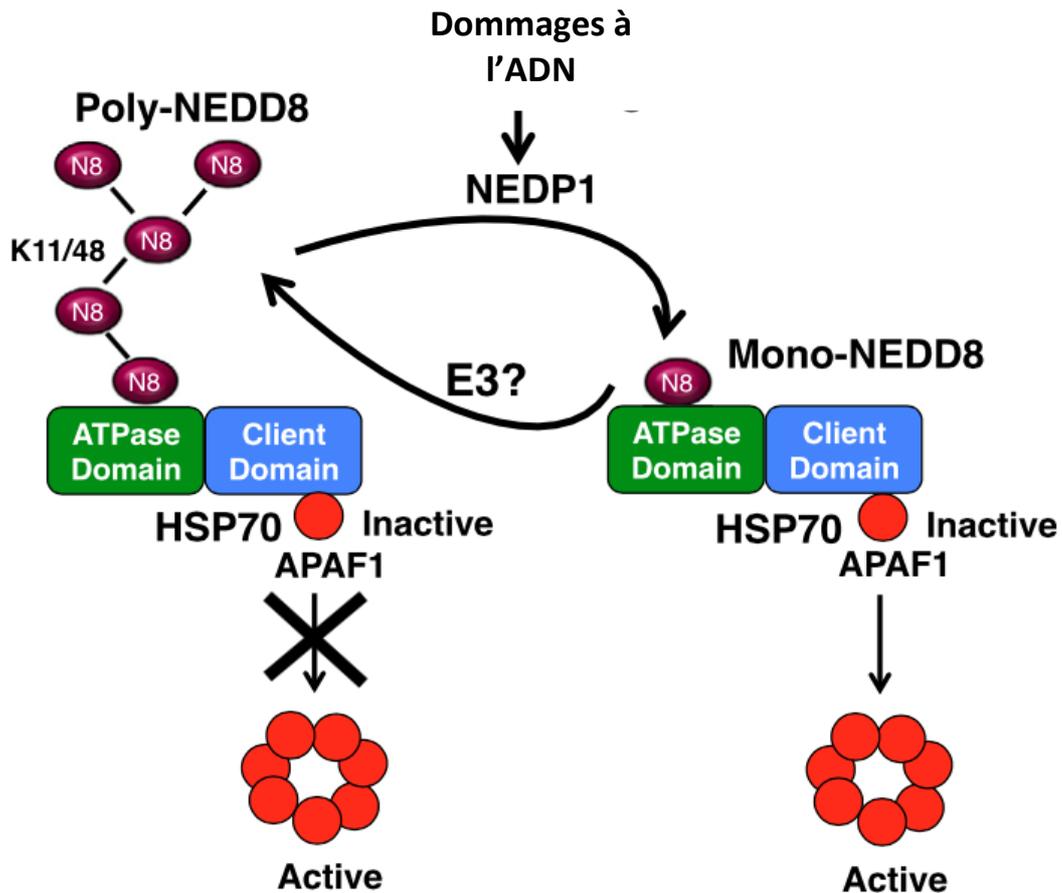


Figure 14 - Balance entre poly-neddylation et mono-neddylation

En cas de dommages à l'ADN, l'induction de l'enzyme NEDP1 (déconjugase) limite la formation des chaînes NEDD8 (principalement K11 et K48). Cela permet de favoriser l'oligomérisation d'APAF1 et l'induction de l'apoptose, cette étape nécessite l'activité ATPase d'HSP70. HSP70 se lie à NEDD8 et, *in vitro*, la conversion des chaînes NEDD8 en mono-NEDD8 stimule l'activité de HSP70 ATPase. Cet effet est indépendant de la conjugaison NEDD8 sur les substrats. L'équilibre entre la mono- et poly-NEDDylation contrôlée par NEDP1 agit comme un module de régulation pour la fonction HSP70 permettant l'induction de l'oligomérisation d'APAF1. (Bailey *et al.*, 2019)

La protéine chaperonne HSP70 est un senseur de la balance mono-NEDD8 versus poly-NEDD8, contrôlée par NEDP1, permettant la formation de l'apoptosome, **Figure 14**. De plus, des données *in vitro* montrent que la dépolymérisation des chaînes NEDD8 est suffisante pour activer HSP70 indépendamment de l'ancrage de NEDD8 à un substrat (Bailly *et al.*, 2019). D'autres études récentes ont pu montrer un nouveau rôle de NEDD8, indépendant de son ancrage à un substrat (autre que lui-même). En effet, NEDD8 trimérique est capable de réguler l'activité de la polymérase 1 (PARP-1), en réponse à un stress oxydatif. Le traitement de cellules avec de l'H₂O₂ se traduit par l'accumulation de chaînes NEDD8. Un type de chaîne particulier, un trimère NEDD8 (tri-NEDD8) non ancré, se lie à PARP-1 et atténue son activation. Une délétion de NEDP1 provoque la formation de tri-NEDD8, entraînant une inhibition de PARP-1 et une protection contre la mort cellulaire dépendante de PARP-1 (Keuss *et al.*, 2019). Les domaines de liaison NEDD8 présentent une forte similitude avec ceux de l'ubiquitine. Les premières protéines de liaison à NEDD8 décrites, sont les régulateurs négatifs NUB1L et son autre isoforme NUB1 (Kito, Yeh and Kamitani, 2001; Tanaka *et al.*, 2003). Ces deux protéines possèdent une séquence consensus à l'extrémité C-terminale intégrée dans le domaine UBA et agissent pour recruter NEDD8 et ses substrats au protéasome pour leur dégradation (Kamitani *et al.*, 2001; Tanji, Tanaka and Kamitani, 2005). NUB1 et NUBAL peuvent également se lier à la molécule FAT10, entraînant sa dégradation et ses cargos associés. Nub1L utilise ses trois domaines UBA pour se lier à Nedd8 ou FAT10 et utilise son domaine UD N-terminal pour livrer sa cargaison au protéasome. (Schmidtke *et al.*, 2006).

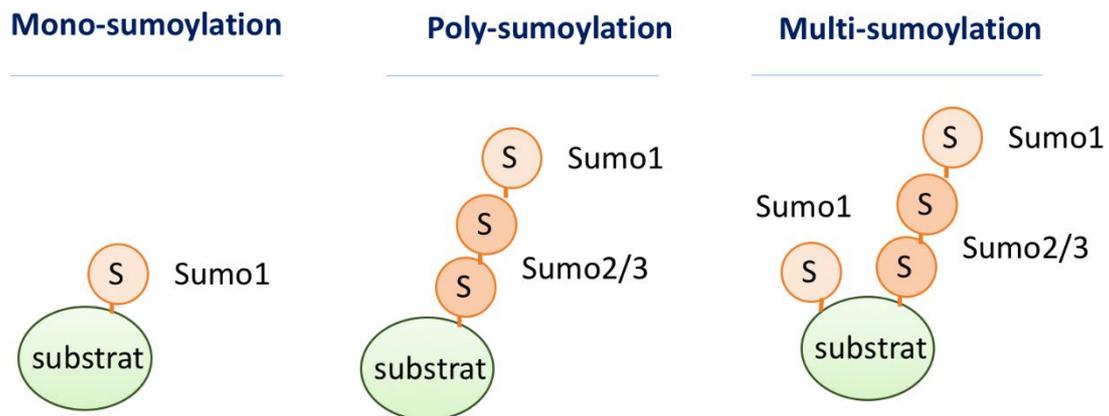


Figure 15 - SUMO2 et SUMO3 peuvent former des chaînes poly-SUMO.

Comme l'ubiquitine, les protéines SUMO sont capables de se lier à un substrat de manière covalente. SUMO1 est dépourvu de résidus lysine internes et est donc un terminateur de chaîne. (Adaptée de Rabellino, Andreani and Scaglioni, 2017).

4.1.2 SUMO

SUMO (Small ubiquitin-like modifier) est une protéine capable de se conjuguer à plus de 1000 protéines dans les cellules de mammifères (Hendriks and Vertegaal, 2016). La SUMOylation, est impliquée notamment dans la régulation de la localisation subcellulaire des protéines, les liaisons ADN-protéine, la transcription, la réparation de l'ADN, le remodelage de la chromatine et l'immunité innée (Hickey, Wilson and Hochstrasser, 2012). Malgré une similarité de séquence de 18%, SUMO partage avec l'ubiquitine une structure proche incluant un β -grasp fold (Bayer *et al.*, 1998). Tous les eucaryotes expriment au moins un membre de la famille SUMO. Chez l'homme les 5 protéines SUMO partagent des similarités de séquence entre les différents membres. SUMO-2 et SUMO-3 ont une identité de séquence de 50% avec SUMO-1 et ont 97% d'identité entre elles, les rendant indistingables par des techniques d'immuno-détection. En dépit de leur similarité, SUMO-2 et SUMO-3 semblent avoir des fonctions différentes, car l'inactivation du gène *sumo-2* chez les souris est létale embryonnaire alors que la perte de fonction totale de *sumo-3* est viable (Wang *et al.*, 2014).

Les protéines SUMO sont capables de former des chaînes via la lysine 11 de SUMO-2 et SUMO-3 (Vertegaal, 2010). Plusieurs types de chaîne ont été identifiées, notamment celle avec la présence de SUMO-1 au niveau de la partie distal de la chaîne (Matic *et al.*, 2008), **Figure 15**.

Alors que l'ubiquitination, l'acétylation et la phosphorylation modifient spécifiquement les protéines dans le cytoplasme, la sumoylation quant à elle, se fait généralement dans le noyau et est impliquée dans la réparation de l'ADN, **Figure 16**, la transcription, l'épissages des pré-ARNm, le remodelage de la chromatine, l'activité ubiquitine-ligase, et la transcription virale (Flotho and Melchior, 2013; Hendriks and Vertegaal, 2016). Les rôles les mieux caractérisés sont la modification des histones, des facteurs de transcriptions, des enzymes modificatrices de la chromatine (Raman, Nayak and Muller, 2013). Dans la plupart des cas la sumoylation provoque l'inhibition de l'expression d'un gène. SUMO peut réguler les facteurs de répression de la transcription HDAC1, HDAC2 et HDAC4 (Kirsh *et al.*, 2002; Yang and Sharrocks, 2004; Hendriks *et al.*, 2014). La sumoylation peut être aussi activatrice. Par exemple, le facteur de transcription Gli est activé par sumoylation et régule positivement la voie Hedgehog (Cox, Briscoe and Ulloa, 2010).

Plusieurs études ont analysé la distribution de SUMO sur la chromatine. Neyret-Kahn et al, par des méthodes de CHIP-Seq, ont détecté que SUMO est distribué dans tout le génome, et est

hautement enrichi au niveau des régions promotrices des gènes (Chang *et al.*, 2013; Neyret-Kahn *et al.*, 2013).

Des études ont pu faire valoir un rôle de SUMO dans la réponse au stress suite à un choc thermique. Niskanen et al ont reporté qu'un stress thermique provoque l'augmentation de la sumoylation de promoteurs et l'augmentation de facteurs de transcription variés (Niskanen *et al.*, 2015).

Il a été rapporté un modèle selon lequel la conjugaison de SUMO-2 à des protéines associées à la chromatine permettrait de maintenir l'homéostasie des complexes protéiques à cet endroit.

De manière non conventionnelle, il a été proposé que la protéine SUMO n'a pas besoin de se conjuguer à une protéine spécifique au sein d'un complexe pour effectuer son effet biologique. Ce concept est appelé « sumoylation groupée » et a été établi pour la première fois en contexte de réparation de l'ADN. La sumoylation du complexe entier plutôt que celle d'une protéine individuelle, sert de plateforme de recrutement à d'autres protéines (Psakhye and Jentsch, 2012).

SUMO et NEDD8 des partenaires de tatami. Des données protéomiques récentes indiquent la création de chaînes hybrides NEDD8-SUMO spécifiques suite à un stress protéique suggérant des connexions entre les Ubl permettant de réagir à un stress cellulaire (Lobato-Gil *et al.*, 2021).

4.2 Motifs de reconnaissance aux Ubl

Contrairement aux domaines de liaisons à l'ubiquitine, les domaines de liaisons aux petites protéines ubiquitine-like modificatrices sont peu caractérisés. NEDD8 est l'Ubl la plus proche de l'ubiquitine en termes d'identité de séquence et de structure, les motifs permettant les liaisons non covalentes avec d'autres protéines sont similaires aux UBD (Bandau *et al.*, 2012; Enchev, Schulman and Peter, 2015). Cependant, certaines études ont pu décrire des motifs qui reconnaissent spécifiquement certaines Ubl telles que les protéines de la famille SUMO et Atg8.

4.2.1 Les SIM

Les motifs reconnaissant spécifiquement la protéine SUMO sont les motifs les mieux caractérisés et sont regroupés sous le terme SIM (sumo-interaction motif, également connu

sous le nom SBD pour SUMO-binding domain). Ces domaines sont notamment retrouvés dans l'enzyme activatrice de SUMO : UBA2 dans les enzymes E3 spécifiques de SUMO, dans certaines enzymes E3 ubiquitines et certains récepteurs et substrat de SUMO.

Chez les eucaryotes supérieurs possédant plusieurs protéine SUMO, certaines SIM semblent avoir des spécificités de liaison pour certains isoformes. Les interactions SUMO-SIM peuvent être modulées par des modifications post-traductionnelles telle que la phosphorylation (Stehmeier and Muller, 2009). En plus des SIM, un autre type de domaine de liaison SUMO a été identifié. Le domaine en doigt de zinc ZZ de HERC2 capable d'interagir avec SUMO sur une surface différente de celle utilisée par les SIM (Danielsen *et al.*, 2012).

4.2.2 Les LIR/AIM/GIM

Les domaines LIR « LC3 interacting region » également appelés « LC3 recognition sequence » (LRS) ou « ATG8-interacting motif (AIM) » ou « gabarap interacting motif (GIM) » sont capables de conduire l'interaction entre de multiples protéines et la famille ATG8. Un récepteur autophagique doit pouvoir se lier spécifiquement à un cargo et au phagophore en formation pour permettre la séquestration du substrat. Le premier récepteur autophagique à avoir été identifié est p62 (également connu sous le nom de séquestosome-1 (SQSTM1) (Bjørkøy *et al.*, 2005; Komatsu *et al.*, 2007; Pankiv *et al.*, 2007). P62 se lie à la fois à l'ubiquitine et à LC3, régule la formation d'agrégats protéiques et est éliminé par autophagie. Une compilation de motifs LIR vérifiés révèle une séquence consensus de base composée de 4 acides aminés: [W/F/T] X-X-[L/I/V] (X = peut être remplacé par n'importe quel acide aminé) (Ichimura *et al.*, 2008; Noda *et al.*, 2008; Birgisdottir, Lamark and Johansen, 2013).

PARTIE 2 - Fonction des protéines ATG8/ LC3/GABARAP dans l'autophagie

La seconde partie de ce manuscrit consiste à répertorier et détailler différents rôles des protéines de la famille Atg8. Les fonctions connues sont en constante augmentation. J'ai choisi de me focaliser sur certaines étapes clés de l'autophagie, processus dans lequel les protéines Atg8 sont le mieux étudiées.

Chez la levure, l'initiation de l'autophagie, la reconnaissance du cargo, et la fermeture des autophagosomes dépendent des protéines Atg8. Cependant chez les mammifères les protéines homologues LC3 et GABARAP présentent des rôles spécifiques au sein de ce processus. Les protéines GABARAP semblent être particulièrement importantes pour certaines étapes, notamment le recrutement de la machinerie autophagique au niveau des membranes et pour la fermeture des autophagosomes, les LC3 semblent être importants dans les étapes d'élongation des structures autophagosomales. Cependant, les mécanismes moléculaires régulant la dynamique spatio-temporelle et les fonctions des différentes Atg8 restent peu connus. Bien que les protéines ATG8 aient été utilisées comme des marqueurs d'étude de l'autophagie pendant plus de deux décennies, leurs rôles commencent simplement à être compris. Le degré de redondance de chaque membre est peu étudié, il n'est pas connu si le rôle des Atg8 dans l'autophagie est différent en fonction du signal ou du stress inducteur et de la présence de certains types de cargos ou non.

Je commencerai cette partie par des généralités sur l'autophagie et les enjeux majeurs de l'étude de ce processus. Puis je présenterai les différents membres de cette famille, leurs séquences protéiques, leurs structures et conformations. Je terminerai par détailler le processus autophagique, de l'initiation à sa régulation, en ayant toujours comme fil conducteur le rôle connu des protéines Atg8 dans chacune de ces différentes étapes. Lorsqu'il est établi, le rôle des homologues LGG-1 et LGG-2 et les particularités chez *C. elegans* sont mis en lumière (encadrements verts).

I. L'autophagie, un processus de dégradation lysosomal

1.1 Découverte et définition

L'autophagie est un processus de dégradation intracellulaire essentiel au maintien de l'homéostasie dans tous les organismes eucaryotes de la levure au mammifère.

L'autophagie pour la qualifier comme telle, quel que soit son type, présente au moins deux caractéristiques : (1) implique du matériel intracellulaire et (2) dépend d'une voie de dégradation lysosomale. Ces propriétés sont importantes pour la différencier d'autres voies cataboliques telles que la dégradation protéosomale.

Le terme **autophagie** provient du grec, *auto* « soi-même » et *phagien* « manger », signifiant « se manger soi-même ». Contrairement au dogme selon lequel ce terme a été inventé pour la première fois par Christian de Duve en 1963, le mot autophagie est largement utilisé dans la littérature scientifique et non scientifique entre 1860 et 1963. La première appellation proviendrait d'un physiologiste français, M. Anselmier, publiée en 1859 dans le journal « Des séances de l'Académie de Sciences » (Ktistakis, 2017). A cette période, ce terme est utilisé pour décrire la résistance à des périodes de famine par ses propres ressources. Cela faisait notamment référence aux marins et navigateurs supportant de longues périodes de privation de nourriture. Anselmier a fait subir à des animaux une période de privation de nourriture et proposait de résister aux conséquences de l'inanition en pratiquant des saignements légers du corps des animaux pour leur faire boire leur propre sang. Ces travaux ont permis d'établir une première définition de l'autophagie en 1865 dans « le nouveau dictionnaire de médecine et de chirurgie pratiques », comme étant une manière de prolonger la vie en contexte de privation, et oppose l'autophagie dite spontanée à l'autophagie artificielle.

La découverte du **lysosome** en 1955 par Christian de Duve permet une avancée considérable des connaissances des mécanismes de dégradation intracellulaire. Par des expériences de centrifugation, F. Appelmans et son équipe ont pu isoler un groupe de granules cytoplasmiques contenant des enzymes hydrolytiques qu'ils proposent de référencer sous le terme de lysosome (de Duve *et al.*, 1955).

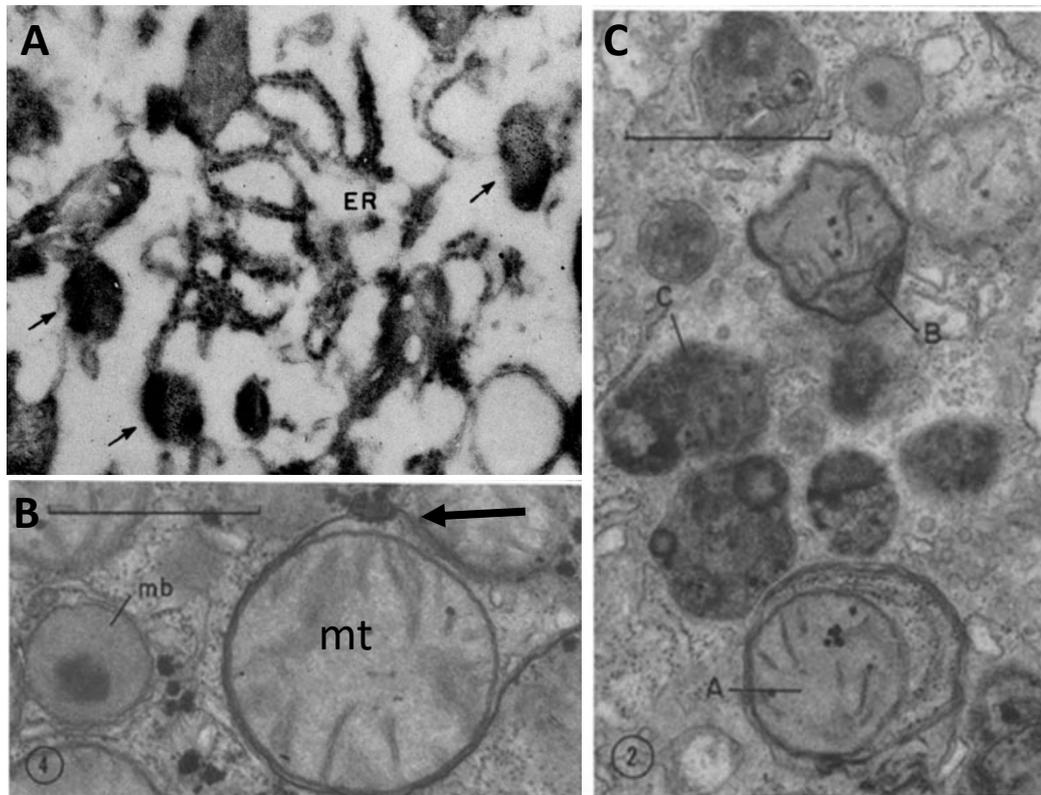


Figure 17 - Images de microscopie électronique de vésicules autophagiques

A – Images de microscopie électronique de 1956 montrant pour la première fois des corps denses et des lysosomes (flèches noires) dans des extraits de foie de rat (Novikoff, Beaufay and de Duve, 1956).
B – Image de microscopie électronique de 1963 (Penn and Ashford, 1963) permettant de visualiser une mitochondrie non dégradée entourée d'une membrane dense dans des extraits de foie de rat.
C – Images de microscopie électronique de 1963 présentant plusieurs vésicules à des stades de dégénérescence de mitochondrie différents. Le corps A est interprété comme une forme précoce où une mitochondrie non dégradée est entourée d'une membrane. Le corps B est probablement plus avancé avec une forme différente de mitochondrie. Le corps C est interprété comme une métamorphose presque complète de la mitochondrie. Il est mentionné dans l'article que des crêtes et des granules peuvent être encore trouvés après examen attentif suggérant la présence préalable d'une mitochondrie (Penn and Ashford, 1963).

Par la suite, la microscopie électronique a permis l'observation d'un nouveau type de structures vésiculaires à double membrane, **les autophagosomes**, contenant du matériel cytoplasmique et des organites divers (Clark, 1957; Ashford and Porter, 1962). De plus, des mitochondries et du réticulum endoplasmique sont retrouvés dans des vacuoles contenant des enzymes lysosomales (Novikoff, Beaufay and de Duve, 1956), **Figure 17**. Ces découvertes représentent une révolution pour l'analyse morphologique de l'autophagie et ont permis d'établir la définition de l'autophagie en 1963 à l'occasion de la « Ciba Foundation Symposium on Lysosomes » **comme un processus de dégradation par lequel les matériaux intracellulaires sont livrés au lysosome ou à la vacuole pour être dégradés.**

1.2 Trois types d'autophagies

L'activité lysosomale est une caractéristique importante pour distinguer l'autophagie des autres voies cataboliques dégradant du matériel cytoplasmique, comme la dégradation protéasomique. Il existe différents types d'autophagies, les majoritaires sont la microautophagie, l'autophagie médiée par les chaperons et la macroautophagie. Ces trois types d'autophagies ont des mécanismes d'actions et de régulations différents et ont comme caractéristiques communes la dégradation lysosomale des constituants. J'ai fait le choix de présenter brièvement ces trois types d'autophagie. De nombreuses revues décrivent de manière précise les rôles et mécanismes moléculaires de chacune (Boya, Reggiori and Codogno, 2013; Cuervo and Wong, 2014). Mon travail est focalisé sur la macroautophagie, appelée communément autophagie dans la suite du manuscrit, **Figure 18**.

1.2.1 La microautophagie

La microautophagie (IM) est définie comme l'engloutissement des cargos cytosoliques directement via l'invagination de la membrane lysosomale/vacuolaire. Ce processus, découvert par de Duve et Wattiaux en 1966, concerne la dégradation de protéines solubles ou même des cargaisons plus importantes telles qu'une partie du noyau, des gouttelettes lipidiques, des mitochondries et des endosomes (Veenhuis *et al.*, 1983; Tuttle, Lewin and Dunn, 1993; Yokota *et al.*, 1993; Tuttle and Dunn, 1995; Kissová *et al.*, 2007). Les membranes lysosomales se déforment localement pour dégrader directement le substrat.

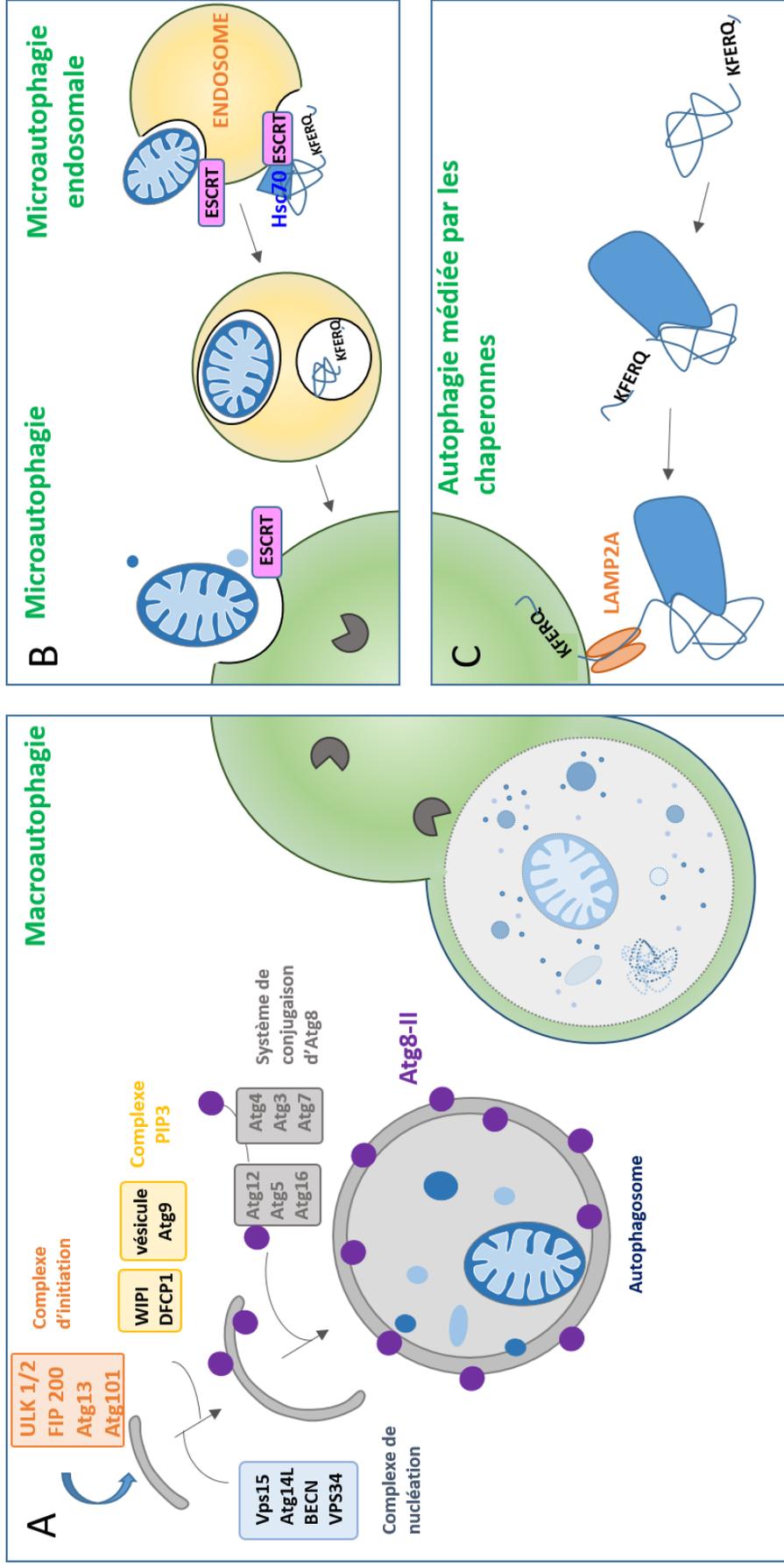


Figure 18 – Schéma des trois types d'autophagie

A- La macroautophagie, communément appelée autophagie, est caractérisée par la séquestration des cargaisons dans une structure à double membrane, les autophagosomes. Le phagophore, qui s'allonge et se ferme pour générer une vésicule à double membrane. La membrane externe de l'autophagosome fusionne avec le lysosome pour générer un compartiment acide et dégradant, l'autolysosome, permettant le recyclage des cargos. Le complexe ULK1 / 2 (UNC-51 comme la kinase activant l'autophagie 1/2) est impliqué dans l'étape d'initiation du processus. Le complexe de classe III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) induit localement la synthèse de PI3P (phosphatidylinositol 3 phosphate) et permet la nucléation du phagophore en recrutant le complexe de liaison PI3P. Les systèmes de conjugaison Atg12 et Atg8 contrôlent l'allongement du phagophore pour former l'autophagosome par lipéidation d'Atg8 en phosphatidylethanolamine (PE). **B-** L'invagination membranaire de l'endosome ou du lysosome permet la séquestration directe des cargaisons dans les compartiments de dégradation par microautophagie endosomale ou microautophagie, respectivement. **C-** L'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) cible les protéines contenant le motif KFERQ qui est reconnu par plusieurs chaperons, y compris Hsp70. Au cours de la CMA, LAMP2 intervient dans le transfert d'agrégats de protéines Hsp70 dans le lysosome.

L'IM dépend de l'activité des complexes de tri endosomal requis pour les machines de transport (ESCRT) (Oku *et al.*, 2017). Un mécanisme lié à la microautophagie, appelé microautophagie endosomale (eMI), partage avec l'IM de nombreuses caractéristiques mais implique l'endosome (Sahu *et al.*, 2011; Uytterhoeven *et al.*, 2015; Mukherjee *et al.*, 2016). Dans les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF), les organites tels que les mitochondries pourraient être guidés vers l'endosome précoce positif Rab5 et sont engloutis dans un mécanisme dépendant des ESCRT-0, -I et -II (Hammerling *et al.*, 2017).

1.2.2 L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes

L'autophagie médiée par Chaperon (CMA) est un autre type d'autophagie qui permet de diriger directement des substrats vers le lysosome pour la dégradation (Majeski and Dice, 2004; Massey, Kiffin and Cuervo, 2004). Ce mécanisme cible des protéines possédant un domaine KFERQ présent dans environ 30 % des protéines cytosoliques. Chez les mammifères, ces protéines sont reconnues par des protéines chaperonnes et co-chaperonnes telles que Hsc70 (Heat shock protein 70), HSp40, Hsp90, Hip, Hop, et Bag1.



Ni la micro autophagie ni la CMA n'ont encore été examinées chez *C. elegans*. De plus la protéine LAMP-2 A est importante pour la CMA et n'est pas conservée chez le nématode. Mais l'existence d'un orthologue fonctionnel ne peut être exclue. (Palmisano and Meléndez, 2019)

1.2.3 La macroautophagie

La macroautophagie consiste en la dégradation massive de composants cellulaires par un système vésiculaire (Mizushima, 2007). Ce processus est dynamique et fait intervenir un grand nombre d'acteurs impliqués dans des événements de formation membranaire autour de matériel cytoplasmique à dégrader. En effet, une citerne membranaire appelée phagophore englobe progressivement un substrat qui se retrouve piégé à l'intérieur d'une vésicule ceinte par deux membranes, l'autophagosome. Par la suite, la membrane externe de l'autophagosome fusionne avec le compartiment lytique. Les hydrolases dégradent la membrane interne de l'autophagosomes et son contenu, **Figure 18A**.

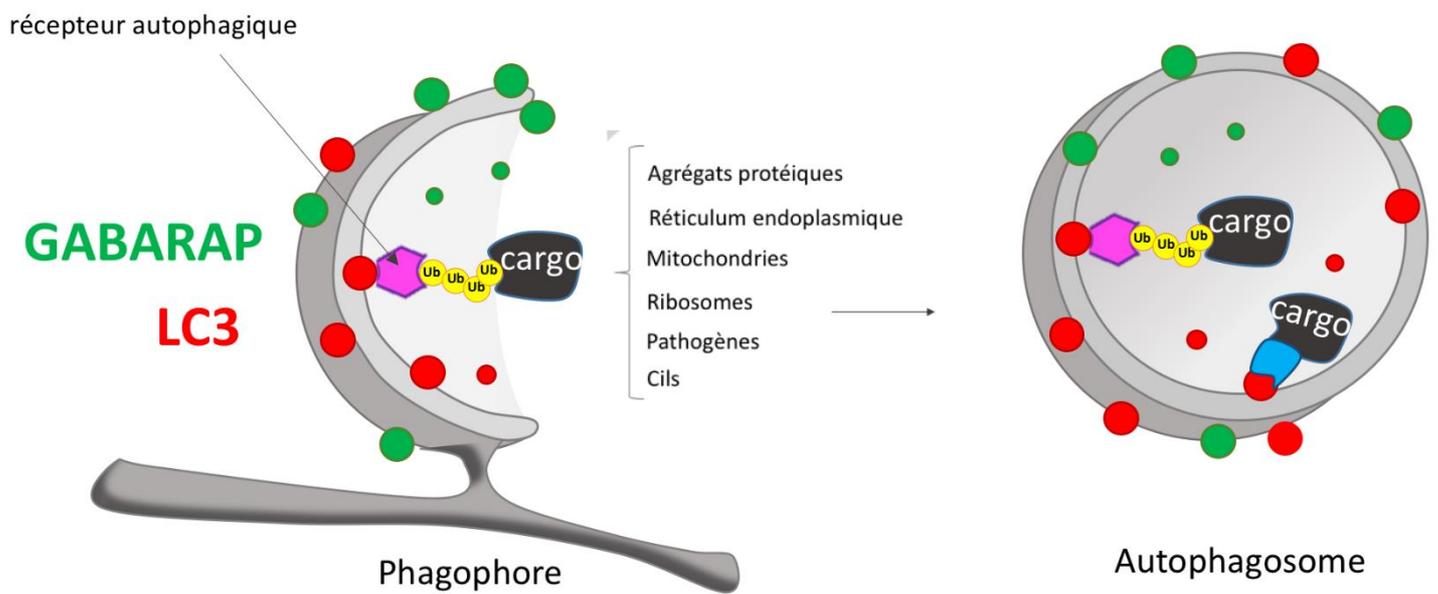


Figure 19 – Dégradation sélective de cargos via des récepteurs spécifiques

Une membrane d'isolation, sur laquelle des protéines autophagiques sont fixées, se forme autour de cargos spécifiques reconnus par des récepteurs autophagiques. Le phagophore s'étend pour former un autophagosome qui englobe le substrat et fusionne ensuite avec le lysosome pour en dégrader le contenu.

1.3 Autophagie sélective

J'ai pris le parti de décrire l'autophagie sélective de manière temporelle. Depuis 1963 l'autophagie est considérée comme non sélective, par la dégradation aléatoire de constituants cytoplasmiques. C'est au début des années 2000, que de nouvelles études suggèrent que certains cargos sont dégradés de manière sélective, nécessitant des facteurs supplémentaires en plus de la machinerie principale (Kirkin, 2020). L'autophagie dite sélective utilise des récepteurs et des adaptateurs pour isoler spécifiquement un cargo autour des membranes autophagosomales en croissance, **Figure 19**.

Certains composants tels que des pathogènes intracellulaires (xénophagie), des agrégats protéiques (agréphagie), des morceaux de réticulum endoplasmique (RE-phagie) ou de mitochondries (mitophagie) peuvent être spécifiquement dégradés. Le mécanisme précis de reconnaissance des substrats n'est pas bien caractérisé, néanmoins les cargos sont généralement polyubiquitinés et reconnus par un récepteur protéique possédant un domaine de reconnaissance à l'ubiquitine (UBA).

Les cargos peuvent être directement liés aux récepteurs sans ubiquitine par des domaines de liaison aux protéines. Les récepteurs autophagiques ont comme caractéristique de pouvoir interagir avec les protéines Atg8/LC3/GABARAP via un domaine LIR, permettant la formation de l'autophagosome proche du substrat. La dégradation des composés est essentielle au maintien de l'homéostasie cellulaire au cours du développement et à la longévité. Comprendre comment l'autophagie sélective régule les processus physiologiques représente un enjeu majeur. Ces dix dernières années ont connu une explosion croissante du nombre de publications sur la dégradation sélective de cargos.

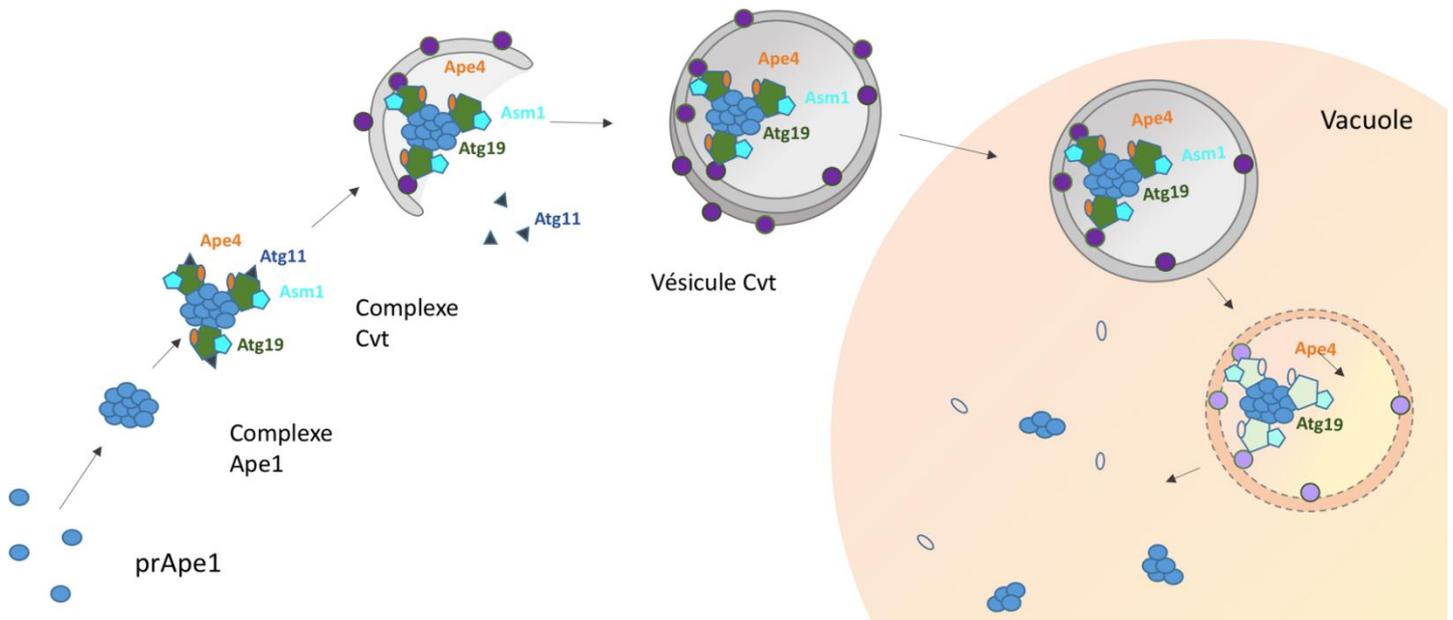


Figure 20 - Schéma de la voie Cvt

Les précurseurs Ape1 (prApe1) s'assemblent pour former des complexe Ape1. Atg19 se lie au complexe Ape pour former le complexe Cvt. D'autres cargaisons Cvt, y compris Ams1 et Ape4 et Ag11, lient Atg19 à des domaines distincts. Formation d'une vésicule Cvt : Atg19 lie Atg8-PE permettant la séquestration du complexe Cvt par le phagophore à double membrane. Par la suite la membrane externe de la vésicule Cvt fusionne avec la vacuole libérant la vésicule cvt à simple membrane dans la lumière de la vacuole. L'enzyme Ape1 devient active. (Adaptée de Umekawa and Klionsky 2012).

- *Cvt*

Le premier modèle d'autophagie sélectif décrit, est un processus présent chez la levure appelé la « voie de ciblage du cytoplasme vers la vacuole » (*Cvt* pour « cytoplasm-to-vacuole-targeting pathway»). Il est important de mentionner ici que la voie *Cvt* n'est pas considérée comme une voie autophagique au sens strict. En effet, elle ne permet pas la dégradation mais la maturation d'une protéine. Cette voie, décrite uniquement chez la levure, est responsable de l'adressage de deux enzymes, l'aminopeptidase I (*Ape1*) et l' α -mannosidase (*Ams1*), spécifiquement à la vacuole. Les formes précurseur de ces enzymes, *prApe1* et *prAsm1* sont transportées à la vacuole par des vésicules à double membranes afin d'être clivées en forme mature (Klionsky and Ohsumi, 1999; Lynch-Day and Klionsky, 2010).

En 1999, une équipe a pu mettre en évidence que la voie *Cvt* utilise des acteurs de la machinerie autophagique telle que *Atg1*, *Atg5*, *Atg7*, *Atg8* et *Atg10*. (Klionsky and Ohsumi, 1999). Ces études ont permis de définir pour la première fois une protéine additionnelle, *Atg19* (préalablement nommée *YOLO82w* puis *cvt19*) capable d'interagir avec *prApe1* et *Atg8*. Cette interaction entre *Atg19* et *Atg8* se fait à l'aide du domaine LIR (voir partie 1 4.2.2).

Par la suite *Atg34* est défini également comme récepteur spécifique requis pour le trafic d'*Ams1* à la vacuole en condition de starvation (Suzuki *et al.*, 2010; Watanabe *et al.*, 2010). *Atg19* et *Atg34* sont capables de se lier directement aux cargos et d'interagir avec *Atg8* pour permettre la séquestration de ces enzymes dans des vésicules de type *Cvt*. La vésicule de type *Cvt* possède des similarités morphologiques avec l'autophagosome par la présence d'une double membrane mais sa taille est plus petite (Guiboileau and Masclaux-Daubresse, 2012). Cette vésicule est véhiculée vers le compartiment hydrolytique, où sa membrane externe fusionne avec celle de la vacuole, libérant ainsi la protéine, **Figure 20**.

- Les récepteurs autophagiques

C'est en 2005, que l'équipe de Johansen fait une découverte majeure en faisant valoir pour la première fois le rôle de p62/SQSTM1, une protéine capable de se lier à l'ubiquitine, en tant que récepteur autophagique. Cette étude met en évidence que les cargos ubiquitinylés sont capables de recruter p62/SQSTM1 pour permettre leur dégradation lysosomale. Dans cette étude l'inhibition de l'autophagie conduit à une augmentation du nombre et de la taille des agrégats positifs pour p62. La protéine LC3 colocalise et immunoprécipite avec p62. Il est intéressant de constater que la déplétion de p62 empêche le recrutement de LC3 aux autophagosomes en condition de starvation. (Bjørkøy *et al.*, 2005). Par la suite, la même équipe démontre une interaction directe entre p62/SQSTM1 et les membres de la famille LC3 et GABARAP via le domaine LIR. L'utilisation d'un outil sensible au Ph, consistant en une fusion en tandem de la mCherry (non sensible au ph acide) – GFP (sensible au ph) en partie N-terminale de p62/SQSTM1 démontre l'adressage de cette protéine aux lysosomes (Pankiv *et al.*, 2007).

D'une part ces études sont importantes d'un point de vue pathologique puisque les agrégats protéiques, par leurs cytotoxicités, sont fréquemment associés à des maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Huntington, Alzheimer ou encore de Parkinson (Zatloukal *et al.*, 2002; Hyttinen *et al.*, 2014). D'autre part, elles ont également permis de caractériser les types d'interacteurs et d'établir la définition actuelle **du récepteur autophagique comme une protéine capable d'induire la dégradation spécifique d'un cargo via interaction avec la machinerie autophagique.**

La notion de dégradation est importante pour permettre de qualifier une protéine de « récepteur autophagique » plutôt que « d'adaptateur protéique ». En effet, un nombre croissant d'interacteurs d'Atg8 sont des adaptateurs autophagiques qui ne sont pas dégradés par autophagie et remplissent diverses fonctions allant de la formation des autophagosomes (par exemple, le complexe ULK), à la fusion avec le lysosome (par tel que PLEKHM119) et au transport de l'autophagosome (par exemple : FYCO). A contrario, le récepteur autophagique pour le considérer comme tel, est dégradé par la voie lysosomale.

Les récepteurs autophagiques sont référencés sous l'acronyme SAR pour « Selective Autophagy Receptor ». Les découvertes des premiers SAR chez la levure et chez les mammifères ont permis d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans l'autophagie sélective. Le **Tableau 5** répertorie les récepteurs autophagiques majoritairement étudiés.

- Les récepteurs autophagiques reconnaissant l'ubiquitine

Une étude a pu mettre en évidence, en 2009, NBR1 (neighbor of BRCA1 gene 1) comme récepteur autophagique contenant un domaine LIR et un domaine UBD. Cette protéine est recrutée comme p62, au niveau d'agrégats protéiques ubiquitynilés et dégradée par autophagie (Kirkin *et al.*, 2009). NBR1 et P62 interagissent entre eux via un domaine N-terminal : le domaine PB1, important pour la formation et la dégradation des agrégats (Lamark *et al.*, 2003). En 2010, des expériences protéomiques, d'immunoprécipitation et de spectrométrie de masse, ont permis d'élargir le paysage des protéines interagissant avec les LC3 et GABARAP. Les six orthologues ATG8 chez l'homme interagissent avec une cohorte de 67 protéines, avec un chevauchement important des partenaires de liaison entre les différents membres de la famille. (Behrends *et al.*, 2010). Cette étude a permis une réelle prise de conscience quant au nombre de protéines capables d'interagir à la fois avec LC3/ GABARAP et les cargos et a provoqué une explosion croissante des connaissances sur l'autophagie sélective.

Un grand nombre d'études ont pu déterminer par la suite que les cellules expriment de nombreux récepteurs autophagiques qui ont des fonctions superposables. Cela est dû au fait que certains récepteurs reconnaissent le cargo indirectement via leurs domaines de liaison à l'ubiquitine (Khaminets, Behl and Dikic, 2016). A titre d'exemple SQSTM1/p62, NBR1, NDP52 (également nommé : CALCOCO2), Optineurine (OPTN) reconnaissent l'ubiquitine ancrée sur des cargos. P62 est notamment capable de coopérer avec NDP52 et OPTN pour la dégradation de pathogènes intracellulaires (xénophagie). NDP52 et OPTN ont des fonctions partiellement chevauchantes dans la dégradation des mitochondries endommagées (Thurston *et al.*, 2009; Zheng *et al.*, 2009; Wild *et al.*, 2011; Lazarou *et al.*, 2015). TAX1BP1, un paralogue de NDP52 a des fonctions multiples, à la fois dans la dégradation sélective de pathogènes (xénophagie) mais également au cours de la mitophagie, (Tumbarello *et al.*, 2015).

Autophagie sélective	Récepteurs autophagiques
Agréphagie- Dégradation sélective d'agrégats protéiques	NBR1, OPTN, p62
Allophagie : Dégradation des composants paternels chez <i>C. elegans</i> dont les mitochondries	ALLO-1, FNDC-1
Chlorophagie- Dégradation sélective de chloroplastes	n.d
Ferritinophagie : Dégradation sélective de la ferritine	NCO4A
Glycophagie : Dégradation sélective du glycogène	Stbd1
Lipophagie : Dégradation sélective des gouttelettes lipidiques	n.d
Lysophagie : Dégradation sélective des lysosomes	TRIM16, NDP52
Mitophagie – Dégradation sélective des mitochondries	Dépendant de l'ubiquitine : NDP52, OPTN, p62, TAX1BP1, AMBRA1 Indépendant de l'ubiquitine : NIX, BNIP3, FUNDC1, Bcl2L13, FKBP8, PHB2, NLRX1, AMBR 1
Myelinophagie : Dégradation sélective de la myéline	
Nucléophagie : Dégradation sélective d'une partie du noyau	Lamin B1
Pexophagie : Dégradation sélective du péroxysome	NBRA, p62
RE-phagie ou réticulophagie : Dégradation sélective de fragment du RE.	FAM134B, SEC62, RTN3, CCPG1, ATL3, TEX264
Ribophagie : Dégradation sélective des ribosomes	NUF1P1
Virophagie : Dégradation sélective des virus	Virus : p62, TRIM
Xénophagie : Dégradation sélective des bactéries et d'autres pathogènes	Bactérie : NDP52 p62, OPTN, TAX1BP1
Zymophagie : Dégradation des granules zymogène dans les cellules pancréatiques	P62

Tableau 5 - Autophagies sélectives et récepteurs autophagiques

- Les récepteurs autophagiques interagissant directement avec les cargos

D'autres récepteurs sont spécifiques d'un cargo par liaison directe avec ce dernier sans passer par un intermédiaire ubiquitine, **Tableau 5**. A titre de preuve, le premier récepteur autophagique chez les mammifères, découvert en 2010, cible spécifiquement la mitochondrie, indépendamment de l'ubiquitine et de Parkin, et est donc impliqué dans la mitophagie. En effet, le groupe D'Ivan Dikic et Paul Ney montre que NIX (également appelé BNIP3L), se lie préférentiellement aux protéines de la famille GABARAP via le motif LIR N-terminal, permettant le recrutement de cette Ubl au niveau de la mitochondrie dépolarisée (Novak *et al.*, 2010). D'autres exemples tels que BNIP3 (Hanna *et al.*, 2012), Bcl2-L-13 (l'homologue fonctionnelle d'Atg32) (Otsu, Murakawa and Yamaguchi, 2015), FUNDC1 (Liu *et al.*, 2012) et FKBP8 (Bhujabal *et al.*, 2017) sont des protéines mitochondriales de la membrane externe, mais certaines (par exemple FUNDC1, BNIP3 et NIX) sont exprimées de manière inductible en réponse à l'hypoxie. Par contraste, PHB2 et NIPSN sont des protéines internes de la membrane mitochondriale qui deviennent accessibles aux facteurs LC3/GABARAP lors de la dépolarisation de la membrane mitochondriale. Le mécanisme de mitophagie et plus particulièrement chez *C. elegans*, est détaillé en partie III du manuscrit.

Il est intéressant de mentionner ici que les récepteurs autophagiques sont majoritairement de type protéique mais peuvent être aussi de nature lipidique. En effet, un groupe de l'université de Pittsburg en 2013 montre que les homologues d'Atg8 chez les mammifères peuvent directement interagir avec un phospholipide particulier : la cardiolipine au cours de la dépolarisation mitochondriale, (Chu et al., 2013).

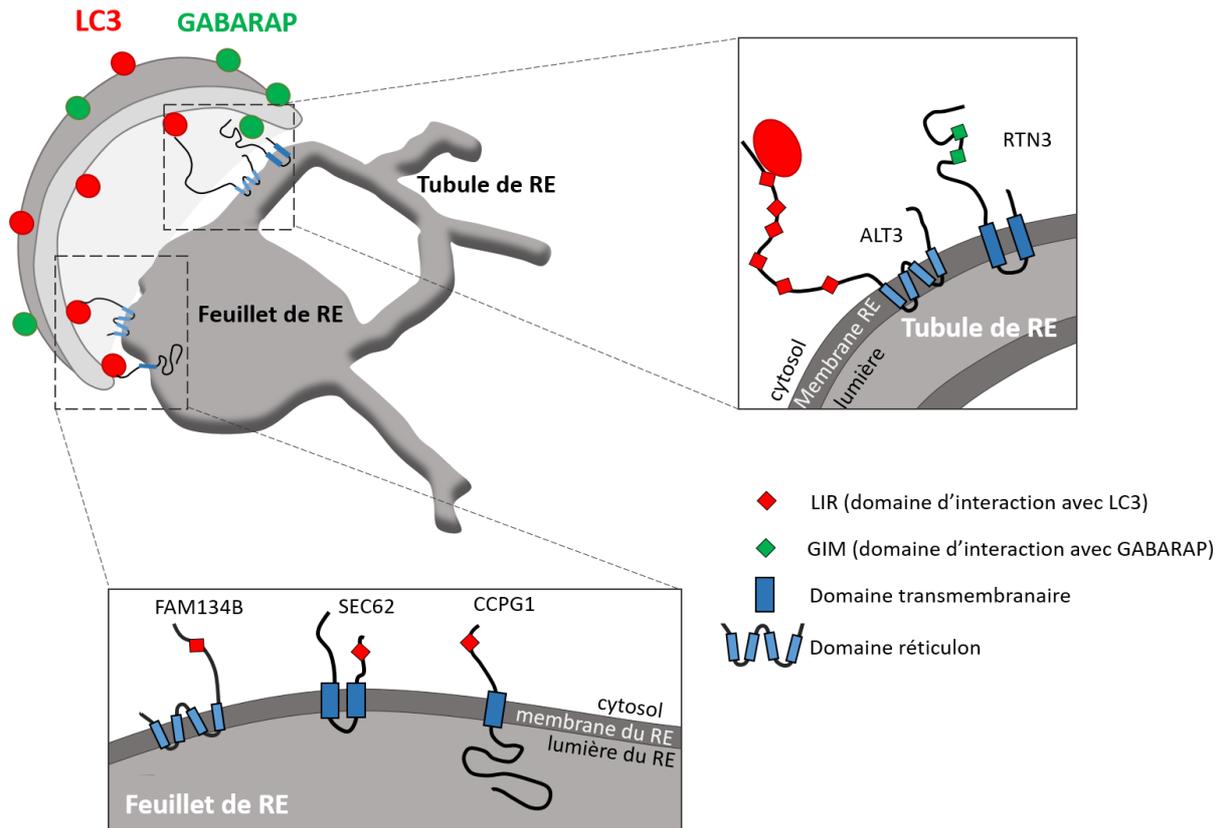


Figure 21 - Récepteurs de la REphagie chez les mammifères

Les protéines de types ATG8 interagissent avec les récepteurs autophagiques situés sur la membrane du RE. La figure présente la localisation cinq récepteurs chez les mammifère RTN3, ALT3, FAM134B, SEC62 et CCPG1. (Adaptée de Fregno *et al.*, 2018; Forrester *et al.*, 2019 et V.Scarcelli).

- Un exemple d'autophagie sélective : la Reticulophagie

L'autophagie peut cibler de manière sélective d'autres cargos tels que le reticulum endoplasmique (RE). Contrairement à la mitophagie, la reticulophagie (REphagie) est moins documentée, la première caractérisation de ce processus a été découverte chez la levure en 2006 au cours du processus UPR (unfolded protein response). Ce n'est que 11 ans plus tard qu'Atg39 et Atg40 sont identifiées comme récepteurs spécifiques de la REphagie. Ces deux protéines ne localisent pas aux mêmes endroits du RE, Atg39 est située en région périnucléaire, alors qu'Atg40 est retrouvée en zone corticale, suggérant des types de REphagie différente. (Mochida *et al.*, 2015). Des protéines résidentes de cet organite telles que CCPG1, FAM134B (homologue d'Atg40) RTNL3L (Wilkinson, 2020), Sec62 (Fumagalli *et al.*, 2016), RTN3 (Grumati *et al.*, 2017), ATL3 (Chen, Chen and Huang, 2019), p. 3) et TEX264 (Chino *et al.*, 2019) ont été par la suite identifiées comme intervenant dans la dégradation de

Double casquette des récepteurs autophagiques : des études récentes ont pu mettre en avant que les récepteurs autophagiques ont non seulement un rôle de reconnaissance du substrat mais également dans l'induction de l'autophagie. La protéine de type récepteur autophagique CCPG1, sans rôle physiologique connu, est également capable de se lier à FIP200 (nommé aussi RB1CC1) via un motif particulier. FIP200 est une protéine du complexe inducteur de l'autophagie capable de recruter la kinase inductrice ULK. Le gène CCPG1 est inductible à la suite d'un stress UPR suggérant ici un lien entre stress du RE et REphagie (Smith *et al.*, 2018).

parties du RE . Ces SAR sont toutes des protéines situées dans la membrane du RE et possèdent un ou plusieurs domaines LIR, **Figure 21**.

 Ces protéines sont importantes pour la courbure des membranes. Elles possèdent un domaine RHD (reticulon homology domain), et sont appelées les protéines réticulons ou réticulon-like. Chez *C. elegans*, aucune donnée n'a permis de mettre en évidence une dégradation spécifique du RE. Un seul gène homologue des réticulons chez les mammifères est retrouvé chez *C. elegans*, appelé *ret-1* et fait l'objet d'un projet de recherche du laboratoire.

Complexe	Famille de Protéine	Espèce	Rôle physiologique
Initiation Atg1 Ulk	Atg1	<i>D. melanogaster</i>	Développement larvaire/ Longévité
		Souris	Différenciation des érythroblastes et neuronale
		<i>C. elegans</i>	Longévité/ guidage axonal / taille des animaux
	Atg13	<i>Souris</i>	Développement embryonnaire
Nucléation PI3K	Vps34	<i>Souris</i>	Différenciation des lymphocytes
		<i>D. melanogaster</i>	Développement Larvaire et longévité
		Souris / Homme	Développement du placenta, morphogénèse cardiaque, formation cavité aminiotique, Tumorigénèse
		<i>C. elegans</i>	Longévité
Vésicules Atg 9	Atg 9	Souris	Croissance du fœtus
Système de conjugaison Atg12 / Atg5	Atg12	Souris	Survie à la naissance, Dégradation de protéines maternelles, croissance du fœtus
		Poisson zèbre	Morphogénèse Cardiaque
		<i>D. melanogaster</i>	Vieillessement
	Atg5	Souris	Formation cavité Amniotique et neurogénèse
Système de conjugaison Atg7 / Atg3 / Atg8	Atg8	Souris et Homme	Différenciation des cellules souches neuronales, croissance du fœtus et développement du placenta
		<i>D. melanogaster</i>	Longévité
		<i>C. elegans</i>	Survie des L1 en carence nutritionnelle, survie des larves dauer, dégradation des neuroblastes Q, dégradation des P-granules, dégradation des mitochondries paternelles
		<i>Souris</i>	Survie à la naissance, Fromation de l'acrosome, Croissance du fœtus, différenciation des érythroblastes, maintenance des cellules souches, hématopoïétiques, Neurogénèse, Adipogénèse, morphogénèse cardiaque
		<i>Poulet</i>	Transition épithélio-mésenchymateuse,
		<i>Poisson zèbre</i>	Morphogénèse cardiaque
	Atg7	<i>C. elegans</i>	Longévité,
		<i>Souris</i>	Croissance du fœtus
		<i>Atg3</i>	
		<i>Souris</i>	

Tableau 6 - Rôles physiologiques des protéines ATG

1.4 Rôle physiologique de l'autophagie

L'autophagie est impliquée dans de nombreux processus physiologiques et pathologiques notamment au cours du développement, l'organogénèse, la différenciation cellulaire, l'apoptose et au cours du vieillissement. Chez les métazoaires, l'autophagie est importante dès la fécondation, en effet, seules les mitochondries maternelles sont conservées. La dégradation des mitochondries paternelles est un processus important pour éviter l'accumulation de mitochondries délétères. Des études chez la drosophile ont pu montrer que les structures paternelles sont dégradées par autophagie (Politi *et al.*, 2014).

Chez *C. elegans*, un processus de dégradation sélectif par autophagie appelé allophagie est essentiel à la dégradation des organites des spermatozoïdes (Manil-Ségalen *et al.*, 2014; Wei *et al.*, 2017; Sato *et al.*, 2018). Le processus d'autophagie est essentiel également au cours de l'embryogénèse. Chez *C. elegans*, l'élimination dans les cellules somatiques des granules-P, des composants ribonucléo-protéiques spécifiques de la lignée germinale, est essentielle à la différenciation des cellules germinales. (Zhang *et al.*, 2009) Par ailleurs, au cours du développement, la restriction nutritionnelle provoque le blocage au stade larvaire 1 (L1), permettant aux larves de survivre plusieurs jours. En revanche l'inhibition de l'autophagie diminue leur survie (Alberti *et al.*, 2010).

Par ailleurs, l'autophagie est essentielle à la croissance des fœtus de souris (Kojima *et al.*, 2015), et des embryons de poulet (Lu *et al.*, 2014). L'utilisation de mutants de gènes de l'autophagie a permis d'étudier ce processus chez plusieurs modèles animaux au cours du développement et de la longévité. Le **Tableau 6** regroupe les rôles physiologiques étudiés de certaines protéines clés de la machinerie autophagique.

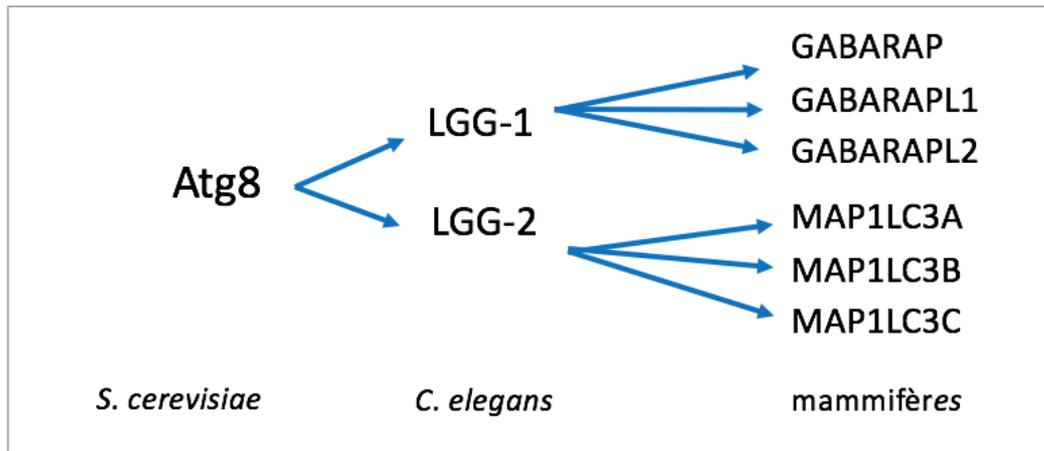


Figure 22 - Schématisation des différents homologues chez *S. Cerevisiae* ; *C. elegans* et chez l'Homme

C. elegans possède un représentant unique de la famille GABARAP : LGG-1 et un homologue unique de la famille LC3 : LGG-2

Espèces	Nombre de gènes	
	Famille GABARAP/GATE-16	Famille LC3
Mammifères - Homme	3	4
Cnidaires – <i>Nemastostella vectensis</i>	2	2
Nematode – <i>Caenorhbditis elegans</i>	1	1
Eponges – <i>Amphimedon queenslandica</i>	3	2
Insectes – <i>Apis mellifera</i>	1	1
Insectes – <i>Drosophila melanogaster</i>	2	0
Poisson – <i>Danio rerio</i>	4	4

Tableau 7 – Membre des familles GABARAP et LC3 chez les métazoaires.

Les homologues d'Atg8 peuvent être regroupés en deux familles chez les métazoaires. Ce tableau recense le nombre de gène homologue d'Atg8 en fonction de quelques espèces étudiées. (Adapté de Shpilka *et al.*, 2011).

II. La famille LC3/GABARAP

2.1 Les membres : nombre variant d'homologues en fonction des espèces

Les protéines Atg8, dont l'unique membre chez la levure donne le nom à cette famille, est un groupe de protéines très conservées chez les eucaryotes. Les gènes de la famille *atg8* ont été dupliqués et/ou perdus au cours de l'évolution provoquant l'expansion ou l'extinction de certaines sous-familles, générant une forte diversité entre les espèces (Shpilka *et al.*, 2011). A titre d'exemple, chez l'homme, sept homologues d'Atg8 sont répartis en deux sous familles ; la sous-famille MAP-LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3), plus généralement appelée LC3, regroupant les protéines LC3A (avec deux variants d'épissage LC3Aa et LC3Ab), LC3B, LC3C et la sous-famille GABARAP composée de GABARAP, GABARAPL1 (*gac1*) et GABARAPL2 (GATE-16), **Figure 22**.

Chez les métazoaires, une amplification du nombre de gènes est retrouvée, ils peuvent être regroupés dans les deux sous famille LC3 et GABARAP. Le tableau suivant donne des exemples du nombre d'homologues dans différentes espèces telles que les cnidaires, éponges et insectes, **Tableau 7**.

Chez les plantes le nombre d'orthologues est très hétérogène. Par exemple, le nombre de gènes varie de 9 chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, d'un seul chez l'algue, à 22 chez les angiospermes (Kellner *et al.*, 2017).

La diversité des protéines Atg8 chez les plantes et les différents métazoaires pourrait être expliquée par de nombreuses multiplications géniques qui permettraient de s'adapter à différents stress ou aux conditions défavorables pour lesquelles Atg8 joue un rôle crucial.

	Atg8	GABARAP	GABARAP L1	GABARAP L2	LC3A	LC3B	LC3C	LGG-1	LGG-2
Atg8	100	55	55	56	39	37	40	53	33
GABARAP	55	100	87	58	32	31	39	84	31
GABARAP L1	55	87	100	61	34	32	39	78	36
GABARAP L2	56	58	61	100	42	39	43	74	35
LC3A	39	32	34	42	100	83	59	35	60
LC3B	37	31	32	39	83	100	55	34	58
LC3C	40	39	39	43	59	55	100	39	47
LGG-1	?	84	78	74	35	34	39	100	32
LGG-2	?	31	36	35	60	58	47	32	100

Tableau 8 - Pourcentage d'identité de séquence entre les différents membres

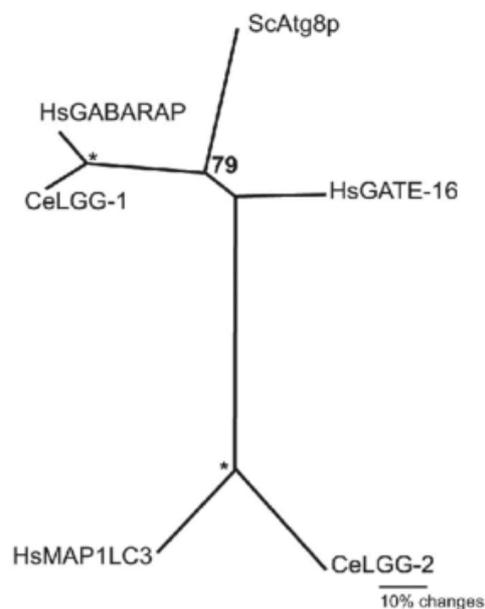


Figure 23 - Arbre phylogénétique des Atg8

Arbre réalisé par « Neighbor joining » en utilisant la séquence Atg8 protéine *Saccharomyces cerevisiae* (Sc) Atg8, les homologues humains (Hs) GABARAP, GATE-16 et MAP1LC-3 et les homologues de *C. elegans* (Ce) LGG-1 et LGG-2. Le nombre indique le pourcentage de prise en charge du bootstrap (l'étoile est de 100%). À noter, LGG-1 est étroitement liée à ScAtg8p et les protéines HsGABARAP tandis que LGG-2 est plus étroitement liée aux HsMAP1LC-3 (Alberti *et al.*, 2010).

2.2 L'alignement des séquences protéiques des membres Atg8 suggère des fonctions distinctes

Des similarités de séquences protéiques ont permis de différencier les sous-familles Atg8. L'alignement des séquences protéiques de plusieurs espèces différentes révèle une nette similitude au sein des sous-familles. Chez les mammifères, les plus grands pourcentages d'identité de séquence sont retrouvés pour la famille GABARAP, entre GABARAP et GABARAPL1 (87%). Par ailleurs les protéines LC3A et LC3B ont une identité de séquence de 83%. Les autres protéines partagent un pourcentage plus faible. De plus, les analyses d'identité de séquence indiquent que les protéines de la sous-famille GABARAP sont plus évolutivement proches d'Atg8 que celles de la LC3, **Tableau 8**. En outre, les similitudes de séquence complexifient l'étude individuelle de chaque membre de la famille. Chez les mammifères, les anticorps ne sont généralement pas spécifiques d'une protéine et peuvent reconnaître plusieurs membres.

Par ailleurs, il existe des différences entre les membres individuels d'une sous famille. Pour les GABARAP, la position 9 est toujours un résidu chargé négativement (Asp, Glu, Gln, Asn, Ser et Thr), pouvant jouer le rôle d'accepteur pour les liaisons hydrogènes alors que la position 47 est toujours un résidu électropositif donneur (Lys et Arg). En revanche, pour la famille LC3 le résidu 10 est électropositif (donneur) alors que le résidu en position 50 est électronégatif (accepteur). Ces résidus peuvent se rapprocher les uns des autres pour former des liaisons intramoléculaires de type liaisons hydrogènes ou des ponts salins pour permettre de stabiliser la structure Atg8/ LC3/ GABARAP et assurer l'orientation de la partie N-terminale. Ces résidus sont importants pour interagir avec les domaines LIR (voir page 57) et participent à la sélectivité des substrats d'Atg8, suggérant des fonctions différentes. (Wesch, Kirkin and Rogov, 2020). Ces données suggèrent une ségrégation fonctionnelle des deux familles.

Le nématode, *C. elegans*, possède un unique homologue de la famille GABARAP : LGG-1 et un unique homologue de la famille LC3 : LGG-2 fournissant une situation idéale pour comprendre le rôle de ces deux familles chez les mammifères, **Figure 23**.

Structurellement, Atg8/LC3/GABARAP possèdent quatre feuillets β autour de deux hélices α centrales.

La principale différence de structure entre Atg8/LC3/GABARAP et les autres Ubl est la présence de deux hélices α consécutives en partie N-terminale qui a été découverte pour la

première fois par l'analyse structurale de GATE-16/GABARAPL2 en 2000 (Paz, Elazar and Fass, 2000) . Ces deux hélices ont été retrouvées chez les autres membres LC3/GABARAP, permettant de supputer une fonctionnalité commune dans le processus autophagique. Cependant ces hélices sont différentes entre les deux sous familles, la première hélice alpha de LC3 est fortement basique alors que pour GABARAP et GATE-16 cette région est acide, (Sugawara *et al.*, 2004), suggérant encore une fois des différences de fonctions (Shpilka *et al.*, 2011).

Les protéines de type précurseurs LC3/GABARAP (LC3A, LC3B et GABARAP), c'est à dire les protéines non clivées, présentent une hélice alpha supplémentaire en partie C-terminale. Il semble que les formes clivées et lipidées de LC3A, LC3B et GABARAP ne possèdent pas cette hélice supplémentaire. Par ailleurs cette hélice α appelée $\alpha 5$ n'est pas retrouvée chez Atg8. L'ensemble de ces données suggère une fonction spécifique de la forme complète versus clivée. Par ailleurs il est important de mentionner que cette hélice supplémentaire est majoritairement retrouvée en complexe avec des interacteurs possédant des domaines LIR. Le rôle fonctionnel n'a pas été testé (Wesch, Kirkin and Rogov, 2020). **La figure 24** présente en partie basse la structure secondaire illustrant ce propos.

première fois par l'analyse structurale de GATE-16/GABARAPL2 en 2000 (Paz, Elazar and Fass, 2000) . Ces deux hélices ont été retrouvées chez les autres membres LC3/GABARAP, permettant de supputer une fonctionnalité commune dans le processus autophagique. Cependant ces hélices sont différentes entre les deux sous familles, la première hélice alpha de LC3 est fortement basique alors que pour GABARAP et GATE-16 cette région est acide, (Sugawara *et al.*, 2004), suggérant encore une fois des différences de fonctions (Shpilka *et al.*, 2011).

2.4 Conformation

Les protéines de la famille Atg8 peuvent se lier à de nombreux facteurs et adopter des conformations différentes. Des changements de conformation de structure suite à des interactions entre protéines ont été observés par Coyle et al en 2002. La protéine GABARAP peut engendrer des changements dans la partie N-terminale et avoir une conformation dite fermée, dans laquelle les hélices α se retrouvent proches du noyau ubiquitine, et une conformation dite ouverte, dans laquelle les 10 premiers acides aminés se retrouvent éloignés du noyau ubiquitine (Coyle *et al.*, 2002).

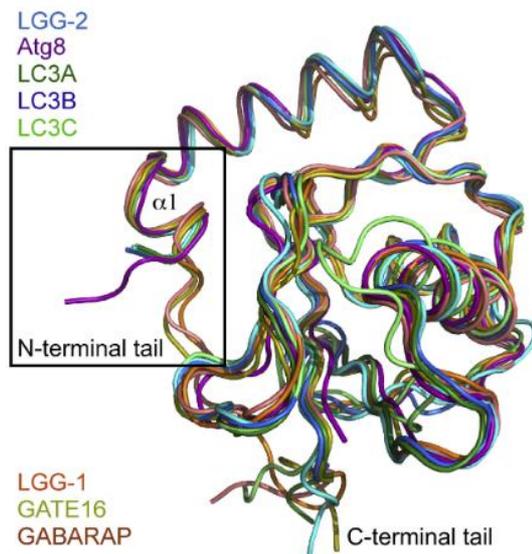


Figure 25 - La Partie N-terminale de LGG-1 et LGG-2 adopte une unique conformation ouverte ou fermée

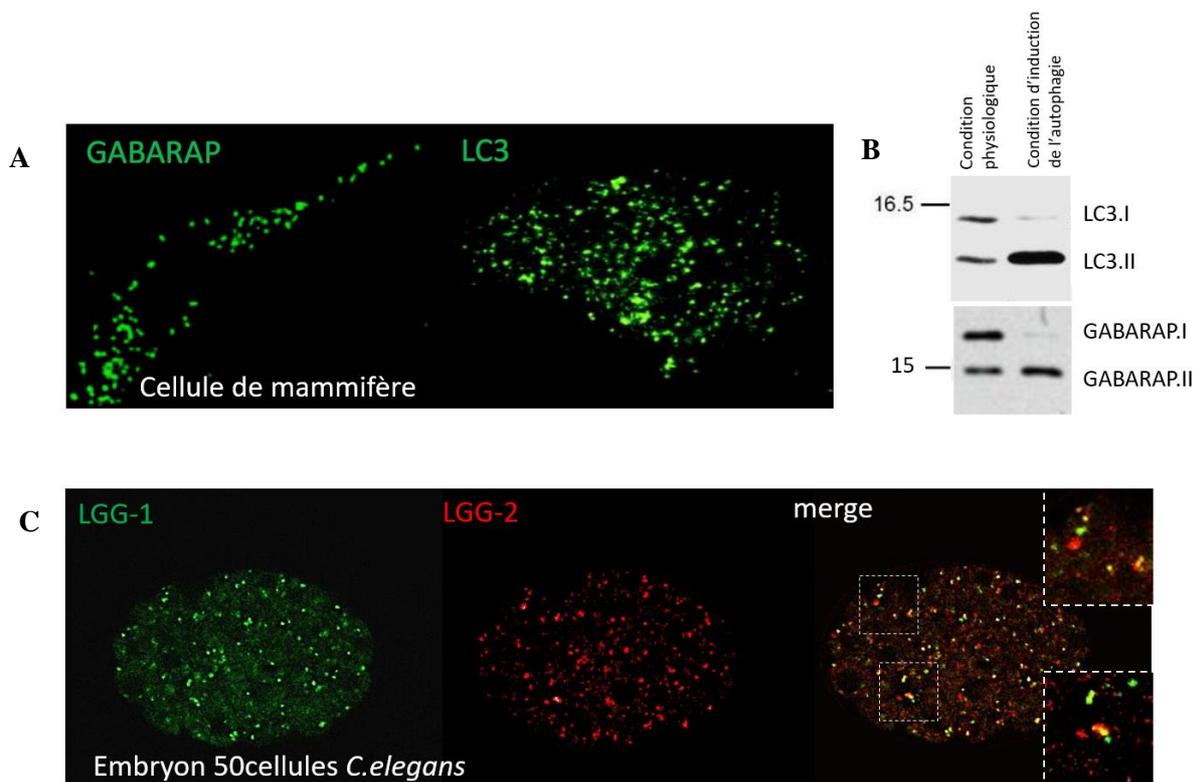


Figure 26 - GABARAP/LGG-1 et LC3/LGG-2, des marqueurs des autophagosomes

A-Localisation punctiforme de LC3 et GABARAP dans les cellules de mammifères par immunofluorescence (provenant de la thèse de C. Jenzer) B- Détection de LC3 et GABARAP par westernblot dans des conditions physiologiques et d'induction de l'autophagie (image protéinotech). C- Localisation *in vivo* des protéines GFP::LGG-1 et mCherry::LGG-2 dans un embryon 50C de *C. elegans*

Chez la levure, des tests *in vitro* ont permis de mettre en évidence un accès augmenté de l'interaction avec l'anticorps lorsque Atg8 était conjugué à des liposomes (Ichimura *et al.*, 2004). Ces expériences mettent en avant une grande flexibilité de la région N-terminale de ces protéines et suggèrent un rôle important de cette partie pour l'interaction avec d'autres acteurs (Shpilka *et al.*, 2011).

Chez *C. elegans* les structures de LGG-1 et LGG-2 ont été déterminées en 2015 par l'équipe de Zhang et présentent des différences de structures au niveau de la partie N-terminale. En effet, le premier acide aminé (Met1) de LGG-1 et le résidu en position 3 (Trp) forment des interactions hydrophobes avec l'alanine108. Cette particularité permet de créer une conformation N-terminale fermée (plus connue sous le nom de forme C pour « close »). Cette conformation est essentielle à la fonction autophagique. A contrario, la partie N-terminale de LGG-2 est dite ouverte (forme O « open »), la partie N-terminale est détachée du cœur ubiquitine, (Wu *et al.*, 2015) **Figure 25**.

Les différences de structures entre les membres de la famille Atg8 dans cette région suggèrent un rôle distinct et des spécificités d'interaction.

2.5 Les protéines de la famille Atg8 sont des marqueurs des autophagosomes

Les ATG8 sont identifiées comme marqueurs spécifiques des autophagosomes pour l'analyse du flux autophagique. Parmi les protéines Atg8, LC3B est la protéine la mieux décrite et a d'abord été identifiée en 1987 comme une protéine associée aux microtubules dans les cerveaux de rat. C'est seulement en 2004 que Tamotsu Yoshimori a caractérisé la localisation aux autophagosomes de cette protéine nouvellement identifiée comme l'homologue d'Atg8 (Kabeya *et al.*, 2004; Smith *et al.*, 2018). LC3B est utilisée comme marqueur des autophagosomes. Beaucoup d'études concluent sur le niveau basal d'autophagie par rapport au taux de protéine LC3.II. L'ancrage de ces protéines aux autophagosomes est visualisable par microscopie par un marquage punctiforme ou par Western blot de la forme lipidée, LC3.II migrant plus vite que la forme LC3.I, **Figure 26**. Il est difficile de trouver des rôles spécifiques de chaque membre LC3. En effet LCA, LC3B et LC3C partagent de forte similarités de séquence il est compliqué d'étudier leur fonction individuellement.

Cependant, une équipe a pu déterminer en 2015 des profils d'expression différents de ces protéines dans des cellules en culture. Par des expériences d'immunolocalisation, les chercheurs

ont pu montrer une localisation périnucléaire et nucléaire de LC3A, alors que LC3B est plus généralement distribuée dans le cytoplasme. LC3C est également retrouvée dans le cytoplasme et fortement dans le noyau où elle colocalise avec LC3A (Koukourakis *et al.*, 2015). Une étude récente a également pu montrer une localisation différentielle entre ces protéines à la suite de stress cellulaires, ainsi que des redondances de localisation, suggérant des similarités fonctionnelles (Baeken *et al.*, 2020).

Pour la deuxième sous famille, GABARAP a été initialement caractérisée comme une protéine associée au récepteur GABA (A) dans les neurones (Wang *et al.*, 1999; Chen and Olsen, 2007), assurent le transport de ce récepteur à la membrane plasmique (Leil *et al.*, 2004). Cette protéine cytosolique, présente au niveau des vésicules de transport, du RE et de l'appareil de Golgi, permet également le transport d'autres protéines de la membrane plasmique comme le récepteur à la transferrine (Green *et al.*, 2002; Engedal and Seglen, 2016). GABARAPL1 (ou GEC1 : glandular epithelial cell 1) a été identifié en 1993 comme un gène régulé par les œstrogène chez le cochon d'inde (Pellerin *et al.*, 1993). De nombreuses études ont pu mettre en évidence un rôle prépondérant de GABARAPL1 dans certains cancers tel que le cancer du sein, le cancer colorectal et certaines maladies neurodégénératives telles que la maladie de Parkinson (Le Grand *et al.*, 2011). GABARAPL2 est capable de réguler le transport entre les saccules de l'appareil de golgi par interaction avec les SNARES (Soluble NSF Attachment Protein Receptors) (Sagiv *et al.*, 2000). Les protéines de la famille Atg8 sont exprimées de manière ubiquitaire, mais présentent certaines spécificités tissulaires. En effet, LC3C est exprimée plus fortement dans les poumons alors que GABARAPL1 et GATE16 sont principalement dans le système nerveux et GABARAP dans les glandes endocrines (Lee and Lee, 2016). Les fonctions autophagiques de chacun des membres pris individuellement ne sont pas bien caractérisées. En effet, certaines études n'ont pas discriminé les différentes protéines des familles LC3 ou GABARAP.



Chez *C. elegans*, LGG-1 et LGG-2 définissent trois types de populations. Des autophagosomes uniquement positifs pour LGG-1, des autophagosomes uniquement positifs pour LGG-2 et des autophagosomes positifs pour les deux marqueurs (Manil-Ségalen *et al.*, 2014).

III. Rôles des LC3/GABARAP dans l'autophagie

En 1993, le laboratoire d'Y. Ohsumi publie les résultats du premier crible génétique, identifiant une centaine de mutants de l'autophagie, basé sur l'absence d'accumulation d'autophagosomes en conditions de starvation (Tsukada and Ohsumi, 1993). Récompensé par un prix Nobel en 2016, ses études chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* ont conduit à la découverte de gènes essentiels à l'autophagie appelés *ATG* (autophagy related genes). Ces protéines sont regroupées en six groupes fonctionnels qui comprennent : le système de conjugaison Atg8 et Atg12, le complexe phosphatidylinositol 3 phosphate (PI3K), le complexe Atg2-Atg18, la protéine transmembranaire Atg9 et le complexe Atg1 kinase. (Noda and Fujioka, 2015). Les protéines Atg8 sont impliquées à plusieurs étapes du processus autophagique, dès l'initiation par l'activation de protéines inductrices puis par l'élongation des membranes, la fermeture des autophagosomes, la fusion avec le compartiment lysosomal et également le transport sur les microtubules, **Figure 27**. Dans ce paragraphe, après des généralités sur les mécanismes d'actions des différents groupes fonctionnels, j'ai choisi de me focaliser sur l'implication des protéines Atg8 au cours des différentes étapes du processus de macroautophagie et de décrire, lorsque cela était possible, les spécificités des membres de chaque famille.

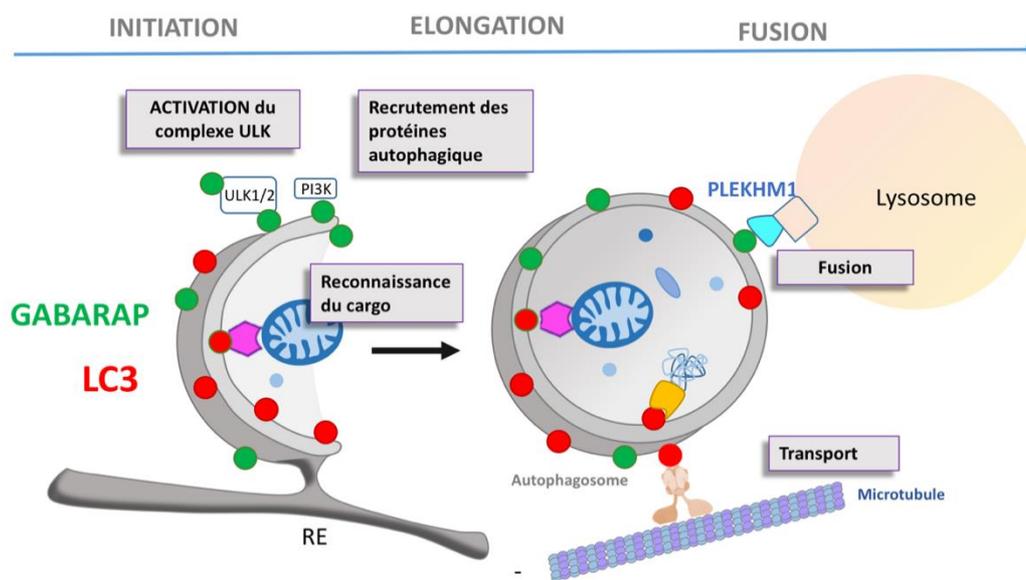


Figure 27 - Schéma représentant les fonctions principales des protéines de type Atg8 au cours du processus autophagique

Les protéines sont ancrées à la fois sur la partie interne et externe des autophagosomes. Ces protéines peuvent interagir avec des acteurs multiples via notamment le domaine LIR. L'interaction dépendante des LIR est importante pour A) l'activation des protéines initiatrices du complexe ULK par GABARAP. B) pour recruter les protéines de la machinerie autophagique. C) permettre de reconnaître le cargo et l'englober. D) Le transport des autophagosomes le long des microtubules via LC3. E). La fusion des membranes en recrutant des protéines essentielles telle que PLEKHM1.

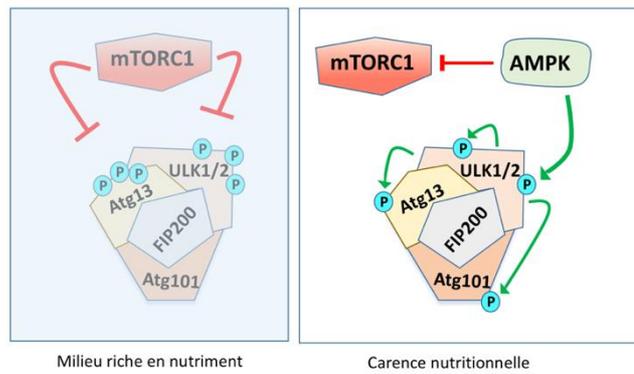


Figure 28 - Complexe Ulk1 d'initiation

Chez les mammifères, deux orthologues de la levure Atg1, appelés Ulk1 et Ulk2, sont impliqués dans l'induction à l'autophagie induite par la carence nutritionnelle. Ulk1 et Ulk2 se trouvent dans un complexe stable avec Atg13, FIP200 et Atg101, et Atg13. Dans des conditions riches en nutriments, mTORC1 phosphoryle Ulk1 / 2 et Atg13, inhibant ainsi le complexe kinase. En réponse à un stress, les sites de phosphorylation dépendant de mTORC1 dans Ulk1 / 2 sont rapidement déphosphorylés, et Ulk1 / 2 s'autophosphoryle et phosphoryle Atg13 et FIP200. En plus, Ulk1 / 2 est phosphorylé par AMPK et ainsi activé. AMPK conduit indirectement à l'induction de l'autophagie en inhibant mTORC1. (Adaptée de Alers *et al.*, 2012).

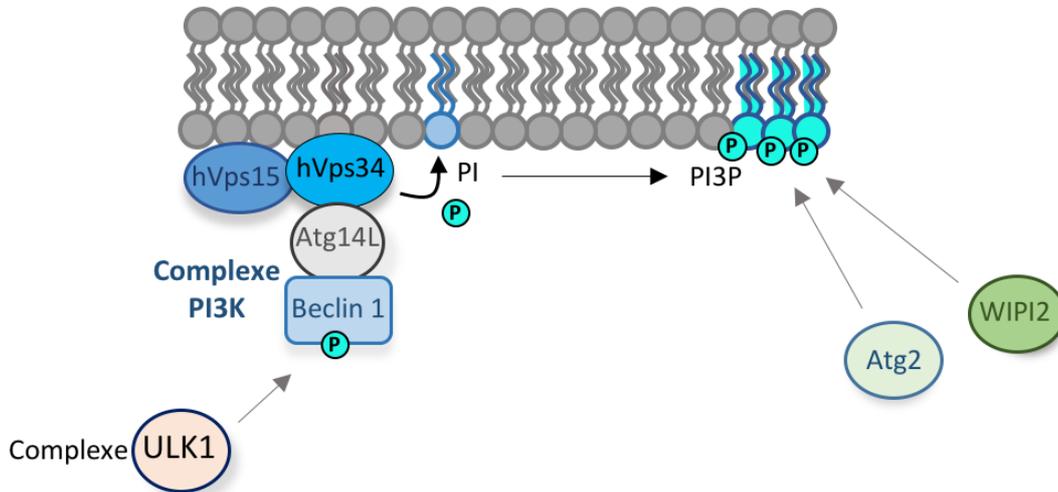


Figure 29 - Complexe PI3K

La kinase ULK phosphoryle Beclin-1, permettant l'activation du complexe PI3K. Vps34 permet la phosphorylation de PI. Les zones de PI3P servent de plateforme de recrutement d'autres protéines autophagiques telles que WIPI2 et Atg2. (Adaptée de la thèse de Céline Jenzer et Geng and Klionsky, 2008).

3.1 Initiation, et nucléation

3.1.1 Le complexe d'induction Atg1/ULK et régulation par le complexe TORC

La protéine de levure Atg1 est l'homologue d'ULK1 et ULK2 des mammifères (Unc-51 like kinase). J'ai choisi ici de présenter le modèle moléculaire chez les mammifères, car contrairement à la levure, la composition de ce complexe ne change pas avec le statut nutritionnel. Les mécanismes moléculaires précis d'induction de l'autophagie sont peu connus. Le modèle communément accepté est que mTORC1 (cible mécanistique du complexe rapamycine kinase 2) régule l'initiation de l'autophagie via Atg1/ULK1, une sérine/thréonine protéine kinase. Chez les mammifères, le complexe ULK est composé de ULK1, ATG13, RB1CC1/FIP200 et ATG101 (Jung *et al.*, 2009; Mercer, Kaliappan and Dennis, 2009). Dans des conditions riches en nutriments, mTORC1 phosphoryle ULK1 pour inhiber son activité, or dans des conditions restrictives l'activité de mTORC est bloquée par AMPK, permettant l'activation du complexe ULK1, **Figure 28**. Par la suite, AMPK et ULK1 phosphorylent Raptor pour inhiber l'activité de mTORC1 (Gwinn *et al.*, 2008). Au moment de l'initiation, les protéines du complexe ULK sont capables d'interagir avec les protéines ATG8, avec une préférence pour la famille GABARAP (voir 3.1.3).

3.1.2 le complexe de nucléation phosphatidylinositol 3-kinase de classe III (PI3K)

Le complexe phosphatidylinositol 3- kinase de classe III (PtdIN3K), composé de Beclin 1 (homologue d'Atg6 chez la levure), ATG14L, Vps34 et Vps15, (Yang and Klionsky, 2010), interagit avec le complexe initiateur ULK1, présent au niveau de l'oméosome et du phagophore (Hara *et al.*, 2008). Le complexe PtdIns3K permet notamment la conversion du phosphatidylinositol en phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns3P). En effet, le phosphatidylinositol (PI) est phosphorylé sur le groupe hydroxyle en position 3. Des expériences d'imagerie en direct ont pu mettre en évidence que les zones riches en Pi(3)P au niveau de l'oméosome, sont importantes pour le recrutement d'autres protéines telles que ZFYVE1/DFCP1, WIPI2 (homologue d'Atg18 chez la levure) et Atg2, pour permettre la formation du phagophore. (Axe *et al.*, 2008; Polson *et al.*, 2010), **Figure 29**.

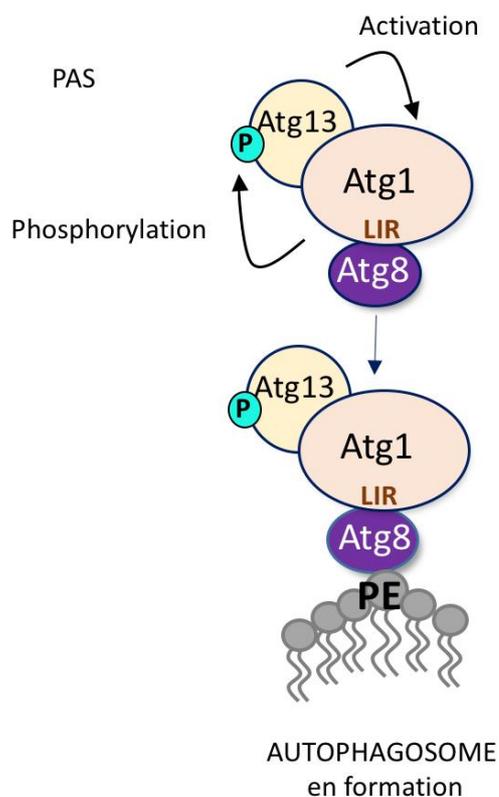


Figure 30 - Régulation du complexe Atg1 par Atg8

Modèle de coopération entre Atg13 et Atg8 pour la régulation du complexe Atg1. Atg13 se lie de manière constitutive à Atg1. En condition de restriction nutritionnelle, Atg1 est activée par autophosphorylation et phosphoryle Atg13. Atg13 actif, augmente l'activité Kinase d'Atg1. Le motif AIM/LIR d'Atg1 permet sa liaison avec Atg1. Atg8 permet la localisation d'Atg8 à la membrane des autophagosomes naissants. Ce changement de localisation d'Atg1, du PAS à la membrane des autophagosomes est dépendante d'Atg8. Après fusion entre la vacuole et l'autophagosome, Atg1-Atg13 est ensuite dégradé dans la vacuole. (Adaptée de Kraft *et al.*, 2012).

Les protéines WIPI localisent au niveau de l'omégasome et favorisent la conjugaison des protéines Atg8 par recrutement du système de conjugaison via ATG16L1 (Dooley et al., 2014). En générant des PI3P, le complexe PI3K permet l'élongation du phagophore et le recrutement des protéines autophagiques et des vésicules Atg9 positives.

3.1.3 Rôle des Atg8 dans l'induction de l'autophagie

Les interactions ULK1/Atg8 sont importantes pour induire l'autophagie et permettent le recrutement de la machinerie autophagique aux cargos. Ces interactions avec la famille Atg8 sont possibles grâce au domaine LIR/AIM. Par des tests d'interactions protéiques, l'équipe d'Ohsumi a mis en évidence un lien direct entre Atg8 et Atg1 chez la levure et a pu déterminer où était situé le motif AIM d'Atg1. Cette interaction est importante pour l'autophagie puisque la mutation du domaine AIM diminue partiellement mais de manière significative le flux autophagique visualisable par le dosage de la phosphatase alcaline mature dans la vacuole (Noda *et al.*, 1995; Nakatogawa, Ohbayashi, *et al.*, 2012). De plus, la même année, une étude a permis d'établir un rôle d'Atg8 dans la régulation du complexe Atg13-Atg1 *in vivo*. Cette régulation dépendante du domaine LIR est également importante pour la voie Cvt. Par une analyse biochimique, cette étude a montré que l'association d'Atg1 à la membrane dépendait de son motif LIR, suggérant un rôle d'Atg8 dans la localisation d'Atg1 aux autophagosomes, **Figure 30.**

Chez les mammifères, cette interaction est conservée : GABARAP et LC3 interagissent via leur domaine LIR avec ULK1, ATG13 et FIP200. Ces interactions sont retrouvées préférentiellement avec les membres de la famille GABARAP (Behrends *et al.*, 2010; Alemu *et al.*, 2012; Kraft *et al.*, 2012). Joachim et al en 2015 mettent en évidence que le domaine LIR d'ULK est essentiel pour phosphoryler Atg13 (Joachim *et al.*, 2015). Ces données soutiennent par ailleurs que le motif LIR est requis pour la localisation de ULK1 au niveau des membranes

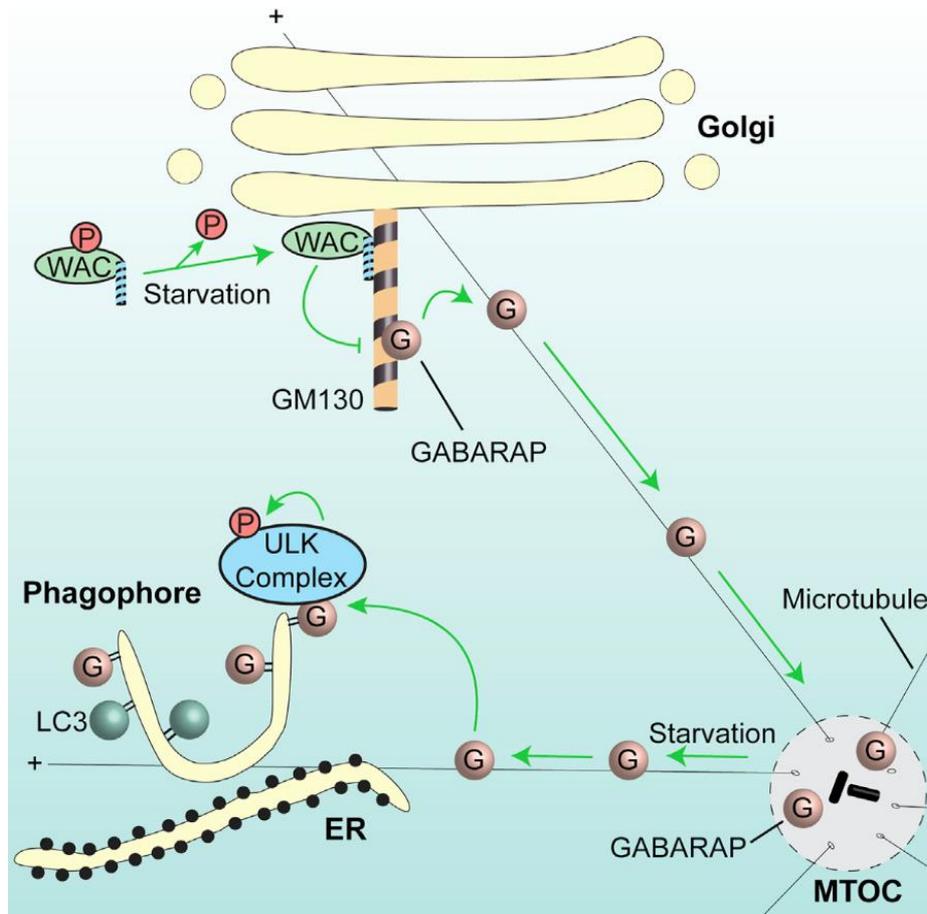


Figure 31 - Activation de la kinase ULK par GABARAP qui circule à partir du centrosome régulé par WAC et GM130

WAC et GM130 sont deux protéines localisées au niveau de l'appareil de Golgi permettant de réguler l'autophagie. WAC inhibe la liaison de la protéine GABARAP à la golgine GM130, ce qui permet la délocalisation d'un pool de GABARAP de l'appareil de golgi au niveau de la région péri centriolaire permettant l'induction de l'autophagie. (Joachim et al 2015)

positives pour DFCP1 (*double FYVE-containing protein 1*) et démontrent l'importance des protéines Atg8 pour la localisation d'ULK1. Une étude chez les mammifères a mis en évidence un rôle de GABARAPL1 dans l'induction de l'autophagie. En effet, la surexpression des protéines GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A (protéine non ancrée aux autophagosomes) en condition d'induction de l'autophagie (EBSS : Earles balanced salts solution) conduit à une diminution de la phosphorylation de MTOR et à la perte totale de phosphorylation de P70S6K (p70S6 kinase, cible de mTOR). Par ailleurs la surexpression de GABARAPL1 et GABARAPL1 G116A provoque la diminution de la phosphorylation d'ULK1 (Ser757). Ces données suggèrent que GABARAPL1 a un rôle inhibiteur sur l'activité de MTOR et sur la phosphorylation de ULK1 au niveau de la serine 757, indépendamment de sa conjugaison aux autophagosomes. Par ailleurs, la phosphorylation de la serine555 de ULK1, connue pour être présente au cours de l'induction de l'autophagie, est retrouvée augmentée dans des conditions de surexpression de GABARAPL1 et GABARAP G116A. L'ensemble de ces données met en évidence un rôle régulateur de GABARAPL1 dans l'induction de l'autophagie (Poillet-Perez *et al.*, 2017). De plus, une étude récente montre que la localisation subcellulaire de GABARAP est importante pour l'induction de l'autophagie. La circulation de GABARAP est contrôlée par deux protéines golgiennes : WAC (WW domain – containing adaptator coiled coil), requis pour l'autophagie induite par carence nutritionnelle, et GM130, protéine présente au niveau du cis-Golgi, importante pour le trafic vésiculaire entre les citernes du Golgi (GOLGA2). Cette étude publiée par l'équipe de Sharon Tooze démontre un rôle inattendu des golgines dans la régulation de l'autophagie. La séquestration de GABARAP par GM130 au niveau de l'appareil de golgi bloque l'induction de l'autophagie. WAC supprime la liaison entre GM130 et GABARAP en contexte de carence nutritionnelle et permet à GABARAP non lipidée et GABARAP conjuguée (mais pas LC3B et GATE-16) de favoriser spécifiquement l'activation de la kinase ULK pour induire l'autophagie (Joachim *et al.*, 2015), **Figure 31**. Il est intéressant de mentionner ici que ces données récentes mettent en évidence un rôle des protéines GABARAP indépendant de sa conjugaison à la PE.

3.1.4 Rôle opposé des protéines LC3 et GABARAP dans l'induction de ULK1

Une équipe américaine a récemment démontré que l'interaction ULK1-ATG8 est importante pour l'activation du complexe ULK1 et l'induction de l'autophagie suite à un stress dans les cellules de mammifères. De plus, par des techniques de modification du génome, ils ont pu mettre en évidence des fonctions opposées des GABARAP et LC3 sur l'activité de ULK. Les protéines GABARAP (GABARAPL1, GABARAPL2 et GABARAP) sont des régulateurs positifs de ULK1. En effet les cellules déficientes pour les gènes *gabarap* présentent une suppression presque complète de la phosphorylation d'ATG14 et de BECN1, les effecteurs de ULK1. A contrario, la suppression des gènes *lc3* (LC3A, LC3B, LC3C) montre une augmentation robuste de la phosphorylation d'ATG14 et BECN1, suggérant une régulation négative de l'activité de ULK1. La manière dont l'interaction des ATG8 avec ULK régule le complexe d'initiation n'est pas comprise. La déplétion des gènes GABARAP réduit l'activité de ULK1 mais provoque une augmentation du nombre de structure pré-autophagosomales positives pour WIPI par rapport au contrôle. La plupart de ces structures sont positives pour ATG16L1, suggérant que ce ne sont pas des autophagosomes matures. Les protéines GABARAP semblent importantes pour la progression de ces structures en vésicules capables de fusionner. Il est suggéré comme modèle que les cellules sans les protéines GABARAP ont une activité de ULK réduite et génèrent des structures autophagiques précoces en faible quantité, mais que ces structures s'accumulent car elles ne sont pas capables de fusionner et de se dégrader (Grunwald *et al.*, 2020). Ces hypothèses sont notamment cohérentes avec un article publié en 2020 mentionnant un rôle plus tardif d'Atg1 chez la levure, comme régulateur de la fusion des autophagosomes avec la vacuole par les protéines SNARE (Barz *et al.*, 2020).

Chez le nématode *C. elegans*, *unc-51* code pour une sérine/thréonine kinase : UNC-51 similaire à la protéine Atg1 de levure (Ogura *et al.*, 1994), régulateur clé de la formation des autophagosomes (Klionsky). Chez *C. elegans*, UNC-51 régule la croissance axonale et la taille des animaux. De plus, le processus autophagique est défectueux en contexte mutant *unc-51*, les vésicules autophagiques sont ouvertes et anormales et sont présente presque exclusivement dans les cellules hypodermiques latérales (Melendez *et al.*, 2003). Par ailleurs, de nombreuses études sur des organismes, dont *C. elegans*, ont indiqué que TORC1 inhibe l'autophagie (Tóth *et al.*, 2007; Hansen *et al.*, 2008; Meléndez and Levine, 2009).

3.2 Elongation et fermeture

Les origines des membranes permettant la formation et la croissance des autophagosomes posent des questions dont les réponses sont controversées depuis une cinquantaine d'année.

Les mécanismes de nucléation membranaire à savoir, si la membrane autophagique est formée *de novo* ou est dérivée d'un organite, ne sont pas complètement compris. Néanmoins ces composants membranaires peuvent dériver du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi (Abada and Elazar, 2014), des endosomes, de la membrane plasmique, des goutelles lipidiques, ou des sites de contact entre réticulum et mitochondrie (Schaaf *et al.*, 2016). Chez la levure, la carence en nitrogène provoque l'induction de l'autophagie à partir d'une simple structure pré-autophagosomale (PAS) proche de la vacuole (Suzuki *et al.*, 2001, 2014).

Christian de Duve et Robert Wattiau s'interrogeaient dès 1966 sur la provenance des membranes autophagosomales et proposaient une origine à partir de la membrane plasmique (De Duve and Wattiaux, 1966). Aujourd'hui, il est communément accepté que le RE est le principal fournisseur des bicouches lipidiques formatrices des autophagosomes, même si d'autres origines membranaires ont été retrouvées.

A contrario, les sites de formation des autophagosomes chez les mammifères peuvent se former simultanément au niveau de plusieurs sites enrichis. Ces sites se forment généralement au niveau du RE et plus particulièrement au niveau des sites de contact entre le RE et les mitochondries (Itakura and Mizushima, 2010; Hamasaki *et al.*, 2013; Uemura *et al.*, 2014). Des études de microscopie par tomographie suggèrent une continuité entre le phagophore et le RE. En effet, la croissance du phagophore pourrait être permise par apport continu et de manière presque illimitée, de lipides via un organite. De plus, le RE est connecté à des compartiments membranaires, ce qui facilite les échanges de lipides, d'ions ou encore le transport des protéines transmembranaires (Molino *et al.*, 2017; Wei *et al.*, 2018). Des domaines d'extrusions positifs pour LC3 au niveau des mitochondries ont été observés par des techniques de microscopie à fluorescence à super résolution (Hailey *et al.*, 2010).

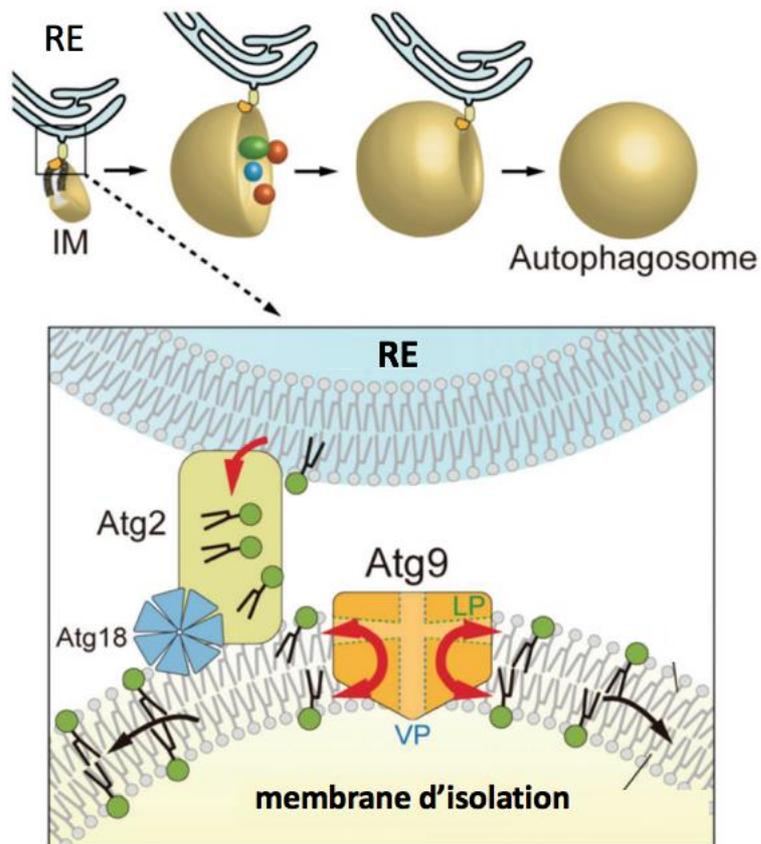


Figure 32 - Modèle du transfert lipidique médié par Atg2 et Atg9 pour l'expansion du phagophore.

Au cours de la formation de l'autophagosome, le complexe Atg2 – Atg18 et Atg9 se localise au niveau de la membrane d'isolation en contact avec le RE. Atg2 transfère les phospholipides du RE vers le feuillet cytoplasmique de la membrane d'isolement, qui sont ensuite distribués au feuillet luminal par l'activité scramblase d'Atg9, permettant l'expansion des membranes d'isolation. (Adaptée de Matoba and Noda, 2020).

3.2.1. Atg2 et Atg9 permettent le transfert des lipides

De manière énigmatique, la protéine Atg9 est requise pour l'expansion du phagophore et le recrutement de protéines autophagiques. Cette protéine transmembranaire est située sur des petites vésicules proches du site de formation des autophagosomes, qui serviraient d'apports membranaires pour la formation du phagophore (Mari and Reggiori, 2010; Yamamoto *et al.*, 2012). En condition de starvation, Atg9 est phosphorylée par Atg1, facilitant le recrutement de protéines Atg telles que Atg18 et Atg8 chez la levure (Papinski and Kraft, 2014). Une étude récente a permis de mettre en évidence un rôle de transfert de lipides de cette protéine (dite de « scrambling »), permettant le passage des lipides du feuillet externe vers le feuillet interne des liposomes *in vitro* (Matoba *et al.*, 2020). Une étude récente publiée dans Science suggère également que les vésicules Atg9 établissant un contact membranaire pour initier le transfert de lipides d'un compartiment donneur à un compartiment receveur. Les auteurs proposent que la formation *de novo* des autophagosomes nécessite les vésicules Atg9, qui forment une plateforme pour le recrutement d'autres protéines Atg, comme Atg2 (Sawa-Makarska *et al.*, 2020). Atg2 localise au niveau des sites de contact et peut transférer directement les phospholipides du RE vers la membrane d'isolement, **Figure 32**. Le mécanisme moléculaire exact par lequel les phospholipides sont dirigés de manière unidirectionnelle du RE vers la membrane d'isolement par Atg2 n'est pas connu. La protéine ATG2 interagit avec GABARAP et GABARAPL1 via son domaine LIR et cette interaction est importante pour la formation du phagophore (Behrends *et al.*, 2010; Bozic *et al.*, 2020).

Chez *C. elegans* le gène *epg-6* code une protéine ayant une activité PrdIns3P et interagit avec la protéine Atg-2 (voir partie 3.2.1 pour le rôle d'Atg2). EPG-6 et ATG-2 régule la progression de l'omégasome à l'autophagosome. En effet, les mutants *epg-6* et *atg-2* présentent l'accumulation de structure pré-autophagosomale (Lu *et al.*, 2011).

3.2.2 Rôles des protéines Atg8 pour les étapes d'élongation et fermeture

Des premières expériences réalisées chez la levure ont mis en évidence que la formation des autophagosomes est altérée en contexte de perte de fonction totale *atg8* (Kirisako *et al.*, 1999). De plus l'inhibition partielle d'ATG8 est à l'origine d'autophagosomes de petites tailles, soulignant un rôle dans l'élongation du phagophore (Xie, Nair and Klionsky, 2008).

La conjugaison des protéines Atg8 est importante pour l'élongation du phagophore. Le système moléculaire de lipidation est détaillée PARTIE 1. Une étude a montré qu'un mutant *Atg4BC74A* ou *Atg-5* dans des cellules de mammifère en culture provoque l'inhibition de la lipidation des protéines de la famille Atg8 aux autophagosomes et engendre une accumulation de structures pré-autophagosomales. Par ailleurs, il est mentionné dans les données supplémentaires que le recrutement des protéines ULK au niveau de ces structures pré-autophagosomales n'est pas altéré dans ces mutants. L'ensemble de ces résultats suggère un blocage des étapes d'élongation et de fermeture des autophagosomes (Fujita *et al.*, 2008, p. 3). Une autre étude a démontré l'importance du système de conjugaison des Atg8 à la membrane des autophagosomes en utilisant des souris déficientes pour Atg3 (enzyme E2 du système de conjugaison). Les analyses de microscopie électronique ont révélé la présence de structures autophagosomales plus petites et non fermées suggérant une importance du système de conjugaison dans ces étapes (Sou *et al.*, 2008).

Ce rôle des Atg8 dans l'élongation et la fermeture des autophagosomes pourrait être expliqué par le groupe d'Oshumi en 2007. En utilisant un système *in vitro*, l'équipe montre qu'Atg8 médie le rapprochement et la fusion de monocouches proximales (hémifusion) via la partie hélicale N-terminale (Nakatogawa, Ichimura and Ohsumi, 2007). Ces résultats sont confirmés chez les mammifères par l'équipe d'Elazar qui a déterminé que les 10 acides aminés de l'extrémité N-terminale de LC3 et GATE-16 sont suffisants pour favoriser la fusion et le rapprochement des membranes (Weidberg *et al.*, 2010). L'ensemble de ces résultats suggère que la partie N-terminale des Atg8 est essentielle à l'élongation du phagophore.

Dans les cellules eucaryotes, des fonctions différentes sont attribuées à la sous famille LC3 et GABARAP dans la biogénèse des autophagosomes. Une équipe australienne a ainsi utilisé l'ingénierie CRISPR-Cas9 pour générer des cellules eucaryotes délétères, soit pour la sous famille LC3 (LC3 TKO), soit pour la famille GABARAP (GABARAP TKO), soit pour les deux (hexa KO). De manière surprenante les cellules déficientes pour tous les Atg8 n'empêchent pas la formation des autophagosomes. Ces vésicules autophagiques sont néanmoins plus petites, suggérant un problème dans l'élongation. Ils ont également analysé le flux autophagique par observation de la dégradation de p62. Les cellules LC3 TKO dégradent p62 de la même manière que les cellules sauvages alors que les cellules GABARAP TKO

présentent un défaut de dégradation et les hexa KO un arrêt complet du flux autophagique. Par ailleurs les mêmes résultats ont été retrouvés au cours de la mitophagie (induite par oligomycine et antimycine A). Ces données mettent en évidence un rôle important des GABARAP dans la dégradation des mitochondries dépendantes de PINK/PARKIN, contrairement à la famille LC3. (Nguyen *et al.*, 2016). Par ailleurs les LC3/GABARAP ne sont pas indispensables à la biogénèse des autophagosomes, à la reconnaissance de cargo (dans ce contexte mitochondries) et à la fermeture des autophagosomes, mais sont essentielles à la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (Nguyen, Padman and Lazarou, 2016). Ces données suggèrent un changement de la vision canonique des fonctions des protéines Atg8 dans la formation des autophagosomes.

3.2.3 La délipidation des membres Atg8

Plusieurs études mettent en avant l'importance de la délipidation des protéines Atg8 dans les étapes de biogénèse des autophagosomes. Atg4 est une protéase importante à la fois pour le clivage du précurseur Atg8 et également pour le décrochage d'Atg8 des membranes. Chez la levure, l'équipe du professeur Ohsumi a pu montrer en réexprimant une forme Atg8(G116) (G116 en partie C-terminale exposée) dans un mutant null *atg4* que la formation des autophagosomes est significativement retardée dans ces cellules déficiente pour la délipidation d'Atg8. Ils ont pu mettre en évidence que Atg8-PE s'accumule sur les membranes d'organites variés comme les endosomes et le reticulum endoplasmique. Il est suggéré que cette accumulation aux membranes autres qu'autophagosomales diminue sa localisation au niveau du PAS et que la délipidation par Atg4 favorise la formation d'autophagosomes (Nakatogawa, Ishii, *et al.*, 2012). Par ailleurs, une étude récente a montré chez *Saccharomyces Cerevisiae* que la délipidation d'Atg8 de la PE est importante pour l'expansion de la membrane autophagosomale (Hirata, Ohya and Suzuki, 2017). De manière intéressante une étude publiée en 2017 a pu mettre en avant un rôle d'Atg1 dans la phosphorylation de la sérine 307 d'Atg4, permettant d'inhiber les fonctions d'Atg4 au niveau des sites de formation, suggérant que Atg1 contrôle la délipidation d'Atg8-PE en phosphorylant Atg4, (Sánchez-Wandelmer *et al.*, 2017). Chez les mammifères, la surexpression d'Atg4B empêche la formation de LC3-PE car cela provoque une délipidation plus rapide que la réaction de conjugaison, provoquant un retard de fermeture des membranes visualisables et quantifiables en microscopie électronique par des membranes non fermées (Fujita *et al.*, 2008).

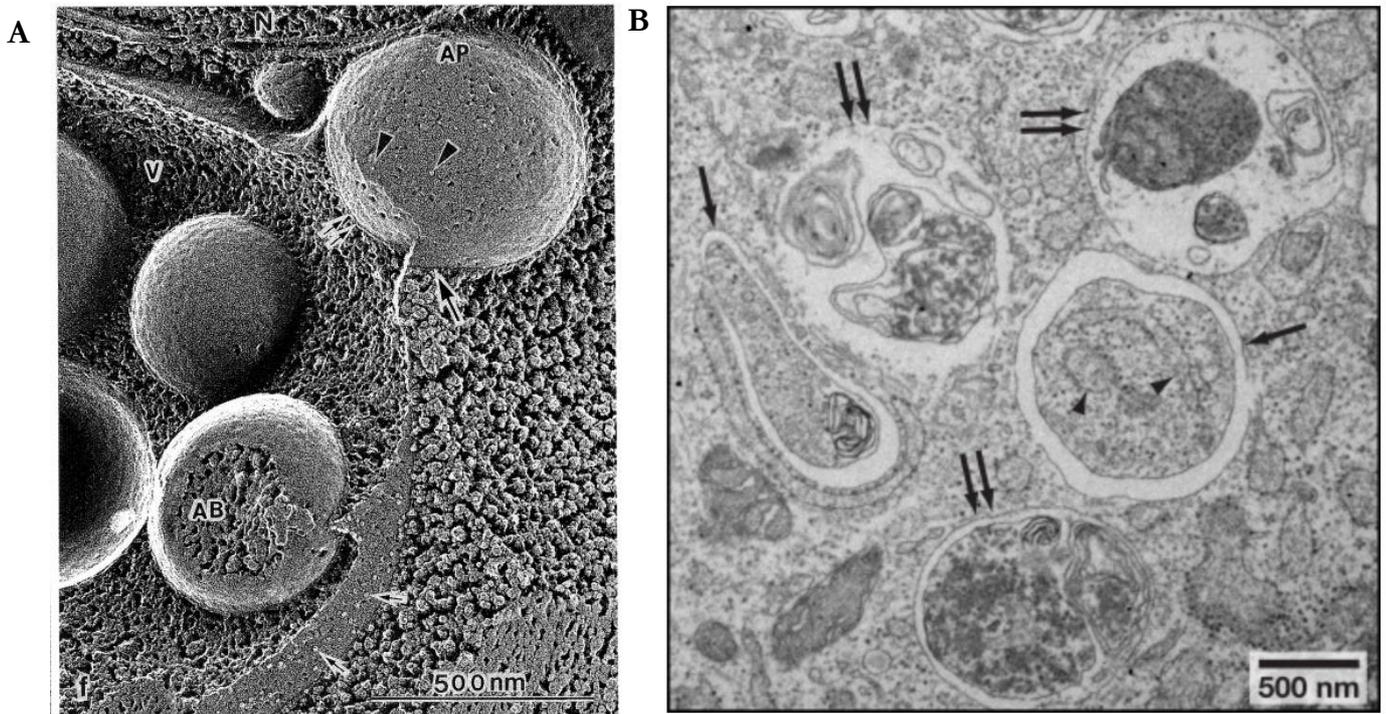


Figure 33 - Vesicules qui fusionnent avec les compartiments lytiques

A- Illustration du processus de macro-autophagie. L'autophagosome (AP) fusionne avec la membrane de la vacuole (V). (Baba, Osumi and Ohsumi, 1995)

B- Images de microscopie électronique de fibroblastes embryonnaires de souris en carence nutritionnelle. Les flèches indiquent les autophagosomes et les doubles flèches indiquent les autolysosomes/amphisomes. Les pointes de flèche indiquent des fragments de réticulum endoplasmique à l'intérieur de l'autophagosome. (Provient de Chieko Kishi.)

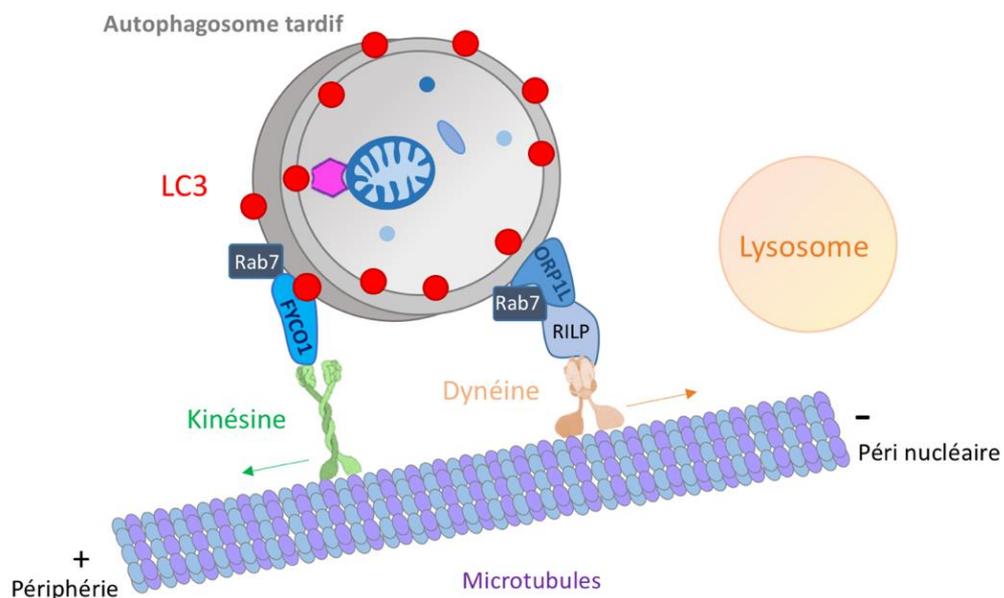


Figure 34 - Transport bidirectionnel des autophagosomes sur les microtubules

Rab7 relie les autophagosomes à la kinésine par le biais de FYCO1 et facilite le transport des autophagosomes sur les microtubules vers la périphérie cellulaire. Rab7 intervient également dans le transport dirigé vers l'extrémité négative vers la région périnucléaire par interaction avec ses effecteurs, ORP1L et RILP, qui se lie à la dynéine (Adaptée de Kuchitsu and Fukuda, 2018).

L'ensemble de ces résultats suggère que la délipidation des Atg8 aux membranes est une étape importante permettant la biogénèse efficace des autophagosomes.

Chez *C. elegans* il existe deux protéines homologues des 4 protéines chez l'homme, ATG-4.1 et ATG-4.2 ayant des fonctions redondantes et spécifiques. Par ailleurs, l'efficacité catalytique de ATG4-1 sur LGG-1 est plus forte que ATG4-2 (F. Wu *et al.*, 2012). ATG4.2 est requis majoritairement pour les étapes de délipidation, étape essentielle pour la formation des autolysosomes et la dégradation des protéines synaptiques (Hill *et al.*, 2019).

3.3 Fusion entre les autophagosomes et les lysosomes

Si un grand nombre de protéines Atg sont impliquées dans des étapes de biogénèse des autophagosomes, peu de données mettent en évidence un rôle spécifique de ces protéines dans des étapes de fusion. Les protéines LC3/GABARAP participent à cet événement de résolution des autophagosomes à des niveaux différents.

Après leur formation, les autophagosomes peuvent fusionner directement avec les lysosomes (mammifère), **Figure 33**, ou la vacuole (levure), formant les autolysosomes, mais ils peuvent également fusionner avec des vésicules endosomales générant des amphisomes (Tooze *et al.*, 1990; Mullock *et al.*, 1998; Fader and Colombo, 2009).

La fusion des amphisomes ou des autophagosomes avec un compartiment lysosomal provoque la dégradation des cargos cytoplasmiques par des hydrolases. La dynamique temporelle de fusion est importante, seuls les autophagosomes fermés peuvent fusionner avec les lysosomes. Plusieurs familles de protéines sont importantes pour cette étape : Les GTPase Rab, le complexe HOPS (homotypic fusion and protein sorting) impliqué dans le recrutement des SNARE.

3.3.1 Les GTPase Rab

Les protéines Rab sont des GTPases régulées par leur liaison au GTP (actif) ou au GDP (inactif). Une dizaine d'entre elles sont impliquées au cours du processus autophagique, à différentes étapes. J'ai choisi de me focaliser sur Rab7 qui a un rôle prédominant dans l'autophagie. Rab 7 est d'abord connue pour son rôle au cours du processus de maturation endosomale.

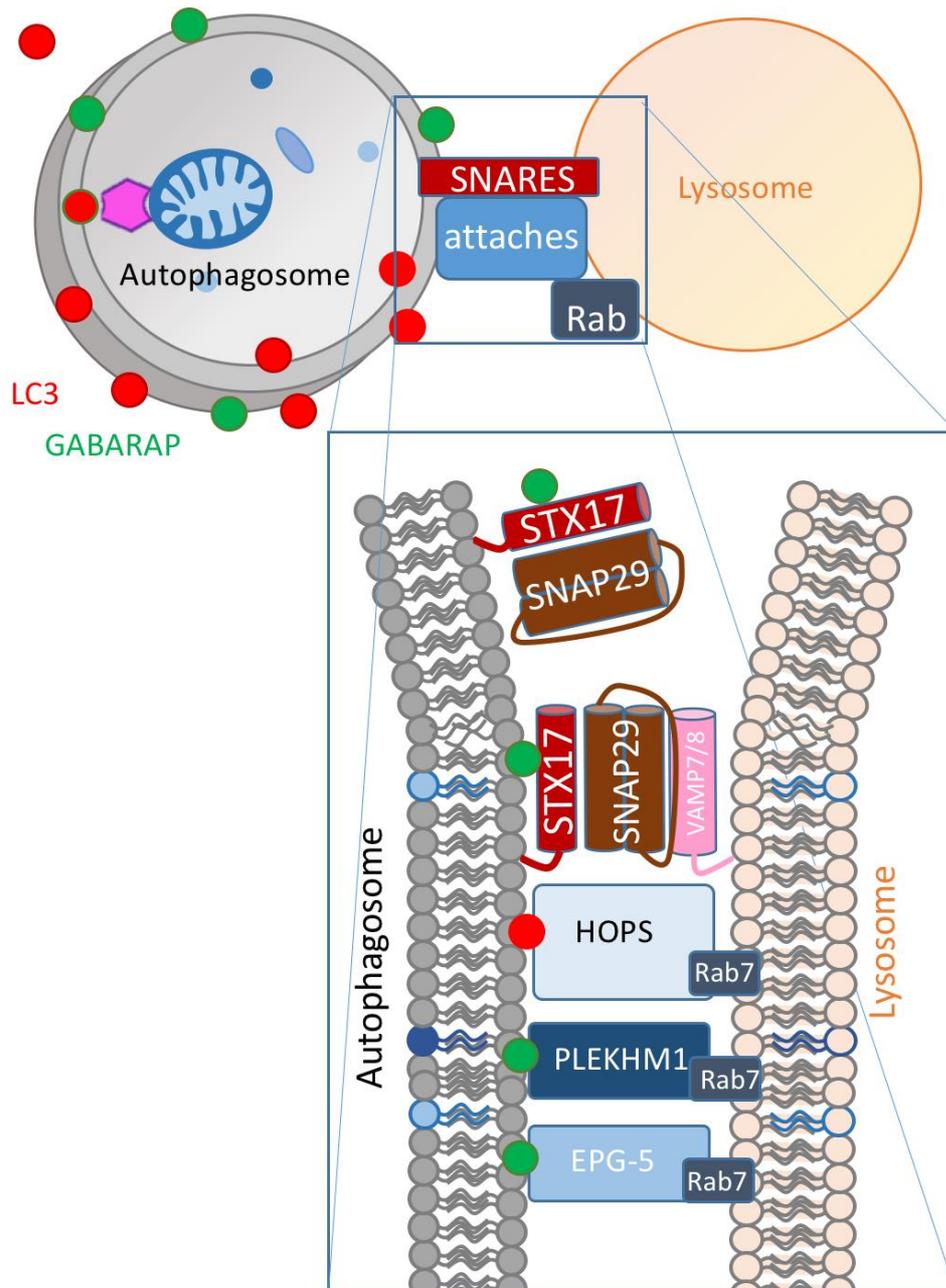


Figure 35 – Acteurs de la fusion entre autophagosomes et lysosomes

Les SNARE, les protéines Rab et les protéines dites d'attaches agissent de concert pour médier la fusion autophagosome-lysosome. La fusion des autophagosomes avec les lysosomes nécessite les actions concertées des protéines SNARE, des GTPases Rab et des facteurs d'attache. Deux complexes SNARE, le complexe autophagosomal STX17 -SNAP29 -VAMP7 / 8 et le complexe lysosomal STX7 -SNAP29 fonctionnent en parallèle les uns avec les autres pour assurer la médiation de la fusion autophagosome et lysosome. Les protéines d'attaches telles que EPG5, HOPS et PLEKHM1, se lient simultanément aux ATG8 sur les autophagosomes et à Rab7 sur les lysosomes pour attacher les autophagosomes le lysosome. Il a également été démontré que le HOPS cible les autophagosomes pour favoriser la maturation de l'autophagosome. (Adaptée de Zhao and Zhang, 2019).

Les GTPases Rab7 à la surface des endosomes tardifs, permettent la fusion des endosomes avec les lysosomes (Jäger *et al.*, 2004). Cette fonction est similaire au cours de la maturation des autophagosomes (Hyttinen *et al.*, 2013). En contexte d'induction de l'autophagie, une augmentation de l'intensité du signal Rab7 est observée par immunoelectrodection au niveau des autophagosomes tardifs par rapport aux autophagosomes naissants. La perte de fonction partielle de Rab7 provoque l'accumulation de vésicules autophagiques tardives non fusionnées. (Gutierrez, 2004). Rab7 est recrutée au niveau des autophagosomes directement du cytoplasme (et non de vésicules Rab7 positives) (Gutierrez, 2004), permettant la formation d'autophagolysosomes (Ganley *et al.*, 2011). De plus, la GTPase Rab7 interagit avec la protéine effectrice FYCO1 (FYVE and coiled-coil domain containing protein 1), importante pour réguler le transport des autophagosomes aux lysosomes. LC3 facilite le transport des autophagosomes sur les microtubules via une interaction avec FYCO1 (de manière LIR dépendante) et avec le moteur moléculaire kinésine (Pankiv *et al.*, 2010), **Figure 34.** Rab7 est également associée avec la protéine ORP1L, un senseur du cholestérol et avec la dynéine, pour faciliter le transport des autophagosomes, autolysosomes et lysosomes (Jordens *et al.*, 2001; Wijdeven *et al.*, 2016). Rab7 est capable, en outre de recruter un certain nombre de protéines clés nécessaires à la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes comme epg-5 ; PLEKHM1 et les complexes de fusion tels que le complexe HOPS permettant de créer un lien physique entre les membranes, (Yamano *et al.*, 2014), **Figure 35.**

Des fonctions de Rab7 dans la biogénèse des autophagosomes a également été mise en évidence et promeut l'élongation des membranes dans un processus de mitophagie (Yamano *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent que l'activité de Rab7 est finement régulée et possiblement dépendante du type de cargos ciblé.

3.3.2 Les facteurs d'attachements

Les facteurs de connexions pourraient être divisés en deux groupes principaux, les protéines dimères qui sont principalement impliquées dans la voie sécrétoire et les complexes multimères majoritairement impliqués dans la voie lytique.

La protéine PLEKHM1 (plecksin homology domain-containing family M member 1) agit tel un pont entre autophagosome et lysosomes et est capable d'interagir avec tous les membres LC3/GABARAP (Velikkakath *et al.*, 2012; McEwan *et al.*, 2015). Par ailleurs une étude récente a mis en évidence que les protéines de la famille GABARAP permettent le recrutement de PLEKHM1, permettant de réguler la fusion entre les lysosomes et les autophagosomes alors que les protéines de la famille LC3 ont un rôle moins prédominant (Nguyen *et al.*, 2016). Une autre protéine EPG5 est importante pour la fusion et interagit notamment avec les SNARES et GABARAP. La déplétion d'EPG5 provoque la diminution de la spécificité de fusion et l'accumulation d'autophagosomes non fusionnés (Wang *et al.*, 2016). Le complexe multimérique de fusion HOPS agit tel un GEF (Guanosine exchange factor) pour faciliter l'activation de Rab7 (passage d'un état inactif : GDP guanosine di-phosphate à l'état actif : GTP guanosine tri-phosphate) et permet la fusion et le rapprochement (« tethering ») des membranes. Ce complexe est constitué d'un certain nombre de sous-unités Vps11, Vps16, Vps39, Vps41. HOPS interagit avec les SNARES, permettant, via des interactions de type « coiled-coil » de faciliter la fusion des membranes. De plus, HOPS interagit avec les protéines

L'incroyable ULK,

Cette kinase est connue pour son rôle dans l'induction de l'autophagie. Néanmoins une étude récente a pu montrer un rôle d'Atg1 chez la levure dans les étapes de fusion. Sur l'autophagosome, la R-SNARE Ykt6 est phosphorylée par Atg1 provoquant un blocage d'interaction avec les Q-SNARES vacuolaires Vam3 et Vti1, empêchant ainsi la fusion prématurée entre l'autophagosome et la vacuole.

SNARE (Balderhaar and Ungermann, 2013).

3.4 Les SNARES

Les protéines SNARES sont localisées respectivement sur des vésicules différentes (v- et t-SNARE) et interagissent progressivement pour former des quadruples hélices (trans-SNARE) permettant le rapprochement et la fusion des membranes. La syntaxine 17 (Stx17) est recrutée au niveau des autophagosomes et interagit avec d'autre SNARE telle que SNAP-29 (synaptosomal-Associated Protein 29kDa) et VAMP8 (vesicle-associated membrane protein 8) permettant la formation des autolysosomes (Li *et al.*, 2020). Une étude récente a pu mettre en évidence que Stx17 n'est pas le seul SNARE interagissant avec

les ATG8. Dans les cellules de mammifères, des chercheurs ont identifié les régions d'interaction LIR dans plusieurs SNARE permettant d'élargir le paysage des interactions des Atg8-SNARE. (Gu *et al.*, 2019)

Par ailleurs, des études ont pu mettre en évidence que les SNAREs interviendraient également dans des étapes de formation d'autophagosomes (Moreau *et al.*, 2011; Nair and Klionsky, 2011). Une étude récente a montré que la déplétion de Stx16 provoque des défauts dans la biogenèse des lysosomes, tandis qu'un double knockout Stx16 et Stx17 provoque le blocage complet du flux autophagique au cours, de la mitophagie, la pexophagie, la xénophagie et de la ribophagie. Des analyses mécanistiques ont révélé que les protéines Atg8 et Stx16 contrôlent la fonction de plateformes pour mTOR actif. Ces résultats révèlent une large interaction directe des mAtg8 avec SNARE et étendent les rôles des mAtg8 à la biogenèse des lysosomes. (Gu *et al.*, 2019; Kumar *et al.*, 2020)

Chez *C. elegans* LGG-2, et non LGG-1, interagit directement avec la sous unité VPS-39 du complexe HOPS et contrôle la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes. Des expériences d'immunofluorescence ont mis en évidence qu'un mutant perte de fonction pour *lgg-2* provoque un retard de dégradation des autophagosomes essentiels à l'élimination des mitochondries paternelles. La perte de fonction de *lgg-1*, quant à elle, bloque la formation des autophagosomes. Ces résultats suggèrent un rôle séquentiel de ces protéines au cours du processus d'autophagie (Manil-Ségalen *et al.*, 2014).

Par ailleurs, chez *C. elegans* les protéines ectopiques P granules (EPG5) ont été identifiées comme effecteurs de Rab7 et importantes pour la fusion entre les autophagosomes et les endosomes et lysosomes. (Tian *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2016). EPG-5 est recrutée au niveau des endosomes tardifs et des lysosomes via interaction avec Rab7 et VAMP7/VAMP8. EPG-5 interagit physiquement avec LGG-1 via son domaine LIR.

3.5 Les phosphoinositides

Les phosphoinositides (PI) sont un dérivé phosphorylé de phosphatidylinositols. Ces phospholipides sont importants pour le trafic membranaire intracellulaire. Le rôle du PI3P est bien caractérisé pour la formation des autophagosomes. Des études récentes révèlent un rôle des PI au niveau de la fusion avec les lysosomes. La génération de PI4P (phosphatidylinositol

(4)-phosphate) est cruciale pour la fusion autophagosome-lysosome chez les mammifères. En contexte de starvation, PI4Palph se disperse dans le cytoplasme et se localise au niveau des autophagosomes (Hanzhi Wang *et al.*, 2015). PI4K de type 2 interagit avec GABARAP et GABARAPL2 mais pas avec LC3. La perte de fonction de GABARAP bloque la translocation de PI4K II aux autophagosomes et est à l'origine de larges autophagosomes incapables de fusionner avec un compartiment lysosomal (Hanzhi Wang *et al.*, 2015).

3.6 Régulations

3.6.1 Régulation transcriptionnelle de l'expression des Atg8

Certaines études ont révélé que l'activité autophagique peut être modulée par des mécanismes transcriptionnels (Schaaf *et al.*, 2016). Un grand nombre de facteurs de transcription sont capables de moduler l'expression des protéines de type Atg8. Cette diversité peut être interprétée comme étant une nécessité de pouvoir rapidement engager ou réprimer l'expression de ces protéines en fonction des stress subis par la cellule. D'un autre côté, cette multiplicité des facteurs pourrait permettre d'expliquer la nécessité de spécificités en aval telles que la reconnaissance spécifique de cargo.

La régulation des Atg8 par ces facteurs de transcription est généralement positive. Une famille de facteur de transcription (GATA) permettant la transcription au cours du développement et de la différenciation cellulaire module l'expression des protéines GABARAP et LC3. Au cours de l'érythropoïèse une protéine : FOXO3 augmente l'effet transcriptionnel GATA1 sur GABARAP LC3 (Mammucari *et al.*, 2007; Kang *et al.*, 2012).

Le facteur ATF-4 est important pour la voie UPR (unfolding protein reponse) et contrôle notamment la transcription positive de LC3B et l'expression de LC3A, GABARAPL1 et

En contexte pathologique, il a été montré que des modifications épigénétiques peuvent moduler l'expression des protéines GABARAPL1, GABARAP et LC3B dans des cellules cancéreuses.

En effet, une diminution de l'expression de GABARAPL1 est associée à la fois à la méthylation de son promoteur et à la désacétylation de l'histone H3, (marque épigénétique de condensation de la chromatine). Par ailleurs le recrutement de CREB-1 sur le promoteur GABARAPL1 est nécessaire pour l'expression de GABARAPL1 (Hervouet *et al.*, 2015)

De plus, dans les cellules HeLa la méthyltransférase G9a réprime directement les gènes *lc3 Gabarapl1 et Gabarapl2* et que l'inhibition de la répression épigénétique médiée par G9a représente un mécanisme de régulation important au cours de l'autophagie. (Artal-Martinez de Narvajás *et al.*, 2013)

GABARAPL2 dans les cellules musculaires et cancéreuses. De plus un autre membre de la voie UPR CHOP cible de ATF4, qui a été retrouvé à la suite d'un arrêt de croissance ou des dommages d'ADN, contrôle également l'expression de GABARAP (B'chir *et al.*, 2013; Huan Wang *et al.*, 2015).

L'équipe de Ioannis P. Nezis et al a mis en évidence dans une étude récente une régulation transcriptionnelle de l'expression des gènes autophagiques par Atg8a, via son interacteur Sequoia, YL-1 et Sir2 chez *Drosophila melanogaster* (B'chir *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2015). En effet, la mutation du motif LIR de Sequoia provoque l'accumulation du nombre d'autophagosomes et d'autolysosomes, suggérant une activité répressive de Sequoia sur l'autophagie dépendante de son motif LIR. Ce facteur de transcription est capable d'interagir avec Atg8a dans le noyau et contrôle l'activation transcriptionnelle des gènes de l'autophagie. L'acétylation d'Atg8a par YL-1 au niveau de sa lysine58 contrôle la localisation de cette protéine au niveau du noyau.

3.6.2 Modification post-traductionnelles

- Ubiquitination

Certaines études ont montré que LC3/GABARAP peuvent être assujetties à l'ubiquitination. La monoubiquitination de LC3, en vue de sa dégradation protéasomale, (et non de GABARAP), régule négativement l'autophagie en condition de stress. Cette modification pourrait permettre de protéger les cellules d'une autophagie excessive (rapporté dans Wesch, Kirkin and Rogov, 2020). La mono- et polyubiquitination pilotée de GABARAP (pas LC3) sur K13 et K23 dans le sous-domaine α -hélicoïdal N-terminal se produit à travers les chaînes K48 et cible les GABARAP pour la dégradation protéasomale, (Joachim *et al.*, 2017).

- Phosphorylation

La phosphorylation de LC3B est retrouvée essentielle à la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes. Cette phosphorylation est faite au niveau de la thréonine 50 par les kinases SK3/SK4. L'absence de phosphorylation provoque un blocage du flux autophagique et une absence de fusion entre les autophagosomes et lysosomes (Joachim *et al.*, 2017). La phosphorylation peut avoir un effet d'inhibition de l'autophagie, la kinase pKA phosphoryle LC3B sur la sérine 12 qui provoque la restriction de la conjugaison de LC3B. Au cours d'une carence nutritionnelle, l'activité de la protéine pKA est diminuée provoquant une activation de

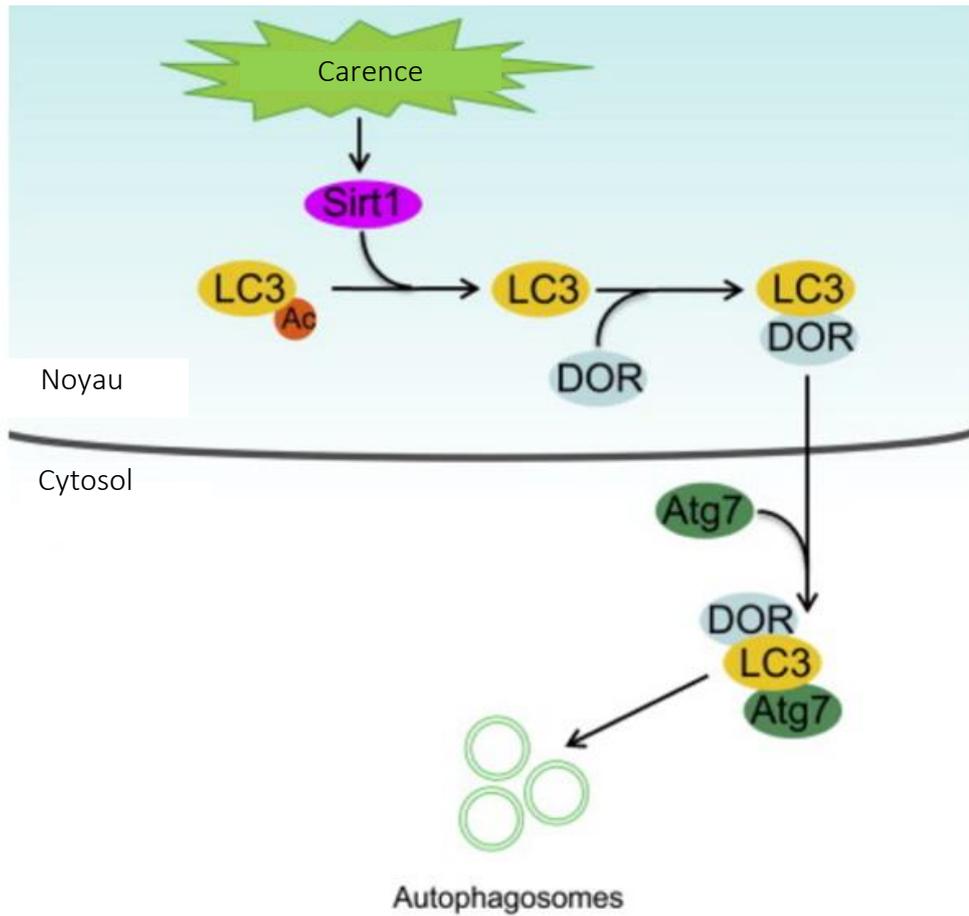


Figure 36 – Modèle de translocation de LC3 du noyau vers le cytoplasme par dé-acétylation

En contexte de starvation la désacétylation de LC3 sur la lysine 49 et 51 par Sirt1 permet à LC3 d'interagir avec la protéine nucléaire DOR et de retourner dans le cytoplasme avec DOR, où elle est capable de se lier à Atg7 et d'autres facteurs d'autophagie. L'association de LC3 désacétylée avec des facteurs autophagiques provoque la redistribution de la LC3 du noyau vers le cytoplasme. Ainsi, un cycle d'acétylation-désacétylation garantit que la LC3 se redistribue efficacement sous une forme activée, du noyau vers le cytoplasme, où elle joue un rôle central dans l'autophagie pour permettre à la cellule de faire face au stress nutritionnel. (Huang *et al.*, 2015).

LC3B. Ainsi, le rôle de la kinase est donc de garder une quantité de LC3B phosphorylé et non conjugué (Cherra *et al.*, 2010). Il n'est pas connu si les autres membres des familles GABARAP et LC3 sont phosphorylés à la même position.

- Acétylation

L'acétylation des protéines Atg permet de moduler l'activité autophagique. Une acétylation accrue des protéines Atg causées par l'absence de la déacétylase Sirt1 ou l'augmentation de l'expression de l'acétyltransférase p300 (E1A binding protein 300/p300) permet d'inhiber l'autophagie, (Lee *et al.*, 2008; Lee and Finkel, 2009). En effet, la déacétylation de LC3 dans les cellules HeLa en culture promeut l'autophagie alors que l'acétylation par p300 bloque le processus, visualisable notamment par la dégradation du récepteur autophagique p62. Par ailleurs, P300 permet l'acétylation d'autres protéines autophagiques telles que Atg5, Atg7 et Atg12. De plus P300 colocalise avec Atg7 de manière dépendante de la présence de nutriment, (Lee and Finkel, 2009). Il a été montré également que la déacétylase Sirt1 représente un autre aspect de la régulation de l'autophagie. Sirt1 peut former un complexe moléculaire avec Atg5, Atg7 et Atg9 *in vitro*. L'absence de Sirt1 dans le tissu du myocarde de souris provoque l'inhibition de l'autophagie *in vivo*, (Lee *et al.*, 2008).

Des études récentes ont montré une acétylation des protéines LC3. En effet, un trafic de LC3B entre le noyau et le cytoplasme est régulé par l'acétylation des lysines 49 et 51 qui bloque l'entrée de LC3B dans le cytoplasme pour interagir avec les enzymes de conjugaison (Huang *et al.*, 2015). LC3 est acétylée dans le noyau et sa déacétylation par la déacétylase Sirt1 sur les lysines 49 et 51 permet une interaction entre LC3 et la protéine nucléaire DOR puis est transféré du noyau vers le cytoplasme, **Figure 36**. Cette fonction de trafic de LC3 du noyau vers le cytoplasme ouvrent un nouveau champ d'investigation des rôles nucléaires des Atg8.

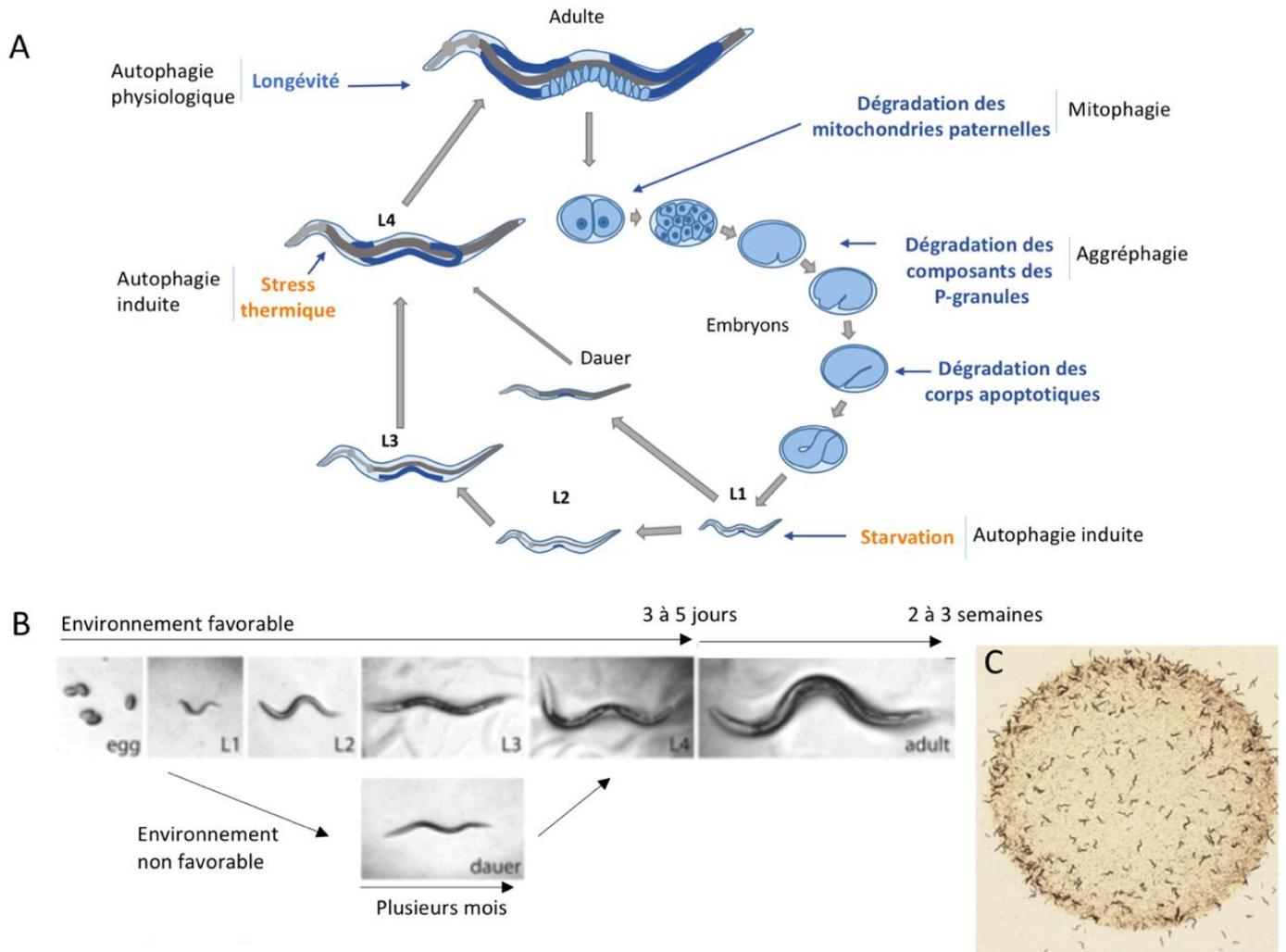


Figure 37 - *C. elegans* est un modèle d'étude de l'autophagie

A-B- Cycle de vie de *C. elegans*, l'embryogénèse est suivie d'un développement larvaire jusqu'au stade adulte. L'autophagie est retrouvée à plusieurs stades du développement. Dans des conditions de carence, les animaux rentrent dans un stade de dormance appelé le stade *dauer*. **C-** Tapis bactérien sur lesquels les animaux se développent.

PARTIE 3 *C. elegans* un modèle d'étude de l'autophagie

Par son lignage cellulaire parfaitement décrit, le séquençage complet de son génome et son cycle de vie court et invariant, le nématode *Caenorhabditis elegans* est un animal modèle très puissant pour étudier l'autophagie en contexte physiopathologique au cours du développement et du vieillissement. Sa petite taille et sa transparence, permet la visualisation par microscopie de ses structures anatomiques et subcellulaires. Son cycle de développement se compose d'un stade embryonnaire suivi de 4 stades larvaires séparés par des mues, avant le passage à l'âge adulte en 3.5 jours à 20°C, **Figure 37**.

Ce ver existe principalement à l'état hermaphrodite et s'autoféconde générant environ 300 individus. Une non-disjonction en méiose 1 provoque l'apparition de mâles, permettant des approches génétiques. (Chen, Scarcelli and Legouis, 2017). Par ailleurs, des techniques de mutagénèses aléatoires, de transgénése (biolistique), de mutagénèse ciblée (CRISPR-Cas9) et d'ARN interférant permettent l'étude des gènes et des voies de signalisation. L'autophagie est retrouvée tout au long du développement du ver, dès la fécondation pour la dégradation des composants paternels, la différenciation germinale, l'organogénèse, la résistance à la carence alimentaire et le vieillissement.

La revue suivante décrit les processus d'autophagie et plus particulièrement de mitophagie chez *C. elegans*, dans des conditions développementales, au cours de la longévité, et en réponse à différents stress.

**Revue - « Mitophagy during development and stress in
C. elegans »**



Contents lists available at ScienceDirect

Mechanisms of Ageing and Development

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mechagedevMitophagy during development and stress in *C. elegans*Romane Leboutet^{a,b,1}, Yanfang Chen^{a,1}, Renaud Legouis^{a,b,*}, Emmanuel Culetto^{a,b,*}^a Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France^b INSERM U1280, 91198, Gif-sur-Yvette, France

ARTICLE INFO

Keywords:

mitochondria
 mitochondria homeostasis
 mitophagy
Caenorhabditis elegans
 paternal mitochondria elimination
 aging
 stress
 heteroplasmy

ABSTRACT

Mitochondria is a key cellular organelle, which is tightly supervised by multiple oversight cellular mechanisms regulating mitochondrial biogenesis and mitochondria maintenance and/or elimination. Selective autophagy of mitochondria, *id est* mitophagy, is one of the cellular mechanisms controlling mitochondria homeostasis. The nematode *Caenorhabditis elegans* has recently emerged as a powerful model organism to study the roles and functions of mitophagy. We present here the current knowledge on cellular and molecular mechanisms underlying the selective elimination of mitochondria by autophagy in *C. elegans* in the context of developmental processes, aging and adaptive responses to various stresses.

1. Mitochondria homeostasis is regulated through multiple supervision systems

1.1. Mitochondrial functions

Mitochondria are double-membrane organelles originating from an endosymbiotic event whereby an alpha protobacteria has been domesticated by eukaryotic cell (Sagan, 1993). This organelle possesses its own genome (mtDNA) (Nass and Nass, 1963) and integrates multiple catabolic pathways through oxidative phosphorylation to produce adenosine triphosphate (ATP) (Hall et al., 2012). This organelle shelters essential metabolic pathways such as the Krebs cycle and fatty acid β -oxidation, as well as the biosynthesis of heme and lipids and part of the urea cycle. Mitochondria is the major site for reactive oxygen species (ROS) production, which could act either as signaling molecule when produced at low doses or be detrimental for the cells when produced at higher dose (Shadel and Horvath, 2015). Mitochondria are involved in the early step of the signaling pathway of apoptosis and participate to cell calcium homeostasis. Mitochondria are dynamic organelles that consistently undergo fission and fusion events and move over the cell cytoskeleton tracks (Summerhayes et al., 1983). Such a dynamic is essential for the quantitative and qualitative adaptation of mitochondria to the cell physiology variations, its participation to calcium regulation and the spatial segregation of mtDNA and matrix components. This dynamic allows the specific localization of mitochondria to subcellular places where energy is required (Sun et al., 2013), and eventually

modulate the way mitochondria establish contact sites with other organelles. Large mechanochemical GTPases from the Dynamin family are responsible for the fluidity of the mitochondria network reticulum by controlling fusion and fission of mitochondria (Praefcke and McMahon, 2004; van der Bliek et al., 2013). Because mitochondria are essential to the cell, its dysfunction could jeopardize cell homeostasis and trigger apoptosis, inflammation or senescence (Bock and Tait, 2019). Indeed, numerous human diseases are associated with mitochondria dysfunction (Alston et al., 2017).

1.2. Mitochondrial maintenance

Mitochondrial homeostasis is the result of a constant equilibrium between biogenesis, reparation and degradation processes.

On the one hand, a series of mechanisms allow the building of new mitochondrion, increasing the mitochondrial mass. These processes include the replication of mtDNA, the expression of mitochondrial genes, the import of nuclear-encoded proteins and lipids, and mitochondrial dynamic, which encompasses transport, fusion and fission. Overall, these mechanisms constitute the mitochondrial biogenesis, which requires a tight crosstalk between two different genomes that is called the nucleo-mitochondrial interaction (Grivell, 1995; Melber and Haynes, 2018).

On the other hand, there is a set of mechanisms involved in maintenance, reparation and eventually the removal of dysfunctional and damaged mitochondria. A first level of action is the regulation of

* Corresponding authors.

E-mail addresses: renaud.legouis@i2bc.paris-saclay.fr (R. Legouis), emmanuel.culetto@i2bc.paris-saclay.fr (E. Culetto).¹ equal contribution.<https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.111266>

Received 31 October 2019; Received in revised form 19 May 2020; Accepted 20 May 2020

Available online 23 May 2020

0047-6374/ © 2020 Published by Elsevier B.V.

protein degradation via mitochondrial proteases and the ubiquitin- and proteasome-dependent OMMAD (outer mitochondrial membrane associated degradation) (Xu et al., 2016). A second mechanism is the mitochondrial unfolded protein response (UPR^{mt}), an evolutionary conserved adaptive transcriptional stress response, which promotes normal mitochondrial function recovery. UPR^{mt} modifies nuclear genes transcription to foster protein folding and to prevent aggregate formation, to induce proteases and to limit ROS accumulation. Noticeably, UPR^{mt} can also promote mitochondrial biogenesis by stimulating the mtDNA replication and the mitochondrial import of lipids and proteins (Naresh and Haynes, 2019). An additional maintenance mechanism relies on the formation of mitochondrial-derived vesicles that allows the selective elimination of mitochondrial damaged proteins and lipids in response to an oxidative stress (Sugiura et al., 2014). It depends on the formation of buds, containing the jeopardized mitochondrial material, which are addressed to late endosomes for further degradation within the lysosomes (Soubannier et al., 2012). Finally, the massive elimination of dysfunctional mitochondria could occur through jettisoned exosphere containing mitochondria (Melentijevic et al., 2017), endosomal microautophagy (Hammerling, 2016) or mitochondrial-selective autophagy. Overall, these multiple mechanisms involved in quality control of mitochondria are modulated by intrinsic and environmental contexts.

This review focusses on the functions and the molecular mechanisms of selective degradation of mitochondria by autophagy, *id est* mitophagy, in the model organism *Caenorhabditis elegans*.

1.3. Overview of the autophagy mechanisms

Autophagy allows the addressing of intracellular components to lysosome for degradation and recycling. It was first termed by de Duve (De Duve, 1963) to describe the cell degradation process taking place in the double-membrane organelle containing parts of cytosol and pieces of organelle structures. Indeed, three different types of autophagy co-exist within the cell depending on the mechanisms of delivery of cytoplasmic components to the lysosome: microautophagy, chaperone-mediated autophagy and macroautophagy (Boya et al., 2013). Microautophagy (MI) is defined as the engulfment of cytosolic cargoes directly via invagination of the lysosomal/vacuolar membrane. It can degrade soluble proteins or even bigger cargoes such as portion of the nucleus, lipid droplets, mitochondria and endosomes (Kissová et al., 2007; Tuttle et al., 1993; Tuttle and Dunn, 1995; Veenhuis et al., 1983; Yokota et al., 1993). MI depends on the activity of the Endosomal Sorting Complexes Required for Transport (ESCRT) machinery (Oku et al., 2017). Interestingly, a microautophagy related mechanism, named endosomal microautophagy (eMI), shares with MI many features but involves endosome (Mukherjee et al., 2016; Sahu et al., 2011; Uytterhoeven et al., 2015). For example, in mouse embryonic fibroblasts, organelle such as mitochondria could be guided to the Rab5 positive early endosome and are engulfed in a ESCRT-0, -I and -II-dependent mechanism (Hammerling et al., 2017).

Chaperon-mediated autophagy (CMA) is another type of autophagy that directly imports substrates to lysosome for degradation (Majeski and Dice, 2004; Massey et al., 2004). In a similar way to eMI, CMA degrades protein, which interact with HSPA8 through a KFERQ motif, and nearly 30% of cytosolic components could be degraded via CMA (Dice, 1990). Neither microautophagy nor CMA has been yet scrutinized in *C. elegans*, but while the former is evolutionary well conserved the latter is presumably not conserved in *C. elegans*, which is devoid of LAMP2A (Eskelinen et al., 2005; Kaushik and Cuervo, 2018).

Macroautophagy (hereafter referred to as autophagy) is present in all eukaryotes and characterized by the formation of a double-membrane vesicle, the autophagosome, which is dedicated to cytoplasmic materials sequestration and delivery to the endo-lysosomal system. Initially, autophagy has been studied in starvation condition and was considered a non-selective degradation process, during which autophagosomes engulfed indistinctly bulk part of the cytoplasm (Fig. 1).

However, a growing number of experimental results demonstrated that selective autophagy could target specific cargoes using a series of dedicated receptors. Autophagy receptors can specifically recognize the cargoes to be degraded and bridge them to autophagosomes by interacting with Atg8/LC3 (Komatsu and Ichimura, 2010). Based on the engulfed cargo, selective autophagy was further classified into mitophagy (mitochondria), pexophagy (peroxisome), nucleophagy (nucleus), ER-phagy (ER), lipophagy (lipid droplets), aggregophagy (protein aggregates), xenophagy (pathogens) and so forth (Galluzzi et al., 2017).

Molecular machinery is well conserved between eukaryotes and Atg genes have been initially characterized in yeast (Tsukada and Ohsumi, 1993). However, Atg genes have been duplicated during evolution resulting in a more complex situation in mammals.

In the last 15 years, *C. elegans* has emerged as a powerful model to study autophagy (Chen et al., 2017) and genetic screens identified new autophagy genes some of which are absent in yeast (Tian et al., 2010).

2. Mitophagy is a selective degradative process that contributes to mitochondria quality control

2.1. Generalities

Mitophagy is the process that selectively engulfs pieces or whole mitochondrion into autophagosomes, to form mitoautophagosome that subsequently fused with lysosomes for degradation. The term mitophagy was first coined by Lemaster (Lemasters, 2005) based on the work performed in yeast by Camougrand and colleagues (Kissová et al., 2004). Since this initial molecular description of mitophagy in yeast, multiple *in vivo* evidences for the physiological importance of mitophagy have been put forward in other organisms. While in yeast, mitophagy is mediated by the receptor Atg32, *C. elegans* and mammals present several receptors and signalling pathways regulating mitophagy (Table 1). Mitophagy is involved in multiple physiological processes, including programmed red blood cells maturation, apoptotic cell death, stress-responses (hypoxia, heat shock, etc...), and neurodegenerative diseases that challenge mitochondria functioning. The discovery of mitophagy and the detailed description of its various molecular mechanisms and underlying functions have been recently reviewed (Montava-Garriga and Ganley, 2019; Palikaras et al., 2018; Pickles et al., 2018). Therefore, we briefly state a general overview of the principles that lead to selective elimination of mitochondria via autophagy.

Mitophagy events covers three main categories: the basal, the stress-induced and the developmentally programmed mitophagy. The mitophagy flux can be divided into two major steps, the tagging of mitochondria to be eliminated and the subsequent formation of the mitoautophagosome. Usually, mitophagy is triggered by modifications of the cell environment or stress conditions or developmental signalling that lead to mitochondria activity/parameters alteration and specific mitochondria tagging. It means that environmental or cellular stresses or other mitophagy stimuli are translated into a specific molecular modification of the outer mitochondrial membrane that primes mitochondria for degradation. Thereafter, primed mitochondria recruits the autophagy machinery leading to the formation of an isolation membrane (IM), also called phagophore, nearby mitochondria. Finally, IM enwraps the targeted mitochondria and closes to form a mitoautophagosome, which subsequently fuses with the lysosome for degradation.

2.2. Tagging unwanted mitochondria

Overall, the selective elimination of mitochondria via autophagy requires the specific localization to the mitochondrial surface of a set of molecules recognized as cargoes for autophagosome (Table 1). These evolutionary conserved pathways include ubiquitin and autophagy receptors, both potentially harbouring post-translational modification

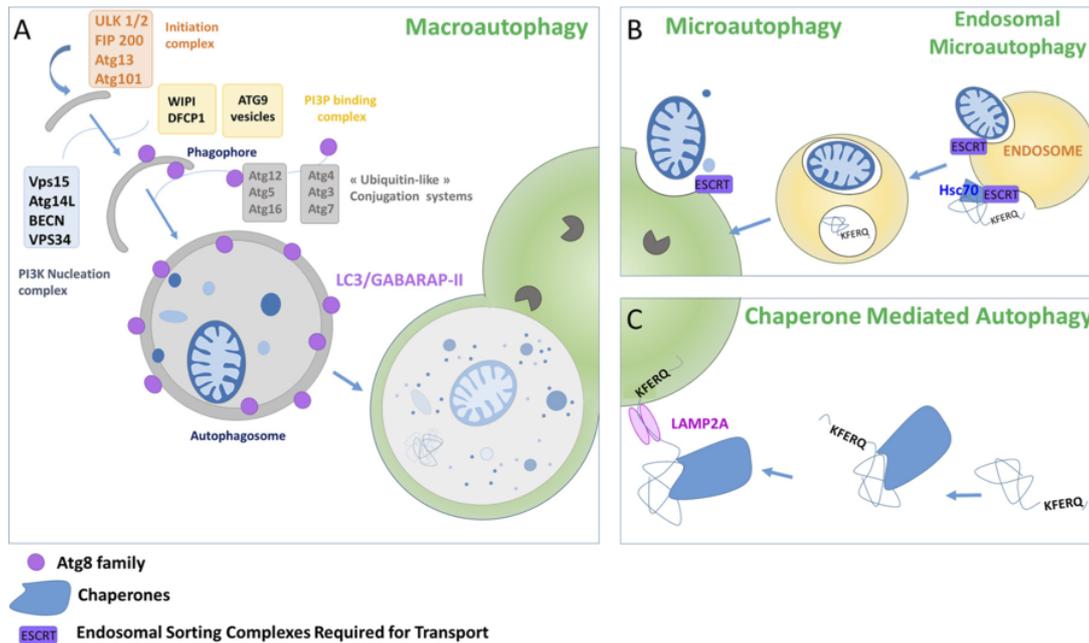


Fig. 1. The three types of autophagy in most eukaryotic cells.

(A) Macroautophagy, which is commonly named autophagy, is characterized by the sequestration of cargoes within a double membrane structure, called the autophagosome. In mammals, the autophagy starts by the formation of a flat membranous structure, the phagophore, which elongates and close to generate a double membrane vesicle. Finally, the external membrane of the sealed autophagosome fused with the lysosome to generate an acidic and degradative compartment named the autolysosome, allowing recycling of autophagic cargoes. The core autophagy machinery forms various complexes that acts in four major steps. The ULK1/2 (UNC-51 like autophagy activating kinase 1/2) complex is involved in the initiation step of the process. The class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) complex induces locally PI3P (phosphatidylinositol 3 phosphate) synthesis and allows the nucleation of the phagophore by recruiting the PI3P binding complex. The Atg12 and the Atg8 conjugation systems are controlling the elongation of the phagophore to form the autophagosome through lipidation of Atg8s to phosphatidylethanolamine (PE).

(B) Membrane invagination of either the endosome or the lysosome allows the direct sequestration of cargoes within degradative compartments by endosomal microautophagy or microautophagy, respectively.

(C) Chaperone-mediated autophagy (CMA) targets proteins containing the KFERQ motif that is recognized by several chaperones, including Hsp70 (Heat shock protein 70 kDa). During CMA, LAMP2 (Lysosomal-Associated Membrane Protein) mediates the transfer of Hsp70-protein aggregates within the lysosome.

such as polyubiquitination and/or phosphorylation. The best understood mechanism involves PTEN-induced putative kinase protein 1 (PINK1) and the E3 ubiquitin ligase Parkin (Fig. 2). However, alternative E3 ubiquitin ligases could be involved such as Muhl (Rojansky et al., 2016). When mitochondria are damaged and loss their membrane potential, PINK1 is stabilized on the OMM and thus recruits Parkin, which subsequently ubiquitylates proteins at the OMM. Then, these multiple ubiquitin motifs are recognized by a set of autophagy receptors such as P62, NBR1, NDP52, Optineurin, TAXBP1 and ALLO-1 (Table 1). These receptors harbour both an ubiquitin binding site that interacts with ubiquitylated OMM proteins and a LC3 interacting region (LIR) motif that connects onto the IM, thus enabling the tethering between both organelles (Fig. 2). Alternatively, a series of ubiquitin-independent mitophagy employ specific autophagy receptors directly localized to the mitochondrial membranes, such as Atg32, BCL2L13, DCT-1/NIX/BNIP3L, BNIP3, FUNDC1, FKBP8, PHB2 and AMBRA1 (Fig. 2 and Table 1). In this case, the mitophagy stimulus triggers the increase of autophagy receptor density at the OMM by transcriptional and induce their post-translational regulations to promote and strengthen direct interaction with Atg8/LC3 autophagy proteins. Additionally, alternative mechanisms allow the exposure of inner membrane of the mitochondria (IMM) autophagy receptor, PHB-2 and cardiolipin. This set of mitophagy receptors is differently employed depending on the organism, cellular context, developmental stage and environment. For example, when yeast, are submitted to nitrogen starvation the OMM protein Atg32, is upregulated and acts as an autophagy receptor, through its Atg8 interacting motif, leading to the specific recognition of

mitochondria by forming autophagosome. Similarly, during the maturation of mammalian red blood cell, mitochondria are removed by a mechanism involving mitophagy via increased expression of the OMM protein NIX, which recruits isolation membranes to mitochondria through its LIR (Table 1).

2.3. Formation and maturation of the mitoautophagosome

The mitophagy receptors, mediate the interactions with the autophagy machinery to trigger autophagosome formation around mitochondria. Damaged mitochondria represent a platform for the multiple formation of mitophagosomes (Dalle Pezze et al., 2020; Zachari et al., 2019). Different receptors interact with the autophagosome nucleation UNC-51-Like Kinase 1 (ULK1) complex or the Atg8/LC3/GABARAP autophagosomal proteins. For example, ULK1 can interact directly with FUNDC1 and BCL2L13 whereas NDP52 contacts FIP200, which is a ULK1 protein complex member, to trigger mitochondria degradation (Vargas et al., 2019). Atg8/LC3/GABARAP are ubiquitin-like proteins, which localize to autophagosomal membrane through conjugation to phosphatidylethanolamine and mediate interactions with a number of mitophagy receptors possessing a LIR motif. Moreover, it has been shown that Atg8 homologues use a LIR motif to interact with ULK1 and could regulate autophagy (Alemu et al., 2012; Kraft et al., 2012). However, Atg protein including ULK1, WIP1, Atg14 and Atg16L1 can directly associate with depolarized mitochondria in the absence of LC3 (Itakura et al., 2012). In particular conditions, LC3/GABARAP homologs are dispensable for autophagosomes formation

Table 1
Key mammalian proteins involved in mitophagy and their homologues in *C. elegans*. Autophagy receptors as well as cargos are engulfed by autophagosomes for degradation. References are key publications linked to the mitophagy functions of the proteins. n.d : not determined.

Mitophagy actors in mammals	<i>C. elegans</i> homologues	Functions	Locations	References
AMBRA1 - Activating molecule in Beclin-1-regulated autophagy	n.d	Mitophagy inducer, Parkin and LC3 interactor	Cytosolic protein OMM	(Strappazzon et al., 2015; Strappazzon and Cecconi, 2015; Van Humbeeck et al., 2011)
BCL2L13 - Bcl2-like protein 13	n.d	Mitophagy receptor	OMM	(Murakawa et al., 2015; Sakakibara et al., 2015)
-Homologue of yeast Atg32				
BNIP3 - BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein interacting 3	DCT-1 - Daf-16/ FOXO controlled germline tumor affecting-1	Mitophagy receptor	OMM	(Hama et al., 2012; Quinsay et al., 2010; Schiavi et al., 2015a)
BNIP3L - BNIP3 like / NIX- NIP-3-Like Protein X	DCT-1 - Daf-16/ FOXO controlled germline tumor affecting-1	Mitophagy receptor	OMM	(Palikaras et al., 2015; Schweers et al., 2007)
Cardiolipin is a major membrane phospholipid localized in mitochondria	Cardiolipin	Lipid mitophagy receptor	Translocates from IMM to OMM	(Chu et al., 2013; Sakamoto et al., 2012)
FKBP8 - FK506-binding protein (FKBP) family	n.d	ATG8 interacting protein- Adaptor	OMM	(Bhujabal et al., 2017)
FUNDC1 - FUN14 Domain Containing 1	FNDC-1	Mitophagy receptor	OMM	(Lim et al., 2019; Liu et al., 2012)
LC3 - light chain 3	LGG-2 / LGG-1	Initiation, elongation and closure of autophagosome/ recognize specific cargos to degrade	Cytosolic protein conjugated to autophagosome	(Alemu et al., 2012; Mamił-Ségalen et al., 2014)
/ GABARAP - GABA(A) receptor-associated protein				
-Homologue of yeast Atg8				
NDFP52 - Nuclear dot protein 52 kDa	n.d	Ubiquitin-binding receptor protein	Cytosolic protein	(Vargas et al., 2019)
NBR1 - Neighbor of BRAC1 gene	n.d	Ubiquitin-binding receptor protein	Cytosolic protein	(Hollville et al., 2014)
NRF2/NFE2L2 - Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2	SKN-1 -SKINhead 1	Transcription factor	Cytosolic and nucleus	(Fang et al., 2017; Ghose et al., 2013)
OPTN- Optineurin	n.d	Ubiquitin-binding receptor protein	Cytosolic protein	(Padman et al., 2019)
PHB2 - Prohibitin 2	PHB-2	Mitophagy receptor	IMM	(Wei et al., 2017a)
PINK1 -PTEN-induced putative kinase 1	PINK-1	Serine/threonine kinase	OMM	(Kawajiri et al., 2010; Narendra et al., 2010)
PRKN - Parkin	PDR-1 Parkinson's Disease Related 1	E3 ubiquitin ligase	Cytosolic protein	(Narendra et al., 2008; Schiavi et al., 2015a)
SOSTM1/p62 -sequestosome 1	SOST-1	Ubiquitin-binding receptor protein	Cytosolic protein	(Geisler et al., 2010; Zhang et al., 2017)
TAX1BP1 - Tax1 binding protein1	n.d	Ubiquitin-binding receptor protein	Cytosolic protein	(Whang et al., 2017)

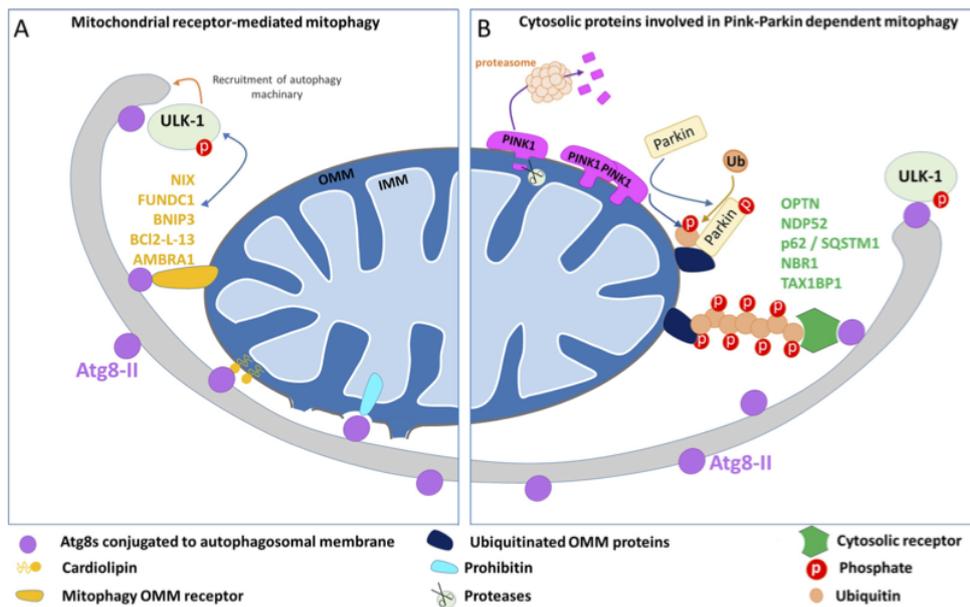


Fig. 2. Ubiquitin-dependent or independent mitophagy pathways involve multiple receptors. Two main mitophagy pathways allow the selective degradation of mitochondria by autophagy in physiological and stress induced conditions. (A) On one hand, mitochondrial receptors mediate mitophagy through the direct interaction with Atg8/LC3 proteins. Such mitochondrial membrane proteins NIX BNIP3 (NIX- NIP-3-Like Protein X / BNIP3L- BNIP3 like), FUNDC1 (FUN14 Domain Containing 1), BCL2L13 (Bcl2-like protein 13), and inner membrane protein prohibitin or the phospholipid cardiolipin. (B) On the other hand, the Pink1 (PTEN-induced putative kinase 1)-Parkin dependent mitophagy pathway requires cytosolic protein adaptors. Upon mitochondrial damage, PINK1, that is usually cleaved and processed, is stabilized at the outer mitochondrial membrane where it phosphorylates both ubiquitin residues

on mitochondrial protein and the E3 ubiquitin ligase Parkin. Activation of Parkin results in the high density of phospho-ubiquitin chains linked to substrates, which triggers the mitochondrial recruitment of the receptors OPTN (Optineurin), NDP52(Nuclear dot protein 52 kDa), SQSTM1(sequestosome 1), NBR1 (Neighbor of BRAC1) and TAX1BP1 (Tax1-binding protein) and their interaction with the autophagy machinery. In both pathways, Atg8/LC3s can interact with ULK1 (UNC51-like autophagy activating kinase 1) to induce autophagosome formation.

during PINK1/Parkin-dependent mitophagy but essential for autophagosomes-lysosome fusion (Nguyen et al., 2016). Additionally, studies in erythrocytes, suggest that the ubiquitin-like conjugating system made of Atg5 and Atg7 is dispensable for mitophagy (Nishida et al., 2009). Overall, these studies question the importance of interactions between mitophagy receptors and Atg8/LC3 protein.

Importantly, recent publications showed that the extension of the autophagosomal membrane around the mitochondria is regulated by the Rab family of small GTPases and their canonical regulators Rab-GEF (GTP exchange factor) and Rab-GAP (GTPase activating protein) (Tan and Tang, 2019). During mitophagy, Rab7, whose activity is regulated by two Rab GAPs TBC1D15 and TBC1D17, is also recruited to the OMM where it mobilizes vesicles to build up autophagosomes. Both proteins are also recruited to the outer mitochondrial membrane via the OMM protein FIS and could interact via their LIR motifs with the nascent autophagosomal membrane containing LC3/GABARAP proteins. Inactivation of these GAPs lead to the accumulation around mitochondria of autophagosomal like membranes. It seems that these GAPs help to guide the extension of the autophagosomal membrane around mitochondria and spatially control the Rab7 activity which itself controls vesicle recruitment to the autophagosomal membrane (Yamano et al., 2014). Finally, once mitoautophagosome is formed it ultimately fuses with the lysosome for degradation. Before this ultimate step of mitophagy, mitoautophagosomes acquire different protein complexes to gain any capacity to fuse. These proteins complexes are tethering factors allowing the establishment of contact zones with lysosome and SNARE proteins to trigger membrane fusion between tethered organelles.

3. Tools to study mitophagy in *C. elegans*

In recent years, the model organism *C. elegans* has been a leading animal to study the physiological role of mitophagy (Fig. 3). This organism allows addressing key biological questions regarding mitophagy functions during the ageing process and in the selective clearance of paternal mitochondria. *C. elegans* has multiple experimental advantages amongst them its genetic toolkit and its ease for cellular biology

approaches. Specifically, strategies used to observe and analyse mitophagy in *C. elegans* are mainly based on imaging techniques employing combinations of photonic and electron microscopies. Immunostaining approach on fixed tissue to visualize both autophagosome and mitochondria has been developed. Antibodies against LGG-1 or LGG-2, the two homologues of the ubiquitin-like protein Atg8 that label the autophagosome membrane could be combined with marker of mitochondria. A colocalization analysis is indicative of possible mitophagy events or close contacts between both organelles. Hence, in *C. elegans*, live imaging of mitophagy events is often monitored by colocalization between fluorescent tagging of mitochondrial and autophagosomal markers (Fig. 4). Multiple ways are available to visualize mitochondria, which have been recently reviewed (Rolland, 2014). Briefly, multiple transgenic lines expressing different mitochondrial protein (either addressed to the OMM, IMM or the matrix) tagged with fluorophore are available. These strains include known *C. elegans* mitochondria autophagy receptors such as DCT-1/NIX or ALLO-1 (Palikaras et al., 2015; Sato et al., 2018).

Alternatively, mitochondria could be labelled with fluorescent dyes (red and deep red Mitotracker, tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) and rhodamine 6 G) (Rolland, 2014).

C. elegans autophagosomes are generally monitored in transgenic lines expressing either GFP or mCherry tagged LGG-1 and LGG-2 proteins. Interestingly, transgenic lines expressing autophagy proteins, LGG-1 and SQST-1, tagged with a novel fluorophore, CemOrange2 that is separable from GFP and far-red fluorescent proteins should facilitate multiplex imaging in the future (Thomas et al., 2019). Several combination of organelle tags have been developed by N. Tavernarakis and his colleagues. They created strains with a dual fluorescent reporter system that combines a mitochondria marker, the mitochondrial-targeted GFP, expressed along with an ubiquitously expressed LGG-1 tagged with DsRed. Additionally, they adapted the Rosella tool (Rosado et al., 2008) by constructing a *C. elegans* strain expressing the mitoRosella synthetic gene, to study mitophagy in *C. elegans* (Palikaras et al., 2015). The mitoRosella is a mitochondria-targeted pH sensitive GFP fused to the pH insensitive DsRed. In the acidic autolysosome, the GFP part of the biosensor is quenched while the DsRed fluorophore is

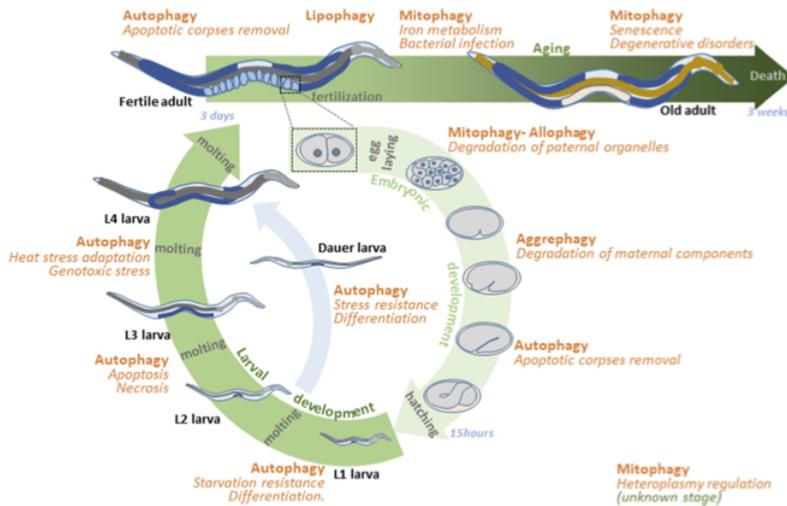


Fig. 3. Schematic representation of *C. elegans* life cycle indicating autophagy and mitophagy characterized processes. The development cycle of *C. elegans* is rapid and stereotyped (3.5 days at 20 °C), and consists of an embryonic stage and four larval stages before producing an adult animal that can live several weeks. In response to environmental stress an alternative developmental pathway results in the formation of a diapause stage called dauer larva. The figure only shows hermaphrodite animals, which are fertile for several days in absence of cross-fertilization by males. The various types of autophagy and the associated cargo are indicated in orange.

resistant. Thus, healthy/normal mitochondria could be observed thanks to both green and red signals they emitted. Subsequently, once mitophagy events occur, autophagosome engulfs mitochondria and then fuses with lysosome, which results in the quenching of the GFP signal and the reduction of the GFP/DsRED ratio indicative of the mitophagy flux. This tool has been originally adapted to study mitophagy in the large body wall muscle cells of *C. elegans* but also adapted to the nervous system (Fang et al., 2019a,b). In addition, the overall mitochondrial homeostasis could be analysed through its mass modification. These observations could be assessed in *C. elegans* by quantifying the overall fluorescence signal from mitochondrial targeted GFP specifically expressed in intestinal cells under the control of the *ges-1* promoter (Palikaras et al., 2015). Additionally, addressing the Timer protein to the mitochondria (MitoTimer), allows to monitor mitochondrial biogenesis and mitophagy (Laker et al., 2014). The dual emission fluorescent “Timer” probe initially fluoresces in green then shifts irreversibly to red fluorescence when it mature following a form of oxidation (dehydrogenation) of the Tyrosine 67 residue (Tersikh et al., 2000a). The MitoTimer Red/Green fluorescence ratio does not depend on the overall expression of MitoTimer nor in changes in mitochondrial pH. On one hand, the green fluorescence level indicates newly synthesized MitoTimer protein addressed to the mitochondrial matrix and reflects the increase of MitoTimer production or import and mitochondrial biogenesis. On the other hand, the level of red fluorescence, which indicates older mitochondria, mainly depends on degradative pathways such as autophagy, mitochondrial proteases or the ubiquitin proteasome system. Overall, measurements of red fluorescence over the green signal emitted by MitoTimer allows collection of quantitative data that mirrors multiple parameters controlling the mitochondrial homeostasis and therefore should be interpreted cautiously for monitoring mitophagy. In *C. elegans*, MitoTimer has been so far only expressed in mechanosensory neuron but it is a promising complementary tool to monitor mitochondria biogenesis in other cells and tissues. Alternatively, a dual Fluorescent Protein tag fused to the mitochondrial protein TOMM-7 has been proposed to monitor the mitophagy flux by western blot (Chapin et al., 2015). Finally, direct observation of mitoautophagosome could be performed in *C. elegans* with electron microscopy (EM) (Al Rawi et al., 2011; Meléndez et al., 2003). This technic allows visualization of autophagosome, possibly at different maturation steps (Manil-Ségalen et al., 2014). Additionally, EM analysis of autophagosomes from wild type and mutant strains could provide insights into the mechanism defects that are associated with genome alteration (Wang et al., 2016). It helps to monitor and distinguish normal mitochondria from modified ones, targeted by autophagosome, with altered structure such as matrix aggregates or cristae

disappearance (Wang et al., 2016; Zhou et al., 2016). Interestingly, EM and direct observation of fluorescent reporter construct labelling either distinct autophagosomal or mitochondrial proteins could be combined in *C. elegans* by applying the Correlative Light and Electron Microscopy (CLEM) technique. This technique has been used to analyse the mechanism underlying apoptotic corpse elimination through consecutive recruitment of LGG-1 and LGG-2 during *C. elegans* development (Largeau and Legouis, 2019) and could be adapted to further study mitophagy in *C. elegans*.

4. Physiological and developmental mitophagy in *C. elegans*

The model organism *C. elegans*, due to its intrinsic multiple experimental advantages and specific autophagy tools developed by the research community, has led the way to the discovery of key developmental and physiological roles for mitophagy. Hereafter, we will present and discuss mitophagy mechanisms involved in *C. elegans* development and stress response.

4.1. Elimination of paternal mitochondria

In humans, as in most animals, the mtDNA is maternally inherited (Birky, 2001), with exceptional pathological cases in which paternal mtDNA could be transmitted to the offspring (Luo et al., 2018; Luo et al., 2013a,b). Multiple experimental evidences using *C. elegans* and other model organisms have demonstrated that paternal mitochondria are not simply diluted upon fertilization but actively eliminated (see Box 1). Albeit some variations between species, the process of paternal mitochondria elimination (PME) is essential and relies on a selective mitophagy mechanism named allophagy. Allophagy designs the allogeneic (non-self) organelle autophagy in which paternal mitochondria, and membranous organelles (MO) that enter the oocyte are eliminated by autophagy (Al Rawi et al., 2011; Sato and Sato, 2011; Zhou et al., 2011) (Fig. 5). MO are sperm specific organelles that derived from the Golgi apparatus and probably play a role similar to the vertebrate acrosome (Nishimura and L'Hernault, 2017). Electron microscopy analyses of the fertilized oocyte revealed that paternal mitochondria are small and rounded whereas maternal ones are thin and tubular. Paternal mitochondria lose their membrane potential, have no cristae but present thicker membranes containing holes and dark speckles within the matrix. In the meantime, ubiquitination events take place on paternal mitochondria and MO (Sato et al., 2018) and the depletion of the E1 ubiquitin-activating enzyme UBA-1 or the E2 ubiquitin conjugating enzymes UBC-16 and UBC-18 alters the PME (Molina et al., 2019a). This ubiquitination is at least partially Parkin-independent since *pink-1*

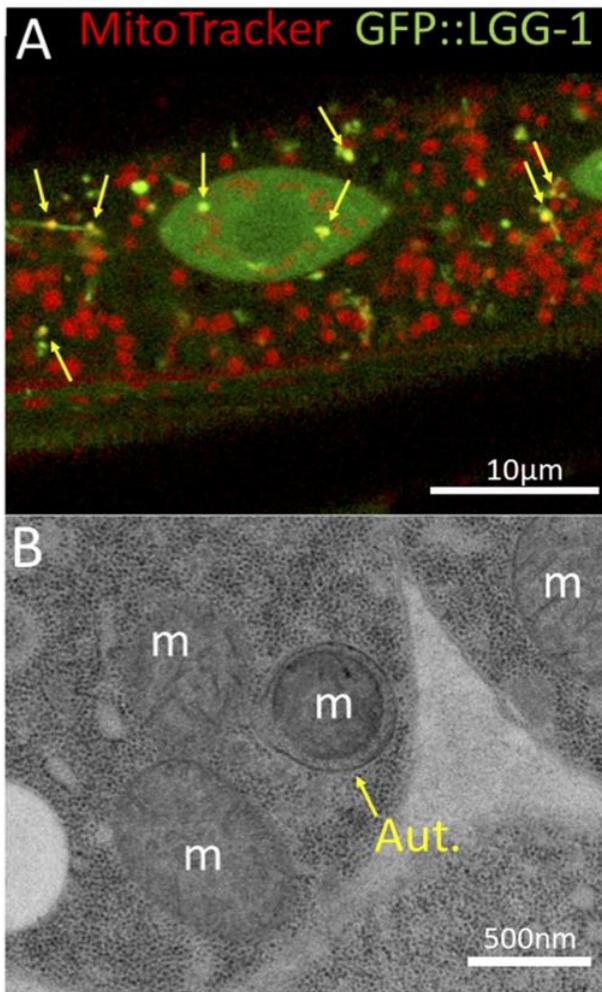


Fig. 4. Detection of mitophagy by microscopy in *C. elegans*. (A) Live imaging confocal microscopy of mitophagy events (yellow arrows) monitored by the colocalization between mitochondria stained with the fluorescent Mitotracker (red) and autophagosomes labelled with GFP::LGG-1 (green), the *C. elegans* homolog of GABARAP. (B) Transmission electron microscopy image of muscle cells showing regular mitochondria (m) and a stressed-mitochondria containing dark inclusions, engulfed by an autophagosome (yellow arrow).

and *pdr-1* mutants display no defect in PME (Lim et al., 2019). Probably, two parallel but independent mechanisms contribute to PME. One is dependent on ubiquitination of the OMM proteins and involves both proteasome and mitophagy, the other is ubiquitination-independent and involved FNDC-1, the orthologue of FUNDC1 (FUN14 domain containing 1) (Lim et al., 2019). The paternal mitochondria ubiquitination triggers the recruitment of the mitophagy receptor ALLO-1, which upon phosphorylation by the IKKE-1 kinase interacts with LGG-1, via a LIR domain, and participates to the formation of autophagosome around the paternal mitochondria (Sato et al., 2018). An additional mitophagy receptor, the prohibitin PHB-2, is localized to the IMM and becomes accessible for allophagy following alteration of the OMM (Wei et al., 2017) (Fig. 5). The initial alteration of the OMM could be due to the OMMAD pathway because depletion of the two proteasomal subunits RPN-10 and RAD-23 affects PME (Molina et al., 2019a; Zhou et al., 2011).

Several studies reported differential functions for LGG-1 and LGG-2, the homologues of the mammalian GABARAP and LC3, respectively, during allophagy. After fertilization, they both localize in clusters

containing paternal mitochondria and MOs, which degradation is completed at the 8-cell stage (Al Rawi et al., 2011; Sato and Sato, 2011; Zhou et al., 2011). Genetic studies revealed that the allophagic clusters are completely abolished in *lgg-1* null mutant but persist for longer time in *lgg-2* mutants, due to a delay in the formation of autolysosome. These data illustrate that *lgg-1* is essential for autophagosome formation, whereas *lgg-2* has a role in autophagosome fusion with lysosome. Moreover, LGG-2 interacts with VPS-39, an Homotypic fusion and vacuole Protein Sorting (HOPS) complex subunit, to mediate the tethering and acidification of autophagosomes with lysosomes downstream of Rab5-Rab7 (Djeddi et al., 2015; Manil-Ségalen et al., 2014).

4.2. Mitophagy and iron metabolism

Several proteins of the mitochondrial electron transport chain need iron as a key element to accomplish their functions, and iron deregulation is often detrimental for mitochondria functions. Recently, a study on *C. elegans* identifies that the induction of mitophagy is part of an adaptive iron starvation response induced as a protective mechanism against mitochondrial stress (Schiavi et al., 2015a). Mitochondrial respiration is dependent of iron-sulfur (Fe-S) clusters, which biosynthesis is stimulated by the mitochondrial protein Frataxin (FXN) (Gervason et al., 2019). Mutations of *fxn* result in dysfunctions of the respiratory chain and lead to multiple symptoms observed in Friedreich's ataxia. In *C. elegans*, the moderate depletion using RNAi, of FXN homologue FRH-1, induces lifespan extension (Ventura and Rea, 2007). Interestingly, mitophagosome formation and mitophagy are induced in *frh-1* RNAi worms, and lifespan extension depends on PDR-1, PINK-1, DCT-1, as well as on the autophagy receptor p62/SQST-1. EM analysis of *frh-1* worms revealed the accumulation of electron-dense iron deposits within mitochondrial matrix, which is consistent with data in mouse (Puccio et al., 2001). *Frh-1* (RNAi) mimics a hypoxia state through cytosolic iron deprivation, which activates the hypoxia-inducible factors HIF-1 and AHA-1, to modulate longevity (Zhang et al., 2009). Moreover, *frh-1* RNAi can also upregulate the expression of *dct-1* and a series of globin genes, while it downregulates the expression of *sqst-1/p62*. Globin genes encode iron-containing proteins that regulate the cellular redox status in response to hypoxia (Hoogewijs et al., 2007). Upon iron deprivation, using the iron chelator 2,2'-dipyridyl, the worms present a mitophagy-dependent increased longevity, which overlaps the FRH-1 depletion phenotype.

Interestingly, *C. elegans* infection by *Pseudomonas aeruginosa* also induces an iron depletion-related mitophagy. Amongst the virulence factors produced by *P. aeruginosa*, siderophores, such as pyoverdinin, retrieve the iron from its host. Consequently, *C. elegans* infected by *P. aeruginosa* experiments an acute iron sequestration similar to the slight decrease of *frh-1* mRNA level. This iron sequestration induced a mitochondrial turnover through a protective mitophagy process. For example, *pink-1* and *pdr-1* depletion sensitize animals to *P. aeruginosa* (Kirienko et al., 2015) indicating that mitophagy is necessary for *C. elegans* resistance to the infection, which probably impairs mitochondrial function through iron chelation and damages mitochondria. Therefore, iron chelation-induced mitophagy eliminates damaged mitochondria to preserve energy homeostasis during this pathogen infection.

4.3. Dual effect of mitophagy on heteroplasmy maintenance

In most animals, mtDNA is maternally inherited and typically, individuals harbour a unique mtDNA genotype defining the homoplasmic state. However, germline and somatic mutations can lead to the coexistence of a mixture of mutant and normal mtDNA within the same individual, qualified as heteroplasmy and responsible of numerous human mitochondrial diseases (Wallace and Chalkia, 2013). Several *C. elegans* heteroplasmic strains have been isolated (Konrad et al., 2017; Tsang and Lemire, 2002). These stains combined with powerful novel

Box 1**Convergence of struggles to eliminate paternal mitochondria.**

Multiple mechanisms, depending on the animal, act before or just after fertilization during the early embryogenesis, to eliminate paternal mitochondria. Early work from Sutovsky and colleagues showed that paternal mitochondria are ubiquitinated for an efficient degradation mediated by proteasome in fertilized cow and monkey eggs (Sutovsky et al., 2000). Nishimura and colleagues then showed, in the fish medaka (*Oryzias latipes*), that the paternal mtDNA number is progressively reduced at the end of the spermatogenesis and then is specifically and progressively digested just after fertilization (Nishimura et al., 2006). In *Drosophila melanogaster*, sperm mtDNA is eliminated during spermatogenesis, by two mechanisms. The first one occurs at the elongation stage of postmeiotic sperm development, during which, mitochondrial nuclease, Endonuclease G (EndoG), eliminates only mtDNA rather than the complete mitochondria. Later on during spermatogenesis, the residual mtDNA is eliminated during spermatid individualization stage, through a cellular remodelling process that modify spermatid tail (DeLuca and O'Farrell, 2012). This mechanism is similar to the one observed in *C. elegans* whereby the endonuclease CPS-6 originally localized to the intermembrane space has access to the mtDNA, after rupture of the IMM by an unknown mechanism. This step seems to be important for the subsequent PME steps (Zhou et al., 2016). Moreover, an additional active mechanism exists also in drosophila eggs to get rid of paternal mitochondria (Politi et al., 2014). This mechanism uses non conventional autophagy and endocytic pathways to eliminate sperm mitochondria within the eggs even if these sperm mitochondria is devoid of DNA. Paternal mitochondria destruction (PMD) initiates with vesicles resembling MVB that put mitochondria into small fragments that are subsequently sequestered in autophagosomes that finally fuse with lysosomes. P62 and ubiquitination are involved but this mechanism is not Parkin dependent (Politi et al., 2014). In mice, the situation is debated. One report indicates that most motile sperm eliminate their mtDNA and leave only vacuolar mitochondria before fertilization. Then the sperm mitochondria persist until morula stage, even they are observed to colocalize with autophagy proteins p62 and LC3 just after fertilization. Nonetheless, their clearance is independent of autophagy pathway (Luo et al., 2013a,b). However, this conclusion is challenged by a functional analysis showing that paternal mitochondria are maintained in 60% of the embryos depleted for Parkin and Mul1. Therefore, the authors concluded that in mice, PMD required a Parkin and Mul1 dependent autophagy (Rojansky et al., 2016). Sutovsky and colleagues addressed the PME question in another vertebrate, the porcine zygote, and provided evidences for another type of active paternal mitochondria destruction mechanism. This mechanism is based on a P62/SQSTM1-dependent autophagy, VCP-mediated dislocation of ubiquitinated mitochondria protein and presentation to the 26S proteasome (Song et al., 2016). Overall, multiple different systems have been selected during the evolution to specifically eliminate paternal mitochondria in most animals suggesting that PME step is critical for the subsequent animal development.

technical possibilities such as purification of mitochondria from specific tissues (muscle, neuron, intestine, epidermis, gonad) even from a single worm make *C. elegans* a powerful model for studying mechanisms regulating heteroplasmy state maintenance (Ahier et al., 2018). The *C. elegans* heteroplasmic strain, harbouring a 3.1-kilobase deletion (*uadF5*) has twice mtDNA molecules compared to the wild type. Dissection of worms shows that *uadF5* content varies within tissues of individual worms (Liau et al., 2007). Interestingly, PDR-1/Parkin is required for maintaining low levels of *uadF5* mtDNA in *C. elegans* suggesting that this key protein involved in triggering mitophagy could have a beneficial role (Valenci et al., 2015). However, the mechanism underlying heteroplasmic status maintenance seems much more complicated. Two recent reports have shown that the heteroplasmic strain constitutively induces UPR^{mt}, which promotes proliferation of the *uadF5*. Interestingly, the loss of the UPR^{mt} transcription factor ATFS-1 facilitates mitophagy activity and induces a decrease of mtDNA copy-number (Gitschlag et al., 2016; Lin et al., 2016). The expression of an error prone mtDNA polymerase in *C. elegans* generates multiple mtDNA deletions with a variable heteroplasmic state, and displays multiple phenotype defects such as neuromuscular dysfunction. Surprisingly, a genetic screen to identify modulators of this mutator phenotype reveals the paradox that a reduced mitophagy may be beneficial for this worm (Haroon et al., 2018). Altogether, these reports point out a very complex implication of mitophagy in the regulation of the heteroplasmic state in *C. elegans*.

5. Mitophagy during aging and neurodegeneration in *C. elegans*

5.1. Mitophagy in aging and stress conditions

A recent work revealed a novel physiological role for mitophagy, which allows mitochondria clearance all along the aging process in *C. elegans* (Fig. 6). The progressive accumulation of the mitochondrial mass, observed during aging of the worm, could induced some persistent cell malfunctions and be responsible of the decline of health associated with aging (Palikaras et al., 2015). Interestingly, this phenotype is further enhanced when key autophagy gene or the mitophagy Pink/parkin pathway are depleted, demonstrating that the mitochondria homeostasis is partly modulated via mitophagy during aging. The

mitophagy receptor DCT-1 (DAF-16/FOXO Controlled, germline Tumour affecting-1), homologue of NIX/BNIP3L and BNIP3, is crucial during this process and its depletion results in the accumulation of abnormal mitochondria, similarly to *pdr-1* and *pink-1* animals. DCT-1 is localized at the OMM, and contains a LIR motif, which mediates its interaction with LGG-1 (Palikaras et al., 2015). The overexpression of DCT-1 allows worm to better adapt to various stressful condition such as heat shock, UV exposure and pharmacological treatment challenging mitochondria (FCCP, paraquat). The ubiquitination of the lysine 26 of DCT-1 increases upon mitophagy induction, in a PDR-1 and PINK-1-dependent manner and the three mutants are more sensitive to mitochondrial stress. DCT-1 participates with PINK-1 and PDR-1 to the extension of lifespan dependent on both the insulin pathway (*daf-2* mutant) and mitochondrial proteins (*clk-1* and *isp-1* mutants).

This study also showed that *dct-1* gene expression and mitophagy are both regulated by the transcription factor SKN-1, the homologue of the mammalian NRF2/NFE2L2. SKN-1 is activated under oxidative stress conditions (Ghose et al., 2013; Ploumi et al., 2017) and promotes mitochondrial biogenesis by up-regulating several mitochondria genes. SKN-1 depletion leads to the modification of mitochondrial morphology, an increase of cytoplasmic Ca²⁺ and a mitochondrial membrane depolarization and blocks DCT-1 mediated mitophagy. By coupling mitophagy and mitochondrial biogenesis, SKN-1 is a key player of a loop which regulation is important during the aging of animals (Fig. 6). Interestingly, an additional mechanism of control of mitophagy during aging in *C. elegans* relies on the specific interaction of two mRNAs, from *puf-8* and *mff-1* genes. MFF-1 is an OMM protein that recruits the key mitochondrial fission factor DRP-1 to mitochondria. In old adult worms, *puf-8* mRNA inhibits the translation of *mff-1* mRNA, decreasing the mitochondrial fission and also the mitophagy, which, ultimately results in the accumulation of altered mitochondria (D'Amico et al., 2019).

Finally, a recent report studied the involvement of mitophagy in *mev-1* mutants that are highly sensitive to environmental stresses. This study also demonstrates that the mitophagy genes *dct-1* and *pdr-1* but *pink-1* are required for *mev-1* to survive to heat shock (Civelek et al., 2019). This conclusion is further supported by results indicating that mitophagy deficient animals are more sensitive to the ultraviolet C radiation (Hartman et al., 2019).

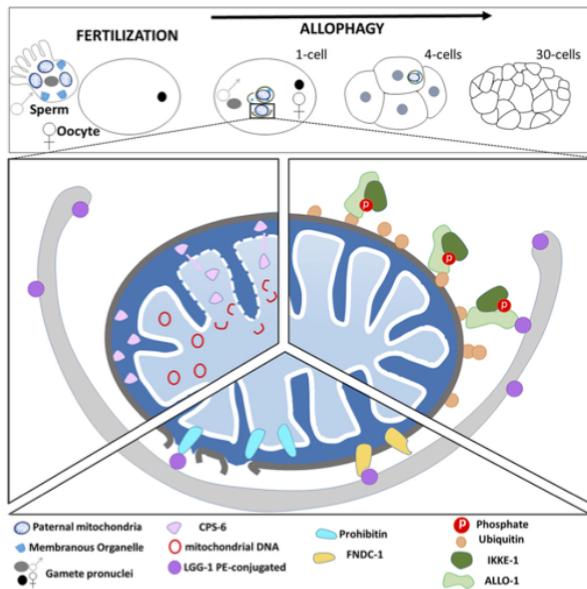


Fig. 5. Degradation of spermatozoid-inherited mitochondria by autophagy in *C. elegans*.

Three processes are involved in the degradation of paternal mitochondria during fertilization (see also Box 1). (Left) The internal membrane (IMM) breakdown occurs shortly after fertilization and causes the relocation of the endonuclease CPS-6 from the intermembrane space to the matrix of paternal mitochondria. CPS-6 catalytic activity triggers the degradation of paternal mitochondrial DNA (mtDNA) and promotes paternal mitochondrial elimination (PME) through autophagy. (Right) As soon as fertilization occurs, paternal mitochondria are further ubiquitinated, allowing the recognition and binding by the autophagy receptor ALLO-1. ALLO-1 interacts with the IKKE-1 kinase, which phosphorylates ALLO-1 and probably other substrates that could be present on mitochondria. Then ALLO-1 interacts with LGG-1 through its LIR domain to allow the formation of autophagosomes around paternal mitochondria. (Middle) Paternal mitochondria are also tagged by two specific mitophagy receptors, the outer mitochondrial membrane (OMM) protein FND-1 and the inner mitochondrial membrane protein, prohibitin PHB-2. After the depolarization and rupture of the OMM, which is dependent of the proteasome, PHB-2 is exposed to the cytosol and interacts with LGG-1.

Overall, these results indicate that mitophagy is a key cellular process that helps *C. elegans* to cope with stressful environmental context.

5.2. Pharmacological modulation of mitophagy protects from age-induced decline

Three molecules that specifically modulate mitophagy in *C. elegans* have been identified: Urolithin A (UA), tomatidine and nicotinamide adenine dinucleotide (NAD^+). UA, belongs organic compounds known as benzo-coumarins, is the first natural compound shown to induce mitophagy in worm as well in mammalian cells (Ryu et al., 2016). The UA precursor, ellagitannin, is found in multiple fruits and is processed in UA by the microbiota. UA can extend lifespan and improve worm fitness by inducing mitophagy. In young adult, UA treatment induces mitochondria fragmentation and leads to the reduction of mitochondrial content. The latter phenotype depends on the mitophagy genes *pink-1*, *dct-1*, *skr-1* or the autophagy genes *bec-1*, *sqst-1*, *vps-34*, which depletion inhibits the lifespan extension following UA exposure. Indeed, UA treatment induces autophagy, which is detected by the increased LGG-1 positive autophagosomes. In older worms, UA exposure leads to mitochondrial content increase and to a higher transcription rate of respiratory chain subunit genes, compared to control animals.

During the UA long-term treatment, the mitochondrial biogenesis is facilitated by the initial mitophagy induction observed in young adult. The enhanced mitochondrial biogenesis improves mitochondrial function through stabilizing ATP content and increasing the respiration capacity, and therefore leads to a prolonged locomotion and pharyngeal pumping activities of treated worms. Interestingly, this result suggest that UA is capable to uncouple mitophagy and mitochondrial biogenesis during aging; stimulating first mitophagy then mitochondrial biogenesis. Interestingly, most of the effects of UA on *C. elegans* are also observed in mammalian muscle and intestinal cells and, mice and rat aging models treated with UA show improvement of their muscle activity. This molecule shows a high potential to be used as a nutritional supplement to improve mitochondria function and muscle quality in human elderly people and clinical trials aiming to test the effect of UA on human health have been undertaken (Andreux et al., 2019).

Tomatidine is a steroid like compound enriched in unripe tomatoes. This molecule have beneficial effects in mouse cells for anti-inflammatory (Chiu and Lin, 2008) and anti-tumorigenic effects (Fujiwara et al., 2012). In mouse skeletal muscle cells, tomatidine promotes muscle fitness partially through increasing mitochondrial mass (Dyle et al., 2014). Interestingly, tomatidine treatment extends worm lifespan, as well as health span (Fang et al., 2017), as manifested by the improvement of swimming and pharyngeal pumping in aged animals. Interestingly, tomatidine induces moderate ROS production, which in turn activates SKN-1/Nrf-2 pathway. SKN-1, in turn, promotes PINK-1/DCT-1-dependent mitophagy and mitochondrial biogenesis to keep mitochondria healthy. Additionally, tomatidine action seems to be dependent on the key UPR^{mt} gene *atfs-1* and its beneficial effect has been further extended to primary rat cortical neurons and human HEK-203 cells (Fang et al., 2017). This study further provides experimental evidences indicating that somehow pharmacological treatment, activating mitophagy through SKN-1 pathway, may provide new approaches to improve healthy aging. It is highly possible that UA induced mitophagy and lifespan extension shares the same pathway triggered by tomatidine treatment.

NAD^+ is an important coenzyme linked to the cell energy homeostasis. It is part of the redox couple $NAD^+/NADH$, which provides the mitochondria respiratory chain with electrons and protons. NAD^+ is also a coenzyme for the nuclear deacetylase sirtuin 1 that modulates chromatin structure and regulates multiple cellular pathways including aging. In *C. elegans*, NAD^+ depletion inhibits mitophagy while its replenishment stimulates mitophagy by upregulating DCT-1 through the sirtuin homolog SIR-2.1 and DAF-16 dependent mechanism (Fang et al., 2017). Interestingly, it has been also shown that NAD^+ depletion is a major driver of the metabolic defects observed in the premature aging autosomal recessive disease Werner syndrome (WS). Both in WS model worm, *wrn-1* mutant, and in patient cells, a depletion of NAD^+ is associated with mitochondria dysfunction and defective mitophagy. The NAD^+ replenishment improves the mitochondrial function by restoring mitophagy in a DCT-1- and UNC-51 dependent mechanism (Fang et al., 2019a,b), which opens future therapeutic strategy for several diseases (Connell et al., 2019).

Overall, *C. elegans* has been a leading model organism to put forward drug that selectively modulate mitophagy and contribute to set up numerous pre-clinical and clinical trials aiming to analyse putative translation of these mitophagy inducers drug beneficial effect to human.

5.3. Mitophagy and neurodegenerative processes

Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD) and amyotrophic lateral sclerosis associated with frontotemporal dementia (ALS/FTD) are the major diseases that affect the functioning of the brain in the human population. These pathologies have currently no effective treatment and result in a progressive destruction of the nervous system leading to a loss of: memory, cognitive functions, sensory abilities,

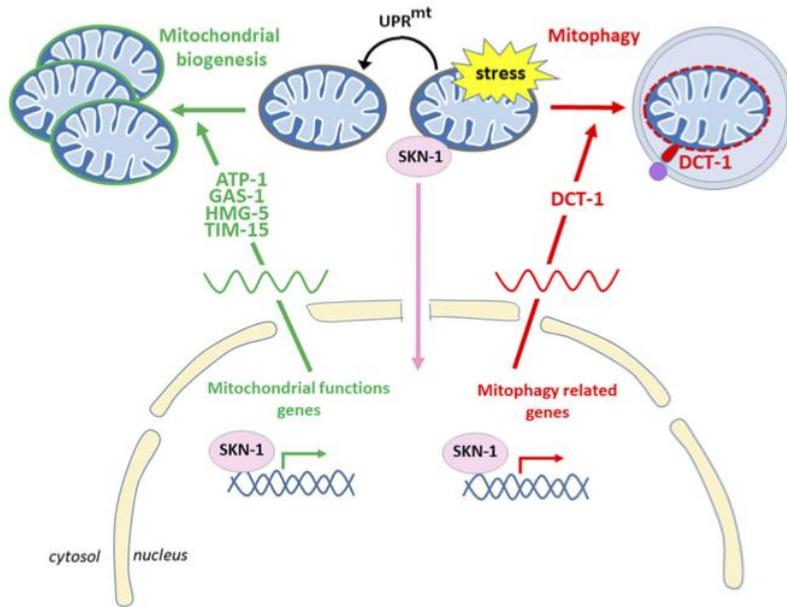


Fig. 6. SKN-1 coordinates mitochondrial biogenesis and mitophagy during *C. elegans* aging.

The mitochondrial homeostasis depends on the balance between mitochondrial biogenesis and degradation. In physiological condition, a basal mitophagy flux regulates the mitochondrial content. Mitochondrial damages result in the increase of cytosolic Ca^{2+} and ROS causing the releasing of several transcription factors, including SKN-1 (SKINhead-1). The mitochondrial quality control is first ensured by UPR^{mt} (Unfolded Protein Response in mitochondria), an adaptive transcriptional response that promotes protein refolding and mitochondrial recovery. When dysfunctions are persistent and the UPR^{mt} overwhelmed, elimination of the defective mitochondria occurs through mitophagy. The transcriptional factor SKN-1 promotes the activation of nuclear genes coding for mitochondrial proteins and mitophagy components, such as DCT-1 (Daf-16/ FOXO controlled germline tumor affecting-1) which is localized at the outer mitochondrial membrane and can interact with LGG-1 to mediate mitophagy.

speech and locomotion.

AD, PD and ALS/FTD share similar cellular dysfunctions regarding calcium homeostasis, lipid metabolism, energy production and recycling of cellular waste products, related to mitochondria and autophagy, and which are mostly linked to mitochondrial associated membranes function (Area-Gomez and Schon, 2017; Paillusson et al., 2016).

Several *C. elegans* models of neurodegenerative diseases have been used to challenge the possible causal link between these disease-associated gene mutations and nervous system dysfunctions (Alexander et al., 2014). The exploration of the link between mitophagy and neurodegeneration, in animal models of AD, indicates that conserved mitochondrial stress response signature emerges comprising UPR^{mt} and mitophagy pathways (Sorrentino et al., 2017). Mitophagy induction by NAD^+ boosting compound attenuates $\text{A}\beta$ toxicity in *C. elegans*. The stimulation of the UPR^{mt} and mitophagy can decrease protein aggregation, increase worm fitness and delays progression of symptoms. By adapting for neural expression the genetic tools for studying mitophagy (see section 4), a recent report provided additional evidences for mitophagy involvement in neurodegenerative diseases in *C. elegans* (Fang et al., 2019a,b). The treatment of worms with UA (see section 6) triggers a *dct-1*, *pink-1* and *pdr-1* dependant mitophagy flux in nerve cells without inducing bulk autophagy. The authors also tested the beneficial effect of mitophagy in two *C. elegans* models of AD, one with the pan-neuronal expression of the human $\text{A}\beta_{1-42}$ protein (Vogliss and Tavernarakis, 2008) and other with the neuronal expression of the pro-aggregant F3AK280 tau fragment (Fatouros et al., 2012). The pharmacological stimulation of mitophagy is beneficial for both models and restore the cognitive defects observed on learning and memory. A similar effect has been reported in mice model of AD, suggesting a conserved role of mitophagy in neurodegenerative diseases (Fang et al., 2019a,b).

Multiple *C. elegans* models of PD, including genetic and pharmacological induced models have been reported in the literature (Cooper and Van Raamsdonk, 2018). Mutations in parkin and Pink1 cause autosomal recessive form of PD and the depletion of both genes in *C. elegans* lead to accumulation of defective mitochondria. *pink-1* null mutant presents mitochondrial cristae defect both in muscle and neuron, as well as increased sensitivity to oxidative stresses and neuron dysfunction (Sämann et al., 2009). Surprisingly, the defects in *pink-1* mutant could be suppressed by depleting *lrk-1*, the homologue of LRRK2 which is associated with PD in human (Biskup et al., 2006). LRK-1 functions in

axonal-dendritic polarity of synaptic vesicles in neurons of *C. elegans* (Sakaguchi-Nakashima et al., 2007). LRK-1 and PINK-1 act antagonistically in neurite outgrowth, suggesting that the mitophagy defect in *pink-1* mutant could affect neuron outgrowth defect. Finally, patients with ALS/FTD accumulate TDP-43 (Tar DNA-binding protein 43) in degenerating neuron (Neumann et al., 2006). Interestingly, knockdown of TDP-43 enhances autophagosome and lysosome biogenesis indicating somehow a link between ALS/FTD and autophagy. (Xia et al., 2016). When overexpressed in the *C. elegans* nervous system, the human TDP-43 protein accumulates in the nucleus and results in an uncoordinated locomotion associated with abnormal synapse structure (Ash et al., 2010). The full exploitation of these worm models regarding any defect in mitophagy and the implication on ALS/FTD is still pending.

6. CONCLUSION

Recent researches performed with the nematode *C. elegans* have clearly contributed to the better understanding of the molecular mechanisms of mitophagy and its physiological roles at the scale of a whole animal. The most representative inputs from these studies concerns the fields of developmental biology, aging, adaptation to stress and neurodegenerative pathologies.

Studies in *C. elegans* revealed that the maternal restricted transmission of mtDNA requires the selective elimination of paternal mitochondria by mitophagy and led to the identification of an original mechanism that is independent of Pink/parkin and relies on the mitophagy receptor ALLO-1. These data, supported by studies in the model *Drosophila melanogaster* paved the way for understanding this essential question in mammals (see Box 1). Additionally, the worm *C. elegans* provided the first clue on a regulatory mechanism that coordinates mitochondrial biogenesis and mitophagy during aging and involved the master regulator SKN-1. It also contributed to demonstrate that an inner membrane protein, Prohibitin 2, could act as a mitophagy receptor (Wei et al., 2017), and to identify the links between iron deficiency and mitophagy (Schiavi et al., 2015a). Finally, *C. elegans* studies have been important to better understand the relationships between neurodegenerative diseases and mitophagy and allowed to test and validate novel molecules that could be further developed as therapeutics to enhance mitophagy and improve healthy aging.

Several technological improvements for studying mitophagy and

mitochondrial biogenesis have been possible using *C. elegans*, taking advantage of its transparency to developed the fluorescent biomarkers Rosella (Palikaras et al., 2015) and MitoTimer (Laker et al., 2014; Terskikh et al., 2000a). The power of genetic approaches and engineering of transgenic nematodes using molecular biology approaches strongly suggests that additional live-imaging tools will appear soon in *C. elegans*. Nevertheless, the mitochondrial degradation *per se* often lacks clear experimental demonstration in *C. elegans*, and would strongly benefit of the development of biochemical tools for the quantification of the delivery/ degradation of mitochondrial cargos into the lysosome (Chapin et al., 2015).

One can expect that in the near future, studies in *C. elegans* will bring new insights on molecular mechanism controlling mitophagy, and identify the roles for mitophagy in many biological processes. The important question of the basal mitophagy is particularly difficult to address, which explains why most of the studies that identified the mitophagy mechanisms are generally done in the context of a massive and non-physiological stress of the mitochondria. *C. elegans* could be useful to identify whether the signalling events, the mitophagy receptors and the regulation of the basal mitophagy are different from the developmental or pathological processes. By the simplicity of its anatomy and the presence of multiple tissues, *C. elegans* is also a powerful system to decipher the variations of autophagy/mitophagy functions between organs and during the whole life cycle. Neurology and aging pathologies are one obvious target but the differentiation and physiology of other cell types could be studied as well as trans-differentiation processes that have been described in the nematode. *C. elegans* could also open the study of autophagy/mitophagy in very complex biological processes such as circadian rhythm, the sleep-like state lethargus or very long starvation survival period.

Finally, another key point in the field of mitophagy is to understand the mechanisms of cooperation and coordination between the various mitochondria quality control pathways. How UPR^{mt}, mitophagy, proteasome and other processes like the exophers jettison (Melentijevic et al., 2017) are globally regulated to cope with a dysfunctional mitochondria network remains unclear and *C. elegans* could be useful to address such a question.

Funding source and acknowledgements

Our apologies to authors whose works have not been cited due to space restriction. We would like to thank Céline Largeau for the electron microscopy image. YC and RoL are supported by fellowships from the “China Scholarships Council” and the Fondation pour la Recherche Médicale (ECO20170637554), respectively. Work in ReL team is supported by the Fondation ARC (SFI20111203826), la Ligue Contre le Cancer (5FI13659TYKB).

Reference

- Ahier, A., Dai, C.-Y., Tweedie, A., Bezawork-Geleta, A., Kirmes, I., Zuryn, S., 2018. Affinity purification of cell-specific mitochondria from whole animals resolves patterns of genetic mosaicism. *Nat. Cell Biol.* 20, 352–360. <https://doi.org/10.1038/s41556-017-0023-x>.
- Al Rawi, S., Louvet-Vallée, S., Djeddi, A., Sachse, M., Culetto, E., Hajjar, C., Boyd, L., Legouis, R., Galy, V., 2011. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science* 334, 1144–1147. <https://doi.org/10.1126/science.1211878>.
- Alemu, E.A., Lamark, T., Torgersen, K.M., Birgisdottir, A.B., Larsen, K.B., Jain, A., Olsvik, H., Øvervatn, A., Kirkin, V., Johansen, T., 2012. ATG8 Family Proteins Act as Scaffolds for Assembly of the ULK Complex: sequence requirements for LC3-interacting region (LIR) motifs. *Journal of Biological Chemistry* 287, 39275–39290. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.378109>.
- Alexander, A.G., Marfil, V., Li, C., 2014. Use of *Caenorhabditis elegans* as a model to study Alzheimer's disease and other neurodegenerative diseases. *Front Genet* 5, 279. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00279>.
- Alston, C.L., Rocha, M.C., Lax, N.Z., Turnbull, D.M., Taylor, R.W., 2017. The genetics and pathology of mitochondrial disease. *J. Pathol.* 241, 236–250. <https://doi.org/10.1002/path.4809>.
- Andreux, P.A., Blanco-Bose, W., Ryu, D., Burdet, F., Ibberson, M., Aebischer, P., Auwerx, J., Singh, A., Rinsch, C., 2019. The mitophagy activator urolithin A is safe and induces a molecular signature of improved mitochondrial and cellular health in humans. *Nat Metab* 1, 595–603. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0073-4>.
- Area-Gomez, E., Schon, E.A., 2017. On the Pathogenesis of Alzheimer's Disease: The MAM Hypothesis. *FASEB J.* 31, 864–867. <https://doi.org/10.1096/fj.201601309>.
- Ash, P.E.A., Zhang, Y.-J., Roberts, C.M., Saldi, T., Hutter, H., Buratti, E., Petrucelli, L., Link, C.D., 2010. Neurotoxic effects of TDP-43 overexpression in *C. elegans*. *Hum. Mol. Genet.* 19, 3206–3218. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddq230>.
- Bhujabal, Z., Birgisdottir, A.B., Sjøttem, E., Brenne, H.B., Øvervatn, A., Habisov, S., Kirkin, V., Lamark, T., Johansen, T., 2017. FKBPP recruits LC3A to mediate Parkin-independent mitophagy. *EMBO Rep* 18, 947–961. <https://doi.org/10.15252/embr.201643147>.
- Birky, C.W., 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annu. Rev. Genet.* 35, 125–148. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090231>.
- Biskup, S., Moore, D.J., Celsi, F., Higashi, S., West, A.B., Andradi, S.A., Kurkinen, K., Yu, S.-W., Savitt, J.M., Waldvogel, H.J., Faull, R.L.M., Emson, P.C., Torp, R., Ottersen, O.P., Dawson, T.M., Dawson, V.L., 2006. Localization of LRRK2 to membranous and vesicular structures in mammalian brain. *Ann. Neurol.* 60, 557–569. <https://doi.org/10.1002/ana.21019>.
- Bock, F.J., Tait, S.W.G., 2019. Mitochondria as multifaceted regulators of cell death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* <https://doi.org/10.1038/s41580-019-0173-8>.
- Boya, P., Reggiori, F., Codogno, P., 2013. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nat. Cell Biol.* 15, 713–720. <https://doi.org/10.1038/ncb2788>.
- Chapin, H.C., Okada, M., Merz, A.J., Miller, D.L., 2015. Tissue-specific autophagy responses to aging and stress in *C. elegans*. *Aging (Albany NY)* 7, 419–432.
- Chen, Y., Scarcelli, V., Legouis, R., 2017. Approaches for Studying Autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Cells* 6. <https://doi.org/10.3390/cells6030027>.
- Chiu, F.-L., Lin, J.-K., 2008. Tomatidine inhibits iNOS and COX-2 through suppression of NF-kappaB and JNK pathways in LPS-stimulated mouse macrophages. *FEBS Lett.* 582, 2407–2412. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2008.05.049>.
- Chu, C.T., Ji, J., Dagda, R.K., Jiang, J.F., Tyurin, Y.Y., Kapralov, A.A., Tyurin, V.A., Yanamala, N., Shrivastava, I.H., Mohamadyani, D., Wang, K.Z.Q., Zhu, J., Klein-Seetharaman, J., Balasubramanian, K., Amoscatto, A.A., Borisenko, G., Huang, Z., Gusdon, A.M., Cheikhi, A., Steer, E.K., Wang, R., Baty, C., Watkins, S., Bahar, I., Bayir, H., Kagan, V.E., 2013. Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat. Cell Biol.* 15, 1197–1205. <https://doi.org/10.1038/ncb2837>.
- Civelek, M., Mehrkens, J.-F., Carstens, N.-M., Fitzenberger, E., Wenzel, U., 2019. Inhibition of mitophagy decreases survival of *Caenorhabditis elegans* by increasing protein aggregation. *Mol. Cell. Biochem.* 452, 123–131. <https://doi.org/10.1007/s11010-018-3418-5>.
- Connell, N.J., Houtkooper, R.H., Schrauwen, P., 2019. NAD⁺ metabolism as a target for metabolic health: have we found the silver bullet? *Diabetologia* 62, 888–899. <https://doi.org/10.1007/s00125-019-4831-3>.
- Cooper, J.F., Van Raamsdonk, J.M., 2018. Modeling Parkinson's Disease in *C. elegans*. *J. Parkinsons Dis* 8, 17–32. <https://doi.org/10.3233/JPD-171258>.
- Dalle Pezze, P., Karanasios, E., Kandia, V., Manifava, M., Walker, S.A., Gambardella Le Novère, N., Ktistakis, N.T., 2020. ATG13 dynamics in nonselective autophagy and mitophagy: insights from live imaging studies and mathematical modeling. *Autophagy* 1–11. <https://doi.org/10.1080/15548627.2020.1749401>.
- D'Amico, D., Mottis, A., Potenza, F., Sorrentino, V., Li, H., Romani, M., Lemos, V., Schoonjans, K., Zamboni, N., Knott, G., Schneider, B.L., Auwerx, J., 2019. The RNA-Binding Protein PUM2 Impairs Mitochondrial Dynamics and Mitophagy During Aging. *Mol. Cell* 73, 775–787. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.034>. e10.
- De Duve, C., 1963. The lysosome. *Sci. Am.* 208, 64–72. <https://doi.org/10.1038/scientificamerican0563-64>.
- DeLuca, S.Z., O'Farrell, P.H., 2012. Barriers to male transmission of mitochondrial DNA in sperm development. *Dev. Cell* 22, 660–668. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2011.12.021>.
- Dice, J.F., 1990. Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends Biochem. Sci.* 15, 305–309. [https://doi.org/10.1016/0968-0004\(90\)90019-8](https://doi.org/10.1016/0968-0004(90)90019-8).
- Djeddi, A., Al Rawi, S., Deuve, J.L., Perrois, C., Liu, Y.-Y., Russeau, M., Sachse, M., Galy, V., 2015. Sperm-inherited organelle clearance in *C. elegans* relies on LC3-dependent autophagosome targeting to the pericentrosomal area. *Development* 142, 1705–1716. <https://doi.org/10.1242/dev.117879>.
- Dyle, M.C., Ebert, S.M., Cook, D.P., Kunkel, S.D., Fox, D.K., Bongers, K.S., Bullard, S.A., Dierdorff, J.M., Adams, C.M., 2014. Systems-based discovery of tomatidine as a natural small molecule inhibitor of skeletal muscle atrophy. *J. Biol. Chem.* 289, 14913–14924. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.556241>.
- Eskelinen, E.-L., Cuervo, A.M., Taylor, M.R.G., Nishino, I., Blum, J.S., Dice, J.F., Sandoval, I.V., Lippincott-Schwartz, J., August, J.T., Saftig, P., 2005. Unifying nomenclature for the isoforms of the lysosomal membrane protein LAMP-2. *Traffic* 6, 1058–1061. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0854.2005.00337.x>.
- Fang, E.F., Hou, Y., Lautrup, S., Jensen, M.B., Yang, B., SenGupta, T., Caponio, D., Khezri, R., Demarest, T.G., Aman, Y., Figueroa, D., Morevati, M., Lee, H.-J., Kato, H., Kassahun, H., Lee, J.-H., Filippelli, D., Okur, M.N., Mangerich, A., Croteau, D.L., Maezawa, Y., Lyssiotis, C.A., Tao, J., Yokote, K., Rusten, T.E., Mattson, M.P., Jasper, H., Nilsen, H., Bohr, V.A., 2019a. NAD⁺ augmentation restores mitophagy and limits accelerated aging in Werner syndrome. *Nat Commun* 10, 5284. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-13172-8>.
- Fang, E.F., Hou, Y., Palikaras, K., Adriaanse, B.A., Kerr, J.S., Yang, B., Lautrup, S., Hasan-Olive, M.M., Caponio, D., Dan, X., Rocktäschel, P., Croteau, D.L., Akbari, M., Greig, N.H., Fladby, T., Nilsen, H., Cader, M.Z., Mattson, M.P., Tavernarakis, N., Bohr, V.A., 2019b. Mitophagy inhibits amyloid-β and tau pathology and reverses cognitive

- deficits in models of Alzheimer's disease. *Nat. Neurosci.* 22, 401–412. <https://doi.org/10.1038/s41593-018-0332-9>.
- Fang, E.F., Waltz, T.B., Kassahun, H., Lu, Q., Kerr, J.S., Morevati, M., Fivenson, E.M., Wollman, B.N., Marosi, K., Wilson, M.A., Iser, W.B., Eckley, D.M., Zhang, Y., Lehmann, E., Goldberg, I.G., Scheibye-Knudsen, M., Mattson, M.P., Nilsen, H., Bohr, V.A., Becker, K.G., 2017. Tomatidine enhances lifespan and healthspan in *C. elegans* through mitophagy induction via the SKN-1/Nrf2 pathway. *Sci Rep* 7. <https://doi.org/10.1038/srep46208>.
- Fatouros, C., Pir, G.J., Biernat, J., Koushika, S.P., Mandelkow, E., Mandelkow, E.-M., Schmidt, E., Baumeister, R., 2012. Inhibition of tau aggregation in a novel *Caenorhabditis elegans* model of tauopathy mitigates proteotoxicity. *Hum. Mol. Genet.* 21, 3587–3603. <https://doi.org/10.1093/hmg/dds190>.
- Fujiwara, Y., Kiyota, N., Tsurushima, K., Yoshitomi, M., Horlad, H., Ikeda, T., Nohara, T., Takeya, M., Nagai, R., 2012. Tomatidine, a tomato sapogenol, ameliorates hyperlipidemia and atherosclerosis in apoE-deficient mice by inhibiting acyl-CoA:cholesterol acyl-transferase (ACAT). *J. Agric. Food Chem.* 60, 2472–2479. <https://doi.org/10.1021/jf204197r>.
- Galluzzi, L., Baehrecke, E.H., Ballabio, A., Boya, P., Bravo-San Pedro, J.M., Cecconi, F., Choi, A.M., Chu, C.T., Codogno, P., Colombo, M.L., Cuervo, A.M., Debnath, J., Deretic, V., Dikic, I., Eskelinen, E., Fimia, G.M., Fulda, S., Gewirtz, D.A., Green, D.R., Hansen, M., Harper, J.W., Jäättelä, M., Johansen, T., Juhasz, G., Kimmelman, A.C., Kraft, C., Kistakis, N.T., Kumar, S., Levine, B., Lopez-Otin, C., Madeo, F., Martens, S., Martínez, J., Melendez, A., Mizushima, N., Münz, C., Murphy, L.O., Penninger, J.M., Piacentini, M., Reggiori, F., Rubinsztein, D.C., Ryan, K.M., Santambrogio, L., Scorrano, L., Simon, A.K., Simon, H., Simonsen, A., Tavernarakis, N., Tooze, S.A., Yoshimori, T., Yuan, J., Yue, Z., Zhong, Q., Kroemer, G., 2017. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J* 36, 1811–1836. <https://doi.org/10.15252/embj.201796697>.
- Geisler, S., Holmström, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J., Springer, W., 2010. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nat. Cell Biol.* 12, 119–131. <https://doi.org/10.1038/ncb2012>.
- Gervason, S., Larkem, D., Mansour, A.B., Botzanowski, T., Müller, C.S., Pecqueur, L., Le Pavec, G., Delaunay-Moisan, A., Brun, O., Agramunt, J., Grandas, A., Fontecave, M., Schünemann, V., Cianféran, S., Sizun, C., Tolédano, M.B., D'Autrèaux, B., 2019. Physiologically relevant reconstitution of iron-sulfur cluster biosynthesis uncovers persulfide-processing functions of ferredoxin-2 and frataxin. *Nat. Commun.* 10, 3566. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11470-9>.
- Ghose, P., Park, E.C., Tabakin, A., Salazar-Vasquez, N., Rongo, C., 2013. Anoxia-reoxygenation regulates mitochondrial dynamics through the hypoxia response pathway, SKN-1/Nrf, and stomatin-like protein STL-1/SLP-2. *PLoS Genet.* 9, e1004063. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004063>.
- Gitschlag, B.L., Kirby, C.S., Samuels, D.C., Gangula, R.D., Mallal, S.A., Patel, M.R., 2016. Homeostatic Responses Regulate Selfish Mitochondrial Genome Dynamics in *C. elegans*. *Cell Metab.* 24, 91–103. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2016.06.008>.
- Grivell, L.A., 1995. Nucleo-mitochondrial interactions in mitochondrial gene expression. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 30, 121–164. <https://doi.org/10.3109/10409239509085141>.
- Hall, C.N., Klein-Flügge, M.C., Howarth, C., Attwell, D., 2012. Oxidative phosphorylation, not glycolysis, powers presynaptic and postsynaptic mechanisms underlying brain information processing. *J. Neurosci.* 32, 8940–8951. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0026-12.2012>.
- Hammerling, B.C., Najor, R.H., Cortez, M.Q., Shires, S.E., Leon, L.J., Gonzalez, E.R., Boassa, D., Phan, S., Thor, A., Jimenez, R.E., Li, H., Kitis, R.N., Dorn, G.W., Sadoshima, J., Ellisman, M.H., Gustafsson, Å.B., 2017. A Rab5 endosomal pathway mediates Parkin-dependent mitochondrial clearance. *Nat. Commun.* 8, 14050. <https://doi.org/10.1038/ncomms14050>.
- Hammerling, U., 2016. Retinol as electron carrier in redox signaling, a new frontier in vitamin A research. *Hepatobiliary Surg Nutr* 5, 15–28. <https://doi.org/10.3978/j.issn.2304-3881.2016.01.02>.
- Hanna, R.A., Quinsay, M.N., Orogo, A.M., Giang, K., Rikka, S., Gustafsson, Å.B., 2012. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *J. Biol. Chem.* 287, 19094–19104. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.322933>.
- Haroon, S., Li, A., Weinert, J.L., Fritsch, C., Ericson, N.G., Alexander-Floyd, J., Braeckman, B.P., Haynes, C.M., Bielas, J.H., Gidalevitz, T., Vermulst, M., 2018. Multiple Molecular Mechanisms Rescue mtDNA Disease in *C. elegans*. *Cell Rep* 22, 3115–3125. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2018.02.099>.
- Hartman, J.H., Gonzalez-Hunt, C., Hall, S.M., Ryde, I.T., Caldwell, K.A., Caldwell, G.A., Meyer, J.N., 2019. Genetic Defects in Mitochondrial Dynamics in *Caenorhabditis elegans* Impact Ultraviolet C Radiation- and 6-hydroxydopamine-Induced Neurodegeneration. *Int. J. Mol. Sci.* 20. <https://doi.org/10.3390/ijms20133202>.
- Hollville, E., Carroll, R.G., Cullen, S.P., Martin, S.J., 2014. Bcl-2 family proteins participate in mitochondrial quality control by regulating Parkin/PINK1-dependent mitophagy. *Mol. Cell* 55, 451–466. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2014.06.001>.
- Hoogewijs, D., Terwilliger, N.B., Webster, K.A., Powell-Coffman, J.A., Tokishita, S., Yamagata, H., Hankeln, T., Burmester, T., Rytönen, K.T., Nikinmaa, M., Abele, D., Heise, K., Lucassen, M., Fandrey, J., Maxwell, P.H., Pählman, S., Gorr, T.A., 2007. From critics to cancers: bridging comparative and clinical research on oxygen sensing, HIF signaling, and adaptations towards hypoxia. *Integr. Comp. Biol.* 47, 552–577. <https://doi.org/10.1093/icb/icm072>.
- Itakura, E., Kishi-Itakura, C., Koyama-Honda, I., Mizushima, N., 2012. Structures containing Atg9A and the ULK1 complex independently target depolarized mitochondria at initial stages of Parkin-mediated mitophagy. *J. Cell. Sci.* 125, 1488–1499. <https://doi.org/10.1242/jcs.094110>.
- Kaushik, S., Cuervo, A.M., 2018. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19, 365–381. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0001-6>.
- Kawajiri, S., Saiki, S., Sato, S., Sato, F., Hatano, T., Eguchi, H., Hattori, N., 2010. PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy. *FEBS Lett* 584, 1073–1079. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2010.02.016>.
- Kirienko, N.V., Ausubel, F.M., Ruvkun, G., 2015. Mitophagy confers resistance to siderophore-mediated killing by *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, 1821–1826. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424954112>.
- Kissová, I., Deffieu, M., Manon, S., Camougrand, N., 2004. Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 39068–39074. <https://doi.org/10.1074/jbc.M406960200>.
- 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. <https://doi.org/10.4161/auto.4034>.
- Komatsu, M., Ichimura, Y., 2010. Selective autophagy regulates various cellular functions. *Genes Cells* 15, 923–933. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2443.2010.01433.x>.
- Konrad, A., Thompson, O., Waterston, R.H., Moerman, D.G., Keightley, P.D., Berghorsson, U., Katju, V., 2017. Mitochondrial Mutation Rate, Spectrum and Heteroplasmy in *Caenorhabditis elegans* Spontaneous Mutation Accumulation Lines of Differing Population Size. *Mol. Biol. Evol.* 34, 1319–1334. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx051>.
- Kraft, C., Kijanska, M., Kalie, E., Siergiejuk, E., Lee, S.S., Semplicio, G., Stoffel, I., Brezovich, A., Verma, M., Hansmann, I., Ammerer, G., Hofmann, K., Tooze, S., Peter, M., 2012. Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy: Regulation of Atg1 kinase function. *The EMBO Journal* 31, 3691–3703. <https://doi.org/10.1038/emboj.2012.225>.
- Laker, R.C., Xu, P., Ryall, K.A., Sujkowski, A., Kenwood, B.M., Chain, K.H., Zhang, M., Royal, M.A., Hoehn, K.L., Driscoll, M., Adler, P.N., Wessells, R.J., Saucerman, J.J., Yan, Z., 2014. A novel MitoTimer reporter gene for mitochondrial control, structure, stress, and damage in vivo. *J. Biol. Chem.* 289, 12005–12015. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.530527>.
- Largeau, C., Legouis, R., 2019. Correlative Light and Electron Microscopy to Analyze LC3 Proteins in *Caenorhabditis elegans* Embryo. *Methods Mol. Biol.* 1880, 281–293. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8873-0-18>.
- Lemasters, J.J., 2005. Selective mitochondrial autophagy, or mitophagy, as a targeted defense against oxidative stress, mitochondrial dysfunction, and aging. *Rejuvenation Res* 8, 3–5. <https://doi.org/10.1089/rej.2005.8.3>.
- Liau, W.-S., Gonzalez-Serricchio, A.S., Deshommes, C., Chin, K., LaMunyon, C.W., 2007. A persistent mitochondrial deletion reduces fitness and sperm performance in heteroplasmic populations of *C. elegans*. *BMC Genet.* 8, 8. <https://doi.org/10.1186/1471-2156-8-8>.
- Lim, Y., Rubio-Peña, K., Sobraske, P.J., Molina, P.A., Brookes, P.S., Galy, V., Nehrke, K., 2019. Fndc-1 contributes to paternal mitochondria elimination in *C. elegans*. *Dev. Biol.* 454, 15–20. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.06.016>.
- Lin, Y.-F., Schulz, A.M., Pellegrino, M.W., Lu, Y., Shaham, S., Haynes, C.M., 2016. Maintenance and propagation of a deleterious mitochondrial genome by the mitochondrial unfolded protein response. *Nature* 533, 416–419. <https://doi.org/10.1038/nature17989>.
- Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., Huang, L., Xue, P., Li, B., Wang, X., Jin, H., Wang, J., Yang, F., Liu, P., Zhu, Y., Sui, S., Chen, Q., 2012. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat. Cell Biol.* 14, 177–185. <https://doi.org/10.1038/ncb2422>.
- Luo, S., Valencia, C.A., Zhang, J., Lee, N.-C., Slone, J., Gui, B., Wang, X., Li, Z., Dell, S., Brown, J., Chen, S.M., Chien, Y.-H., Hwu, W.-L., Fan, P.-C., Wong, L.-J., Atwal, P.S., Huang, T., 2018. Biparental inheritance of Mitochondrial DNA in Humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 115, 13039–13044. <https://doi.org/10.1073/pnas.1810946115>.
- Luo, S.-M., Ge, Z.-J., Wang, Z.-W., Jiang, Z.-Z., Wang, Z.-B., Ouyang, Y.-C., Hou, Y., Schatten, H., Sun, Q.-Y., 2013a. Unique insights into mitochondrial inheritance in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 13038–13043. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303231110>.
- Luo, S.-M., Schatten, H., Sun, Q.-Y., 2013b. Sperm mitochondria in reproduction: good or bad and where do they go? *J. Genet. Genomics* 40, 549–556. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2013.08.004>.
- Majeski, A.E., Dice, J.F., 2004. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2435–2444. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.02.013>.
- Manil-Ségalen, M., Lefebvre, Christophe, Jenzer, C., Trichet, M., Boulogne, C., Satiat-Jaubert, B., Legouis, R., 2014. The *C. elegans* LC3 Acts Downstream of GABARAP to Degrade Autophagosomes by Interacting with the HOPS Subunit VPS39. *Developmental Cell* 28, 43–55. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.11.022>.
- Massey, A., Kiffin, R., Cuervo, A.M., 2004. Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 2420–2434. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.04.010>.
- Melber, A., Haynes, C.M., 2018. UPRmt regulation and output: a stress response mediated by mitochondrial-nuclear communication. *Cell Res.* 28, 281–295. <https://doi.org/10.1038/cr.2018.16>.
- Meléndez, A., Tallóczy, Z., Seaman, M., Eskelinen, E.-L., Hall, D.H., Levine, B., 2003. Autophagy genes are essential for dauer development and life-span extension in *C. elegans*. *Science* 301, 1387–1391. <https://doi.org/10.1126/science.1087782>.
- Melentijevic, I., Toth, M.L., Arnold, M.L., Guasp, R.J., Harinath, G., Nguyen, K.C., Taub, D., Parker, J.A., Neri, C., Gabel, C., Hall, D.H., Driscoll, M., 2017. *C. elegans* Neurons Jettison Protein Aggregates and Mitochondria Under Neurotoxic Stress. *Nature* 542, 367–371. <https://doi.org/10.1038/nature21362>.
- Molina, P., Lim, Y., Boyd, L., 2019a. Ubiquitination is required for the initial removal of paternal organelles in *C. elegans*. *Dev. Biol.* 453, 168–179. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2019.05.015>.
- Montava-Garriga, L., Ganley, I.G., 2019. Outstanding Questions in Mitophagy: What We Do and Do Not Know. *J. Mol. Biol.* <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.06.032>.

- Mukherjee, A., Patel, B., Koga, H., Cuervo, A.M., Jenny, A., 2016. Selective endosomal microautophagy is starvation-inducible in *Drosophila*. *Autophagy* 12, 1984–1999. <https://doi.org/10.1080/15548627.2016.1208887>.
- Murakawa, T., Yamaguchi, O., Hashimoto, A., Hikoso, S., Takeda, T., Oka, T., Yasui, H., Ueda, H., Akazawa, Y., Nakayama, H., Taneike, M., Misaka, T., Omiya, S., Shah, A.M., Yamamoto, A., Nishida, K., Ohsumi, Y., Okamoto, K., Sakata, Y., Otsu, K., 2015. Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nat Commun* 6, 7527. <https://doi.org/10.1038/ncomms8527>.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., Youle, R.J., 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* 183, 795–803. <https://doi.org/10.1083/jcb.200809125>.
- Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.-F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., Youle, R.J., 2010. PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* 8, e1000298. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000298>.
- Naresh, N.U., Haynes, C.M., 2019. Signaling and Regulation of the Mitochondrial Unfolded Protein Response. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 11. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a033944>.
- Nass, S., Nass, M.M., 1963. Intramitochondrial fibers with DNA characteristics. II. Enzymatic and other hydrolytic treatments. *J. Cell Biol.* 19, 613–629. <https://doi.org/10.1083/jcb.19.3.613>.
- Neumann, M., Sampathu, D.M., Kwong, L.K., Truax, A.C., Micsenyi, M.C., Chou, T.T., Bruce, J., Schuck, T., Grossman, M., Clark, C.M., McCluskey, L.F., Miller, B.L., Molloy, E., Mackenzie, I.R., Feldman, H., Feiden, W., Kretschmar, H.A., Trojanowski, J.Q., Lee, V.M.-Y., 2006. Ubiquitinated TDP-43 in frontotemporal lobar degeneration and amyotrophic lateral sclerosis. *Science* 314, 130–133. <https://doi.org/10.1126/science.1134108>.
- Nguyen, T.N., Padman, B.S., 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. *The Journal of Cell Biology* 215, 857–874. <https://doi.org/10.1083/jcb.201607039>.
- Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., Shimizu, S., 2009. Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. *Nature* 461, 654–658. <https://doi.org/10.1038/nature08455>.
- Nishimura, H., L'Hernault, S.W., 2017. Spermatogenesis. *Curr. Biol.* 27, R988–R994. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.07.067>.
- Nishimura, Y., Yoshinari, T., Naruse, K., Yamada, T., Sumi, K., Mitani, H., Higashiyama, T., Kuroiwa, T., 2006. Active digestion of sperm mitochondrial DNA in single living sperm revealed by optical tweezers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 1382–1387. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506911103>.
- Oku, M., Maeda, Y., Kagohashi, Y., Kondo, T., Yamada, M., Fujimoto, T., Sakai, Y., 2017. Evidence for ESCRT- and clathrin-dependent microautophagy. *J. Cell Biol.* 216, 3263–3274. <https://doi.org/10.1083/jcb.201611029>.
- Padman, B.S., Nguyen, T.N., Uosellis, L., Skulsupaisarn, M., Nguyen, L.K., Lazarou, M., 2019. LC3/GABARAPs drive ubiquitin-independent recruitment of Optineurin and NDP52 to amplify mitophagy. *Nat Commun* 10, 408. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08335-6>.
- Paillusson, S., Stoica, R., Gomez-Suaga, P., Lau, D.H.W., Mueller, S., Miller, T., Miller, C.C.J., 2016. There's Something Wrong with my MAM: the ER-Mitochondria Axis and Neurodegenerative Diseases. *Trends Neurosci.* 39, 146–157. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2016.01.008>.
- Palikaras, K., Lionaki, E., Tavernarakis, N., 2018. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat. Cell Biol.* 20, 1013–1022. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0176-2>.
- Palikaras, K., Lionaki, E., Tavernarakis, N., 2015. Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature* 521, 525–528. <https://doi.org/10.1038/nature14300>.
- Pickles, S., Vigié, P., Youle, R.J., 2018. Mitophagy and Quality Control Mechanisms in Mitochondrial Maintenance. *Curr. Biol.* 28, R170–R185. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.004>.
- Ploumi, C., Daskalaki, I., Tavernarakis, N., 2017. Mitochondrial biogenesis and clearance: a balancing act. *FEBS J* 284, 183–195. <https://doi.org/10.1111/febs.13820>.
- Politi, Y., Gal, L., Kalifa, Y., Ravid, L., Elazar, Z., Arama, E., 2014. Paternal mitochondrial destruction after fertilization is mediated by a common endocytic and autophagic pathway in *Drosophila*. *Dev. Cell* 29, 305–320. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.04.005>.
- Praefcke, G.J.K., McMahon, H.T., 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5, 133–147. <https://doi.org/10.1038/nrm1313>.
- Puccio, H., Simon, D., Cossée, M., Criqui-Filipe, P., Tiziano, F., Melki, J., Hindelang, C., Matyas, R., Rustin, P., Koenig, M., 2001. Mouse models for Friedreich ataxia exhibit cardiomyopathy, sensory nerve defect and Fe-S enzyme deficiency followed by intramitochondrial iron deposits. *Nat. Genet.* 27, 181–186. <https://doi.org/10.1038/84818>.
- Quinsay, M.N., Thomas, R.L., Lee, Y., Gustafsson, A.B., 2010. Bnip3-mediated mitochondrial autophagy is independent of the mitochondrial permeability transition pore. *Autophagy* 6, 855–862. <https://doi.org/10.4161/auto.6.7.13005>.
- Rojansky, R., Cha, M.-Y., Chan, D.C., 2016. Elimination of paternal mitochondria in mouse embryos occurs through autophagic degradation dependent on PARKIN and MUL1. *Elife* 5. <https://doi.org/10.7554/eLife.17896>.
- Rolland, S.G., 2014. How to analyze mitochondrial morphology in healthy cells and apoptotic cells in *Caenorhabditis elegans*. *Meth. Enzymol.* 544, 75–98. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417158-9.00004-2>.
- Rosado, C.J., Mijallica, D., Hatzinisiriou, I., Prescott, M., Devenish, R.J., 2008. Rosella: a fluorescent pH-biosensor for reporting vacuolar turnover of cytosol and organelles in yeast. *Autophagy* 4, 205–213. <https://doi.org/10.4161/auto.5331>.
- Ryu, D., Mouchiroud, L., Andreux, P.A., Katsyuba, E., Moullan, N., Nicolet-Dit-Félix, A.A., Williams, E.G., Jha, P., Lo Sasso, G., Huzard, D., Aebischer, P., Sandi, C., Rinsch, C., Auwerx, J., 2016. Urolithin A induces mitophagy and prolongs lifespan in *C. elegans* and increases muscle function in rodents. *Nat. Med.* 22, 879–888. <https://doi.org/10.1038/nm.4132>.
- Sagan, L., 1993. On the origin of mitosing cells. 1967. *J. NIH Res* 5, 65–72.
- Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C.C., Cannizzo, E.S., Scharf, B., Follenzi, A., Potalicchio, L., Nieves, E., Cuervo, A.M., Santambrogio, L., 2011. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. *Dev Cell* 20, 131–139. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.12.003>.
- Sakaguchi-Nakashima, A., Meir, J.Y., Jin, Y., Matsumoto, K., Hisamoto, N., 2007. LRK-1, a *C. elegans* PARK8-related kinase, regulates axonal-dendritic polarity of SV proteins. *Curr. Biol.* 17, 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2007.01.074>.
- Sakakibara, K., Eiyama, A., Suzuki, S.W., Sakoh-Nakatogawa, M., Okumura, N., Tani, M., Hashimoto, A., Nagumo, S., Kondo-Okamoto, N., Kondo-Kakuta, C., Asai, E., Kirisako, H., Nakatogawa, H., Kuge, O., Takao, T., Ohsumi, Y., Okamoto, K., 2015. Phospholipid methylation controls Atg32-mediated mitophagy and Atg8 recycling. *EMBO J.* 34, 2703–2719. <https://doi.org/10.1525/embj.201591440>.
- Sakamoto, T., Inoue, T., Otomo, Y., Yokomori, N., Ohno, M., Arai, H., Nakagawa, Y., 2012. Deficiency of cardiolipin synthase causes abnormal mitochondrial function and morphology in germ cells of *Caenorhabditis elegans*. *J. Biol. Chem.* 287, 4590–4601. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.314823>.
- Sämann, J., Hegermann, J., von Gromoff, E., Eimer, S., Baumeister, R., Schmidt, E., 2009. *Caenorhabditis elegans* LRK-1 and PINK-1 act antagonistically in stress response and neurite outgrowth. *J. Biol. Chem.* 284, 16482–16491. <https://doi.org/10.1074/jbc.M808255200>.
- Sato, M., Sato, K., 2011. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science* 334, 1141–1144. <https://doi.org/10.1126/science.1210333>.
- Sato, M., Sato, Katsuya, Tomura, K., Kosako, H., Sato, Ken, 2018. The autophagy receptor ALLO-1 and the IKKE-1 kinase control clearance of paternal mitochondria in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Cell Biol* 20, 81–91. <https://doi.org/10.1038/s41556-017-0008-9>.
- Schiavi, A., Maglioni, S., Palikaras, K., Shaik, A., Strappazon, F., Brinkmann, V., Torgovnick, A., Castelein, N., De Henau, S., Braeckman, B.P., Cecconi, F., Tavernarakis, N., Ventura, N., 2015a. Iron-Starvation-Induced Mitophagy Mediates Lifespan Extension upon Mitochondrial Stress in *C. elegans*. *Curr. Biol.* 25, 1810–1822. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2015.05.059>.
- Schweers, R.L., Zhang, J., Randall, M.S., Loyd, M.R., Li, W., Dorsey, F.C., Kundu, M., Opferman, J.T., Cleveland, J.L., Miller, J.L., Ney, P.A., 2007. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 19500–19505. <https://doi.org/10.1073/pnas.0708818104>.
- Shadel, G.S., Horvath, T.L., 2015. Mitochondrial ROS Signaling in Organismal Homeostasis. *Cell* 163, 560–569. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.10.001>.
- Song, W.-H., Yi, Y.-J., Sutovsky, M., Meyers, S., Sutovsky, P., 2016. Autophagy and ubiquitin-proteasome system contribute to sperm mitophagy after mammalian fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 113, E5261–E5270. <https://doi.org/10.1073/pnas.1605844113>.
- Sorrentino, V., Romani, M., Mouchiroud, L., Beck, J.S., Zhang, H., D'Amico, D., Moullan, N., Potenza, F., Schmid, A.W., Rietsch, S., Counts, S.E., Auwerx, J., 2017. Enhancing mitochondrial proteostasis reduces amyloid- β proteotoxicity. *Nature* 552, 187–193. <https://doi.org/10.1038/nature25143>.
- Soubannier, V., McLelland, G.-L., Zunino, R., Braschi, E., Ruppstein, P., Fon, E.A., McBride, H.M., 2012. A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes. *Curr. Biol.* 22, 135–141. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.11.057>.
- Strappazon, F., Cecconi, F., 2015. AMBRA1-induced mitophagy: A new mechanism to cope with cancer? *Mol Cell Oncol* 2. <https://doi.org/10.4161/23723556.2014.975647>.
- Strappazon, F., Nazio, F., Corrado, M., Cianfanelli, V., Romagnoli, A., Fimia, G.M., Campello, S., Nardacci, R., Piacentini, M., Campanella, M., Cecconi, F., 2015. AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death Differ* 22, 419–432. <https://doi.org/10.1038/cdd.2014.139>.
- Sugiura, A., McLelland, G.-L., Fon, E.A., McBride, H.M., 2014. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *EMBO J* 33, 2142–2156. <https://doi.org/10.15252/embj.201488104>.
- Summerhayes, I.C., Wong, D., Chen, L.B., 1983. Effect of microtubules and intermediate filaments on mitochondrial distribution. *J. Cell Sci.* 61, 87–105.
- Sun, T., Qiao, H., Pan, P.-Y., Chen, Y., Sheng, Z.-H., 2013. Motile axonal mitochondria contribute to the variability of presynaptic strength. *Cell Rep* 4, 413–419. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.06.040>.
- Sutovsky, P., Moreno, R.D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C., Schatten, G., 2000. Ubiquitinated sperm mitochondria, selective proteolysis, and the regulation of mitochondrial inheritance in mammalian embryos. *Biol. Reprod.* 63, 582–590. <https://doi.org/10.1095/biolreprod63.2.582>.
- Tan, E.H.N., Tang, B.L., 2019. Rab7a and Mitophagosome Formation. *Cells* 8. <https://doi.org/10.3390/cells8030224>.
- Tersikh, A., Fradkov, A., Ermakova, G., Zaraisky, A., Tan, P., Kajava, A.V., Zhao, X., Lukyanov, S., Matz, M., Kim, S., Weissman, I., Siebert, P., 2000a. Fluorescent timer[®]: protein that changes color with time. *Science* 290, 1585–1588. <https://doi.org/10.1126/science.290.5496.1585>.
- Thomas, B.J., Wight, I.E., Chou, W.Y.Y., Moreno, M., Dawson, T., Homayouni, A., Huang, H., Kim, H., Jia, H., Buland, J.R., Wambach, J.A., Cole, F.S., Pak, S.C., Silverman, G.A., Luke, C.J., 2019. CemOrange2 fusions facilitate multifluorophore subcellular

- imaging in *C. elegans*. PLoS ONE 14, e0214257. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0214257>.
- Tian, Y., Li, Z., Hu, W., Ren, H., Tian, E., Zhao, Y., Lu, Q., Huang, X., Yang, P., Li, X., Wang, X., Kovács, A.L., Yu, L., Zhang, H., 2010. *C. elegans* screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms. *Cell* 141, 1042–1055. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.04.034>.
- Tsang, W.Y., Lemire, B.D., 2002. Stable heteroplasmy but differential inheritance of a large mitochondrial DNA deletion in nematodes. *Biochem. Cell Biol.* 80, 645–654. <https://doi.org/10.1139/g02-135>.
- Tsukada, M., Ohsumi, Y., 1993. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* 333, 169–174. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(93\)80398-e](https://doi.org/10.1016/0014-5793(93)80398-e).
- Tuttle, D.L., Dunn, W.A., 1995. Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. *J. Cell. Sci.* 108 (Pt 1), 25–35.
- Tuttle, D.L., Lewin, A.S., Dunn, W.A., 1993. Selective autophagy of peroxisomes in methylotrophic yeasts. *Eur. J. Cell Biol.* 60, 283–290.
- Uytterhoeven, V., Lauwers, E., Maes, I., Miskiewicz, K., Melo, M.N., Swerts, J., Kuenen, S., Wittcox, R., Corthout, N., Marrink, S.-J., Munck, S., Verstreken, P., 2015. Hsc70-4 Deforms Membranes to Promote Synaptic Protein Turnover by Endosomal Microautophagy. *Neuron* 88, 735–748. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.10.012>.
- Valenci, L., Yonai, L., Bar-Yaacov, D., Mishmar, D., Ben-Zvi, A., 2015. Parkin modulates heteroplasmy of truncated mtDNA in *Caenorhabditis elegans*. *Mitochondrion* 20, 64–70. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2014.11.001>.
- van der Bliek, A.M., Shen, Q., Kawajiri, S., 2013. Mechanisms of Mitochondrial Fission and Fusion. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a011072>.
- Van Humbeeck, C., Cornelissen, T., Vandenbergh, W., 2011. Ambra1: A Parkin-binding protein involved in mitophagy. *Autophagy* 7, 1555–1556. <https://doi.org/10.4161/auto.7.12.17893>.
- Vargas, J.N.S., Wang, C., Bunker, E., Hao, L., Maric, D., Schiavo, G., Randow, F., Youle, R.J., 2019. Spatiotemporal Control of ULK1 Activation by NDP52 and TBK1 during Selective Autophagy. *Molecular Cell* 74, 347–362. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.010>.
- Veenhuis, M., Douma, A., Harder, W., Osumi, M., 1983. Degradation and turnover of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha* induced by selective inactivation of peroxisomal enzymes. *Arch. Microbiol.* 134, 193–203. <https://doi.org/10.1007/bf00407757>.
- Ventura, N., Rea, S.L., 2007. *Caenorhabditis elegans* mitochondrial mutants as an investigative tool to study human neurodegenerative diseases associated with mitochondrial dysfunction. *Biotechnol J* 2, 584–595. <https://doi.org/10.1002/biot.200600248>.
- Voglis, G., Tavernarakis, N., 2008. A synaptic DEG/ENaC ion channel mediates learning in *C. elegans* by facilitating dopamine signalling. *EMBO J.* 27, 3288–3299. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.252>.
- Wallace, D.C., Chalkia, D., 2013. Mitochondrial DNA genetics and the heteroplasmy conundrum in evolution and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 5, a021220. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a021220>.
- Wang, Y., Zhang, Y., Chen, L., Liang, Q., Yin, X.-M., Miao, L., Kang, B.-H., Xue, D., 2016. Kinetics and specificity of paternal mitochondrial elimination in *Caenorhabditis elegans*. *Nat Commun* 7, 12569. <https://doi.org/10.1038/ncomms12569>.
- Wei, Y., Chiang, W.-C., Sumpter, R., Mishra, P., Levine, B., 2017a. Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell* 168, 224–238. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.11.042>.
- Whang, M.I., Tavares, R.M., Benjamin, D.I., Kattah, M.G., Advincula, R., Nomura, D.K., Debnath, J., Malynn, B.A., Ma, A., 2017. The Ubiquitin Binding Protein TAX1BP1 Mediates Autophagosome Induction and the Metabolic Transition of Activated T Cells. *Immunity* 46, 405–420. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.018>.
- Xia, Q., Wang, H., Hao, Z., Fu, C., Hu, Q., Gao, F., Ren, H., Chen, D., Han, J., Ying, Z., Wang, G., 2016. TDP-43 loss of function increases TFEB activity and blocks autophagosome-lysosome fusion. *EMBO J.* 35, 121–142. <https://doi.org/10.15252/emboj.201591998>.
- Xu, S., Cherok, E., Das, S., Li, S., Roelofs, B.A., Ge, S.X., Polster, B.M., Boyman, L., Lederer, W.J., Wang, C., Karbowski, M., 2016. Mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 controls mitochondrial fission and cell sensitivity to stress-induced apoptosis through regulation of MID49 protein. *Mol. Biol. Cell* 27, 349–359. <https://doi.org/10.1091/mbc.E15-09-0678>.
- Yamano, K., Fogel, A.I., Wang, C., van der Bliek, A.M., Youle, R.J., 2014. Mitochondrial Rab GAPs govern autophagosome biogenesis during mitophagy. *Elife* 3, e01612. <https://doi.org/10.7554/eLife.01612>.
- Yokota, S., Himeno, M., Roth, J., Brada, D., Kato, K., 1993. Formation of autophagosomes during degradation of excess peroxisomes induced by di-(2-ethylhexyl)phthalate treatment. II. Immunocytochemical analysis of early and late autophagosomes. *Eur. J. Cell Biol.* 62, 372–383.
- Zachari, M., Gudmundsson, S.R., Li, Z., Manifava, M., Shah, R., Smith, M., Stronge, J., Karanasios, E., Piunti, C., Kishi-Itakura, C., Vihinen, H., Jokitalo, E., Guan, J.-L., Buss, F., Smith, A.M., Walker, S.A., Eskelinen, E.-L., Ktistakis, N.T., 2019. Selective Autophagy of Mitochondria on a Ubiquitin-Endoplasmic-Reticulum Platform. *Dev Cell* 50, 627–643. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2019.06.016>.
- Zhang, G., Lin, L., Qi, D., Zhang, H., 2017. The composition of a protein aggregate modulates the specificity and efficiency of its autophagic degradation. *Autophagy* 13, 1487–1495. <https://doi.org/10.1080/15548627.2017.1339843>.
- Zhang, Y., Shao, Z., Zhai, Z., Shen, C., Powell-Coffman, J.A., 2009. The HIF-1 hypoxia-inducible factor modulates lifespan in *C. elegans*. *PLoS ONE* 4, e6348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006348>.
- Zhou, Q., Li, H., Xue, D., 2011. Elimination of paternal mitochondria through the lysosomal degradation pathway in *C. elegans*. *Cell Res.* 21, 1662–1669. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.182>.
- Zhou, Q., Li, Haimin, Li, Hanzheng, Nakagawa, A., Lin, J.L.J., Lee, E.-S., Harry, B.L., Skeen-Gaar, R.R., Suehiro, Y., William, D., Mitani, S., Yuan, H.S., Kang, B.-H., Xue, D., 2016. Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. *Science* 353, 394–399. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4777>.

Problématique

A l'instar du membre fondateur de la classification des Ubl, l'ubiquitine, la protéine Atg8 possède une glycine C-terminale conservée permettant son ancrage au substrat. Cette capacité d'ancrage covalent à l'unité fonctionnelle de la macroautophagie, l'autophagosome, sert de marqueur de ce processus dégradatif depuis plusieurs décennies. Atg8 (Atg8-P) est premièrement clivée par une protéase, pour donner la forme mature cytosolique (Atg8.I) puis est conjuguée à la phosphatidylethanolamine (Atg8.II). Ce mécanisme de conjugaison est très bien caractérisé et est réversible. Cette protéine est connue comme jouant un rôle prépondérant et essentiel au cours du processus autophagique. Le nombre important de publications impliquant une fonction d'atg8 au cours du processus autophagique contraste avec le manque d'information sur les fonctions moléculaires précises de cette dernière. En effet, ce n'est que récemment que l'idée d'une multifonctionnalité d'Atg8 a été mise en avant au sein du processus mais les mécanismes moléculaires sous-jacents, et sa régulation sont mal compris.

On peut noter que la progression des connaissances n'est pas égale entre les modèles. La levure est un modèle de choix utilisé pour l'étude des partenaires moléculaires d'autant plus qu'une seule protéine Atg8 est exprimée, et a été montrée comme essentielle à la biogénèse des autophagosomes. A contrario, le modèle végétal est un peu moins exploité pour l'analyse des Atg8. Cela peut s'expliquer par la présence d'un grand nombre d'homologues, nombre qui peut également être très variant au sein du règne.

Malgré la présence de nombreux homologues d'atg8, le modèle cellulaire mammifère est aujourd'hui mis sur le devant de la scène pour l'analyse fonctionnelle de l'autophagie. En effet l'émergence de l'ingénierie CRISPR-Cas9 a permis de mettre en évidence pour la première fois des lignées cellulaires inactives pour les GABARAP, les LC3 ou les deux sous familles (Nguyen *et al.*, 2016). Les protéines LC3 et GABARAP ont des rôles redondants et spécifiques au cours du processus autophagique. Les protéines GABARAP sont importantes notamment pour les étapes précoces d'initiation et la fermeture des autophagosomes, étapes pour lesquelles les protéines LC3 sont dispensables. De surcroît, certaines études récentes de surexpression de protéines autophagiques non ancrées aux membranes (LC3120A et GABARAPG116A), permettent d'étudier le rôle cytosolique dépendant et indépendant de l'autophagie. A titre d'exemple, la surexpression de GABARAPL1 est suffisante pour induire l'autophagie basale indépendamment de sa conjugaison aux autophagosomes (Poillet-Perez *et al.*, 2017)

Caenorhabditis elegans, est un modèle utilisé pour l'étude fonctionnelle de l'autophagie au cours du développement et la longévité. En effet, dès la fécondation, tout au long du développement et plus tardivement au cours du vieillissement, le processus autophagique est retrouvé de manière physiologique, mais peut aussi être induit par des carences nutritionnelles ou un stress thermiques (Chen, Scarcelli and Legouis, 2017). D'autre part *C. elegans* possède deux homologues uniques, LGG-1 et LGG-2, respectivement de la famille GABARAP et LC3. Cette caractéristique est un outil biologique pertinent pour la compréhension des rôles des deux familles chez l'homme. Des similitudes de fonctions semblent être conservées entre *C. elegans* et les mammifères, comme le rôle indispensable de LGG-1/GABARAP pour maintenir un flux autophagique.

L'un des défis scientifiques d'aujourd'hui consiste à cartographier de manière temporelle et spatiale les différentes fonctions des protéines de types Atg8. En plus de son rôle autophagique au cours du développement et de la longévité, on lui attribue notamment des rôles de trafic, de courbure des membranes et de signal de dégradation. Une meilleure compréhension des mécanismes d'action des Atg8 permettrait de mieux appréhender ses différents rôles dans des processus physiologiques et pathologiques. C'est dans ce contexte que prend place mon travail de recherche et que se pose le questionnement suivant :

Existe-t-il des fonctions autophagiques ou non autophagiques spécifiques des formes cytosoliques versus lipidées de GABARAP/LGG-1 ?

Notre stratégie a été de développer les outils nécessaires pour aborder les spécificités de notre étude. Nous avons utilisé CRISPR-Cas9 pour obtenir de nouveaux allèles mutants du gène *lgg-1*. Nous avons créé des mutants dans lesquels on retrouve soit la forme précurseur seule (LGG-1-P), soit la forme cytosolique clivée seule (LGG-1.I), soit les deux.

J'ai notamment pu montrer que des formes non membranaires de GABARAP/LGG-1 sont suffisantes pour permettre différentes fonctions autophagiques tout au long de la vie du ver. Mes résultats suggèrent également que la fonction majeure d'une forme clivée mature de LGG-1 interviendrait dans des étapes précoces d'induction du processus.

Résultats

J'ai choisi de présenter les résultats obtenus au cours de ma thèse en deux parties :

PARTIE I- Étude des fonctions autophagiques et non autophagiques des protéines LGG-1/GABARAP

La partie I consiste dans un premier temps à détailler les stratégies et méthodes utilisées pour l'obtention de nouveaux allèles mutants du gène *lgg-1* ainsi que l'obtention de protéines de fusion mCherry::LGG-2 et GFP::LGG-1 par l'ingénierie CRISPR-Cas9. Dans un second temps, mes résultats sont présentés sous la forme d'un manuscrit en anglais. Mon projet de thèse consiste à caractériser les fonctions des différentes formes de LGG-1 chez *Caenorhabditis elegans*. LGG-1, l'homologue de la famille GABARAP, est essentiel à la viabilité et au développement du nématode. Afin de déterminer les différents rôles de GABARAP/LGG-1, nous avons généré des mutants par CRISPR-Cas9 qui permettent d'exprimer soit uniquement le précurseur, soit la forme mature cytosolique, soit les deux. J'ai pu montrer que la glycine116 de LGG-1 est essentielle pour le clivage du précurseur et la localisation de LGG-1 aux membranes des autophagosomes. Nos résultats montrent qu'une forme non lipidable de LGG-1 est suffisante pour maintenir à la fois l'autophagie sélective au cours du développement (mitophagie et agréphagie) et l'autophagie globale physiologique au cours du vieillissement, ou induite suite à un stress nutritionnel. Nos résultats suggèrent que la fonction majeure de la forme clivée mature interviendrait dans des étapes précoces d'induction du processus.

PARTIE II - Étude de l'autophagie en condition de stress chez *Caenorhabditis elegans*

La seconde partie présente ma contribution à un projet parallèle, notamment par des expériences de vidéo-microscopie. Déchiffrer comment l'autophagie participe aux processus développementaux et d'adaptation au stress des animaux est un défi majeur. C'est dans ce cadre que s'inscrit un des projets du laboratoire qui consiste à la caractérisation du mécanisme d'autophagie à la suite d'un stress thermique aigu (aHs). Y. Chen a montré qu'une élévation aiguë de la température modifie l'homéostasie mitochondriale et induit un flux autophagique et des événements de mitophagie. Cette étude fait l'objet d'un article sous presse dans *Journal Cell Biology* présenté en seconde partie des résultats

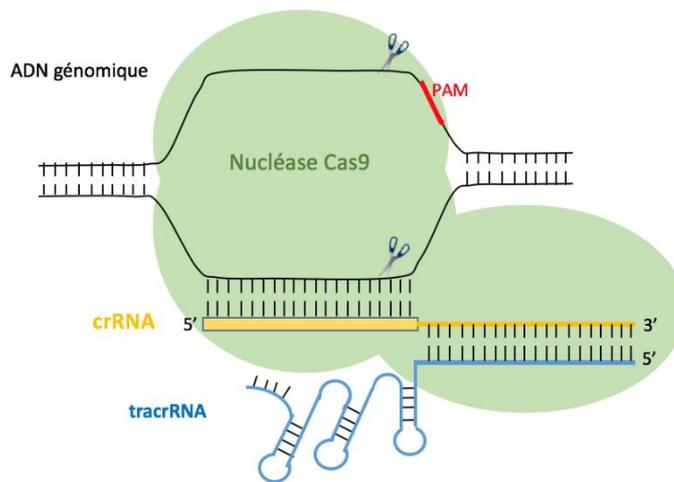


Figure 38 - Le complexe Cas9-crRNA-tracrRNA

La nucléase Cas 9 (vert) cible l'ADN à cliver à l'aide de l'ARN guide composé du tracrRNA (bleu) et du crRNA (jaune). Le tracrRNA par homologie de séquence, cible à la fois le crRNA qui lui-même a une forte homologie avec l'ADN cible à cliver. La cas9 est capable de reconnaître un motif PAM (NGG) et de générer une coupure double brin 3 nucléotides en amont. (Adaptée d'un schéma Dharmacon).

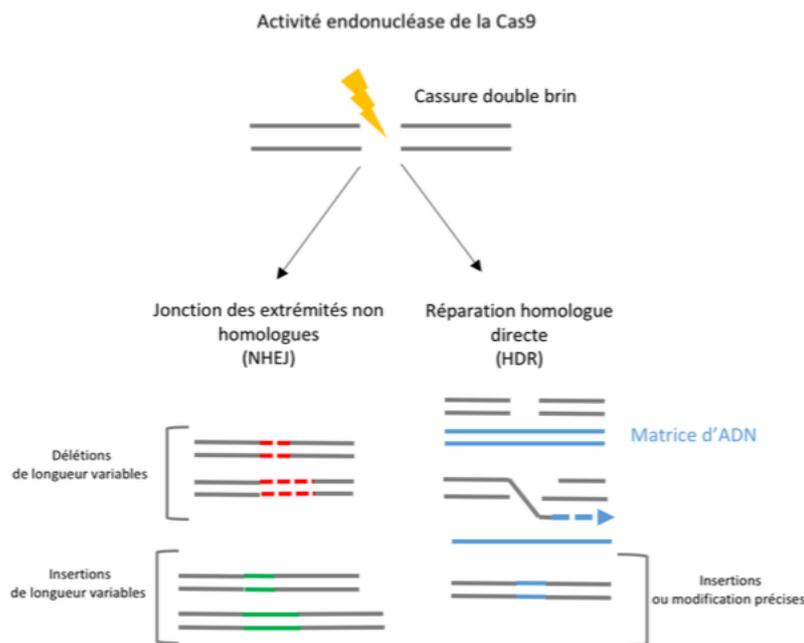


Figure 39 - Mécanismes mis en place à la suite d'une cassure double brin

L'activité endonucléase de la Cas9 engendre une cassure double brin. A la suite de cette coupure deux types de mécanismes de réparation peuvent être mis en place. Une réparation par jonction des extrémités non-homologues (NHEJ) pouvant générer des délétions et insertions de longueurs variables. La présence d'une matrice de réparation d'ADN comportant des séquences homologues de part et d'autre du site de coupure favorise les mécanismes de recombinaison homologue directe (HDR), permettant l'insertion d'un ADN donneur au site de coupure. Ce dernier mécanisme permet de générer des modifications ciblées et précises du génome. (Schéma Dharmacon).

PARTIE I- Etude des fonctions autophagiques et non autophagiques des protéines Ubiquitines-like LGG-1/GABARAP

I. Mutagenèse ciblée : obtention de nouveaux allèles des gènes *lgg-1* et *lgg-2*

Il existe chez les mammifères sept homologues d'Atg8 regroupés en deux familles : la famille MAP-LC3 (microtubule-associated protein1 light chain 3) et la famille GABARAP (amino-butyric acid receptor-associated protein). Le nématode est le modèle choisi par l'équipe de Renaud Legouis pour l'étude des fonctions des *homologues* d'Atg8 au cours du développement car il n'en possède que deux: *lgg-1* et *lgg-2*, qui par des analyses phylogénétiques sont retrouvés proches des membres de la famille GABARAP et LC3, respectivement. Les fonctions de ces familles dans différents processus physiologiques restent encore à élucider. L'approche de mutagenèse par CRISPR-Cas9 permet de s'affranchir des problèmes liés à la transgénèse classique chez *C. elegans*, tels que la surexpression des protéines et les profils d'expression incomplets liés à l'insertion aléatoire du transgène dans le génome.

1.1 Modification du génome par réparation d'une cassure double brin

Le système CRISPR-Cas9 est un mécanisme de coupure double brin ciblé, utilisé par les bactéries et les Archae comme système immunitaire adaptatif contre les phages et les plasmides. L'utilisation de ce système comme outil permet de générer des modifications génomiques précises pour l'obtention des mutants ou de protéines de fusion pour l'étude des mécanismes cellulaires et moléculaires. Pour exercer son activité endonucléase, la Cas 9 se lie à 2 petits ARN : l'ARN CRISPR (crRNA), portant une séquence complémentaire de l'ADN cible, et le trans-activating CRISPR RNA (tracrRNA) qui s'hybride avec le crRNA et active la Cas9 pour la guider sur son site de coupure, **Figure 38**. La Cas9 de *Streptococcus pyogenes* doit interagir avec un protospacer-adjacent motif (PAM), séquence reconnaissable par la présence de deux guanines situées sur l'ADN cible, et est capable de générer une cassure double brin 3 nucléotides en aval. Deux types de mécanismes de réparation d'ADN peuvent être alors mis en place, **Figure 39**. Une réparation dite spontanée par jonction des extrémités non homologues (NHEJ : Non homologous end joining), ou par recombinaison homologue en présence de séquence d'ADN donneur (HDR : Homologous direct repair). Le processus de NHEJ peut être à l'origine d'insertions ou de délétions de taille variable au niveau du site de coupure, permettant l'inactivation d'un gène d'intérêt pour l'étude de sa fonction.

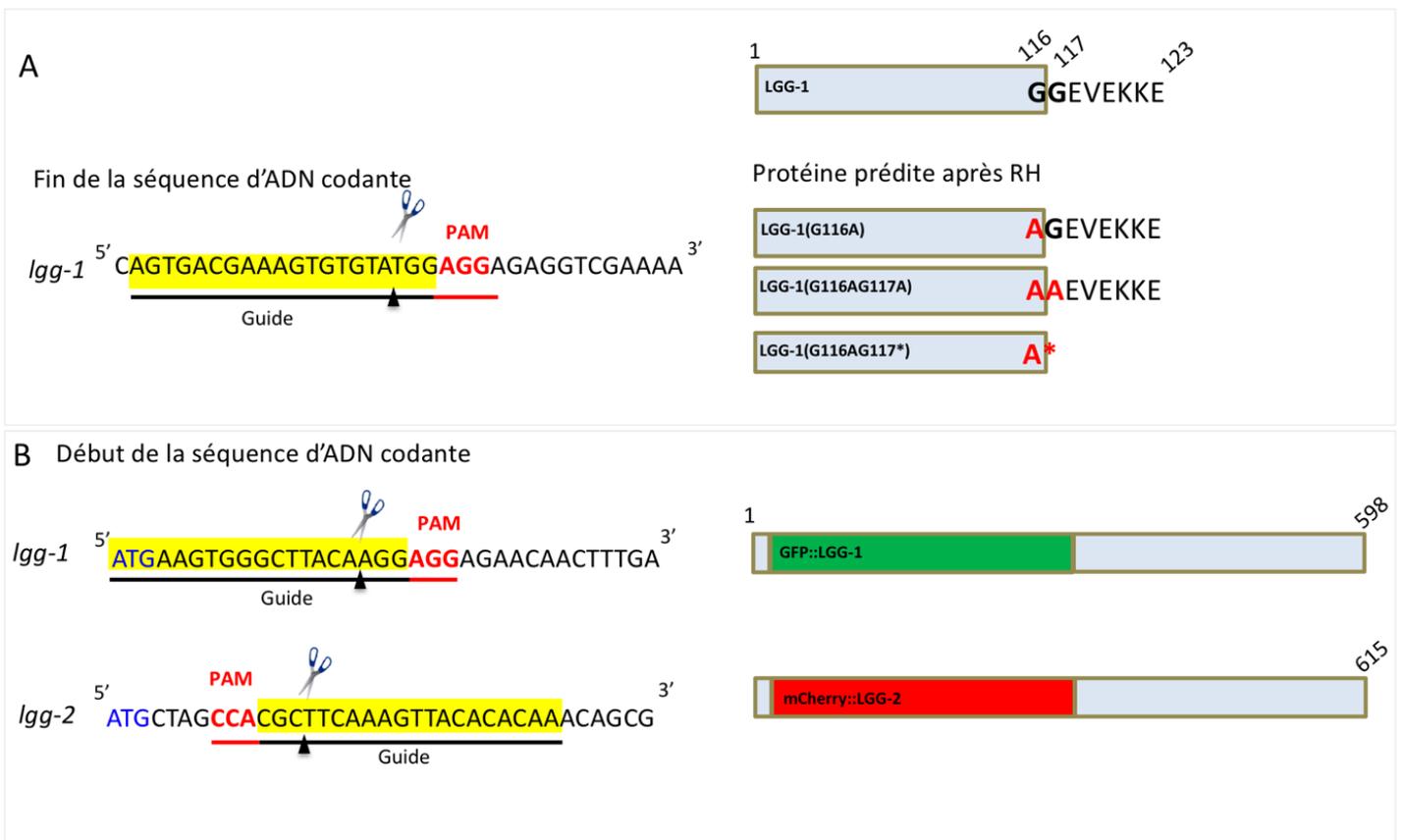


Figure 40 : Stratégie CRISPR pour obtenir des nouveaux allèles mutants de *lgg-1* et *lgg-2*

A -Stratégie d'obtention des mutations ponctuelles dans la fin de la séquence codante de *lgg-1*. L'ARN guide choisi est capable de s'hybrider par appariement sur la séquence d'ADN surlignée en jaune. De manière dogmatique la cas9 clive 3 nucléotides en amont du motif NGG (PAM). Le site de coupure est représenté par une flèche noire. **B** – Début de la séquence codante de *lgg-1* et *lgg-2* Le motif PAM choisi est proche de l'ATG pour permettre l'insertion de la séquence de la GFP ou de la mCherry pour créer des protéines de fusion.

D'autre part, des mécanismes HDR permettent d'obtenir des mutations ponctuelles ou encore le remplacement d'une séquence par une autre à l'aide d'un ADN matrice.

1.2 Utilisation de Cas9 pour cibler une coupure spécifique du génome

La première étape consiste à identifier la région cible en fonction de la modification génique que l'on veut générer et à identifier le meilleur site de coupure. Pour les mécanismes HDR, il faut choisir un site de coupure aussi proche que possible de l'endroit où l'on veut générer une modification (Dickinson and Goldstein, 2016). La seconde étape consiste à créer une séquence guide unique (crRNA) permettant de guider la Cas9 au site de coupure. Pour minimiser les possibilités d'appariement de cette séquence ailleurs qu'au locus cible (off-target), cette séquence doit être unique. Pour cela nous avons identifié la séquence guide à l'aide d'un outil développé par le laboratoire de Feng Zhang's, disponible sur le site <http://crispr.mit.edu>. Cet outil répertorie toutes les séquences guides possibles et identifie le pourcentage de off-target pour chaque guide. Cette étape est très importante puisqu'elle permet de donner une spécificité d'action à la Cas9, **Figure 40**.

1.3 Construction des matrices de réparation d'ADN

Les matrices de réparation pour l'obtention d'une mutation ponctuelle de *lgg-1* sont des produits de PCR présentant une partie homologue avec l'ADN cible et présentant les mutations ponctuelles d'intérêts (par exemple : remplacement du codon GGA codant la glycine 116 par GCC codant une alanine). Un unique site de restriction a été introduit pour permettre par la suite de repérer par PCR et digestions enzymatiques les individus possédant la matrice de réparation. De plus, des mutations silencieuses sont introduites dans la matrice pour éviter que la Cas9 et le crRNA ne se réhybrident après la réparation. Afin de déterminer les différents rôles de GABARAP/LGG-1, j'ai généré des mutants permettant d'exprimer uniquement la forme précurseur (*lgg-1G116AG117A*), la forme mature cytosolique (*lgg-1G116AG117**), ou les deux (*lgg-1(G116A)*). En effet, une des particularités de *C. elegans* est la présence en partie C-terminale de LGG-1 de deux glycines successives en positions 116 et 117. Nous avons donc muté soit la première glycine en une alanine, soit la seconde, soit les deux pour obtenir différents allèles mutants de *lgg-1*. Les différentes matrices de réparation utilisées pour obtenir les différents mutants *lgg-1* sont détaillées en ANNEXE 1.

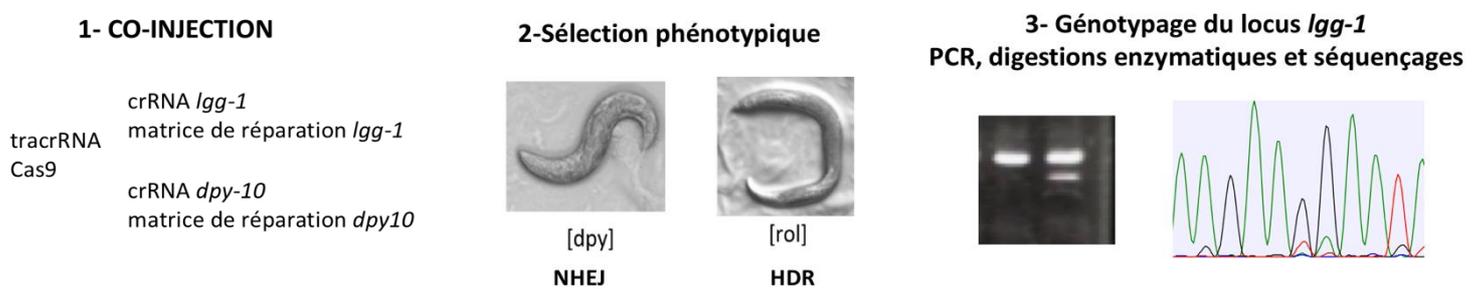


Figure 41 - Stratégie Co-CRISPR

Réalisation simultanée d'un co-CRISPR, l'un ciblant le gène marqueur *dpy-10* et l'autre le gène d'intérêt *lgg-1*. Cette stratégie permet de mettre en évidence les animaux ayant la plus forte probabilité d'avoir des modifications géniques au locus *lgg-1*. La matrice de réparation ciblant le gène marqueur *dpy-10* porte une mutation non-sens, conférant un phénotype roller, [rol], les individus tournant en rond. Une délétion au locus *dpy-10* confère un phénotype [dpy], les animaux ayant une morphologie plus courte. Des individus ayant subi des modifications géniques au locus marqueur sont considérés comme ayant la plus grande probabilité de subir des modifications géniques au locus *lgg-1*. Cette stratégie permet une pré-sélection des animaux, un génotypage par PCR et séquençage sont ensuite nécessaires (Paix *et al.*, 2015).

1.4 Stratégie de Co-CRISPR

Les approches expérimentales de CRISPR ont été développées dans l'équipe depuis plusieurs années en adaptant les protocoles d'édition du génome chez *C. elegans* (Paix *et al.*, 2015). L'efficacité du CRISPR étant variable d'un individu à l'autre, nous avons mis en place une stratégie de co-CRISPR. En plus du locus d'intérêt, on cible simultanément un locus marqueur *dpy-10*, **Figure 41**. Cette stratégie permet une pré-sélection des animaux ayant subi des modifications géniques. En effet, à la suite de la cassure double brin provoquée par la Cas9, une délétion au niveau du gène marqueur *dpy10* provoque un phénotype dit dumpy [dpy], ces animaux ont une morphologie plus courte que la morphologie sauvage. Au niveau de ce locus, l'insertion d'une matrice de réparation comportant une mutation non-sens provoque un phénotype roller [rol], c'est à dire que les animaux tournent en rond. La visualisation d'un phénotype [dpy] ou [rol] dans la descendance des animaux injectés met en évidence la présence d'une modification génique au niveau de ce locus. Ceci augmente la probabilité de sélectionner des individus chez lesquels le deuxième locus (le gène d'intérêt) est également modifié. Les modifications géniques semblent être plus nombreuses parmi les descendants de certaines mères injectées. Ces individus sont isolés les uns des autres sur des boîtes pour permettre l'obtention d'une seconde génération. Puis, une PCR et un séquençage sont effectués pour sélectionner les animaux porteurs de la mutation d'intérêt.

1.5 Obtention de protéine de fusion GFP::LGG-1, mCherry ::LGG-2

L'obtention des protéines de fusion a été réalisée en collaboration avec Christophe Lefebvre et Emmanuel Culetto, maîtres de conférences dans l'équipe. Le site de coupure choisi est très proche de l'ATG pour éviter de perturber la fonctionnalité de la protéine. La matrice de réparation créée comporte une séquence homologue au locus cible de part et d'autre de la séquence de la mCherry ou GFP pour permettre la recombinaison homologe. Pour l'obtention de la mCherry::LGG-2 à l'issue de l'injection dans les gonades de 25 hermaphrodites de pré-complexes Cas9-crRNA-tracrRNA et de matrices de réparation, deux individus ont été sélectionnés comme donnant le plus grand nombre de descendants positifs pour des modifications géniques. Ces individus sont appelés des « Jackpots brood ».

**CRISPR GFP::*LGG-1*
mCherry::*LGG-1***

mCherry::*LGG-2*

A	F0		F1	
	Numéro du vers injecté	Nombre d'animaux [DPY]	Nombre d'animaux [ROL]	TOTAL des animaux ayant subi des modifications au locus <i>dpy-10</i>
	1	0	0	0
	2	0	2	2
	3	0	0	0
	4	0	0	0
	5			25
	6	0	0	0
	7	0	0	0
	8	0	0	0
	9	0	0	0
	10	0	0	0
	11	0	0	0
	12	0	0	0
	13	0	0	0
	14	0	0	0
	15	6	0	6
	16	0	0	0
	17	4	0	4
	18			24
	19	1	0	1
	20	0	0	0
	21	3	0	3
	22	1	0	1

B	F0		F1	
	Numéro du vers injecté	Nombre d'animaux [DPY]	Nombre d'animaux [ROL]	TOTAL des animaux ayant subi des modifications au locus <i>dpy-10</i>
	1	9	3	12
	2	20	13	33
	3	1	2	3
	4	9	12	21
	5	22	9	31
	6	0	0	0
	7	0	0	0
	8	3	3	6
	9	15	7	22
	10	0	0	0
	11	0	0	0
	12	35	18	53
	13	0	0	0
	14	1	2	3
	15	0	0	0
	16	0	0	0
	17	0	1	1
	18	0	0	0
	19	0	1	1
	20	16	13	29
	21	40	18	58
	22	0	0	0
	23	0	0	0
	24	0	0	0
	25	8	4	12

C	Nombre d'animaux injectés	
		22
	Nombre de vers [dpy] ou [rol] sélectionnés en F1	
		66
Nombre d'animaux mCherry:: <i>LGG-1</i>		8
Nombre d'animaux GFP:: <i>LGG-1</i>		9

D	Nombre d'animaux injectés	
		25
	Nombre de vers [dpy] ou [rol] sélectionnés en F1	
		275
Nombre d'animaux mCherry:: <i>LGG-2</i>		23
Nombre d'animaux GFP:: <i>LGG-2</i>		0

Figure 42 - Tableau récapitulatif des résultats obtenus suite à deux expériences de CRISPR pour l'obtention des protéines de fusion LGG-1 et LGG-2

Tableau récapitulatif des résultats obtenus **A-** suite à la co-injection des matrices de réparation *gfp::*lgg-1** et *mCherry::*lgg-1**. **B-** suite à l'injection de la matrice de réparation *mCherry::*lgg-2**

F0 correspond aux vers ayant subi l'injection. Après injection ces animaux s'autofécondent et donnent une génération F1. L'efficacité du CRISPR étant variable d'un individu à l'autre, nous avons isolé les animaux ayant eu des événements de recombinaison au locus *dpy-10* (surlignages jaunes clairs). Ces événements sont visibles à l'œil par la présence d'un phénotype [dpy] ou [rol]. Si un événement s'est produit au locus *dpy-10*, c'est que l'injection a été correctement effectuée et qu'il y a des chances que le locus cible *lgg-1* ait lui aussi subi des événements de recombinaison. Les individus ayant obtenu un grand nombre de [dpy] ou [rol] sont surlignés en jaunes fluos, ces animaux sont appelés des « Jackpot brood ». Tableau bilan des résultats obtenus. **C** suite à la co-injection des matrices de réparation *gfp::*lgg-1** et *mCherry::*lgg-1**. **D-** suite à l'injection de la matrice *mCherry::*lgg-2**.

Un génotypage par PCR a été effectué sur les 53 et 58 animaux issu de ces « Jackpots brood » correspondants. L'utilisation de deux oligonucléotides bordant la séquence de *lgg-2* permet de révéler la présence d'une bande de 417 pb correspondant à la séquence génomique sauvage. L'obtention d'une bande de 1134 pb suggère l'insertion de la séquence codant la mCherry. Des bandes de tailles intermédiaires sont également observées, mettant en évidence des insertions aléatoires. La stratégie d'insertion de la matrice de réparation n'a pas permis d'obtenir de délétion. Les animaux présentant une bande de 1134 pb par PCR ont été analysés pour l'expression de la mCherry au microscope. L'insertion fonctionnelle de la séquence codant la protéine fluorescente au locus de *lgg-2* a été observée dans 22,6% des cas soit 23 lignées. Pour l'insertion de la GFP et de la mCherry au locus *lgg-1*, la même méthode de génotypage que celle utilisée pour LGG-2 a été effectuée. 9 lignées GFP::LGG-1 et 8 mCherry::LGG-1 ont été trouvées positives, soit environ 13 et 12 % d'obtention, respectivement. Les résultats sont répertoriés **Figure 42**.

1.6 mCherry::LGG-2 et GFP::LGG-1 définissent trois types d'autophagosomes

Des expériences d'immunofluorescence ont précédemment révélé la présence de trois types d'autophagosomes dans l'embryon : des structures uniquement positives pour LGG-1, d'autres uniquement positives pour LGG-2, et une troisième catégorie doublement positive, à la fois pour LGG-1 et pour LGG-2. Des proportions différentes pour chaque population ont été trouvées. Trois fois plus d'autophagosomes positifs uniquement pour LGG-1 ont été observés (Manil-Ségalen *et al.*, 2014). Afin de confirmer ces résultats avec notre nouvel outil, j'ai croisé la souche mCherry::LGG-2 avec la lignée GFP::LGG-1. Les données obtenues avec cette lignée sont encore préliminaires mais on peut observer les 3 types différents de populations d'autophagosomes, dont une majorité est positive pour LGG-1. Des analyses quantitatives doivent être effectuées. Les outils mCherry::LGG-2 et GFP::LGG-1 créés sont donc encourageants pour l'étude de ces différentes populations d'autophagosomes, **Figure 43**. J'ai par la suite effectué des premières expériences de vidéomicroscopie à l'aide du microscope confocal spinning disque. En effet, la présence de trois populations différentes soulève de nombreuses questions. Est-ce que ces différentes populations d'autophagosomes ciblent les mêmes cargos ? Est-ce qu'il y a un recrutement successif ou simultané de LGG-1 et LGG-2 sur les membranes ?

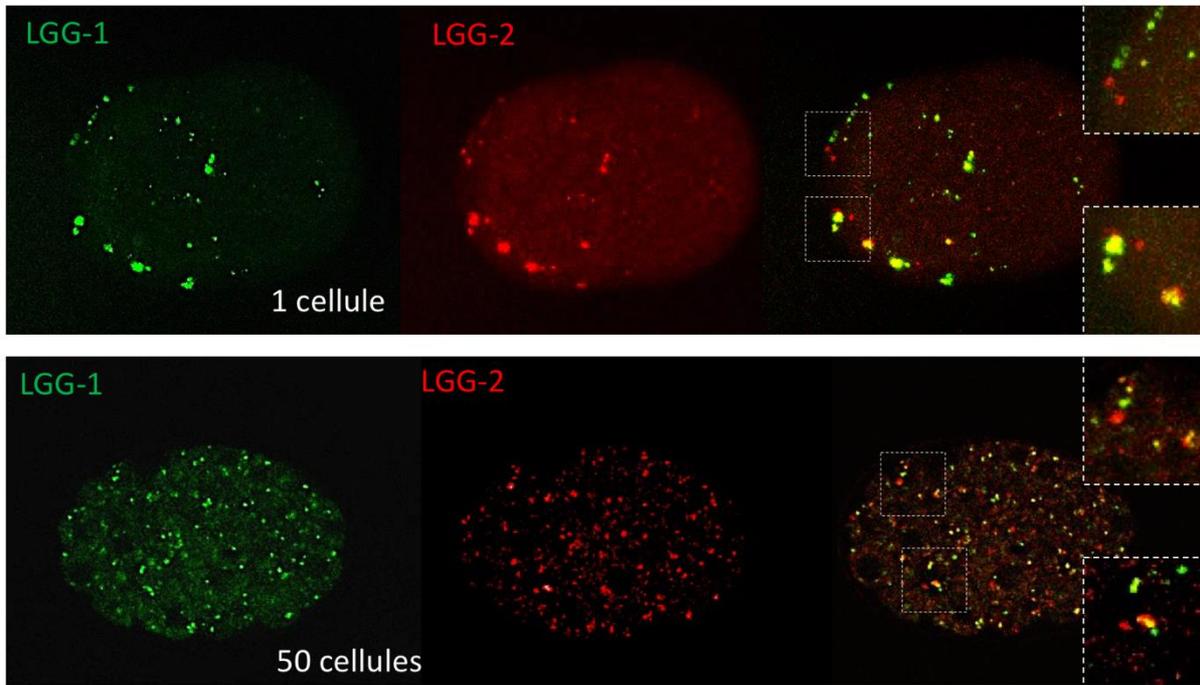


Figure 43 - GFP::LGG-1 et mCherry::LGG-2.

mCherry::LGG-2 et GFP::LGG-1 dans des embryons précoces et tardifs définissent 3 populations d'autophagosomes

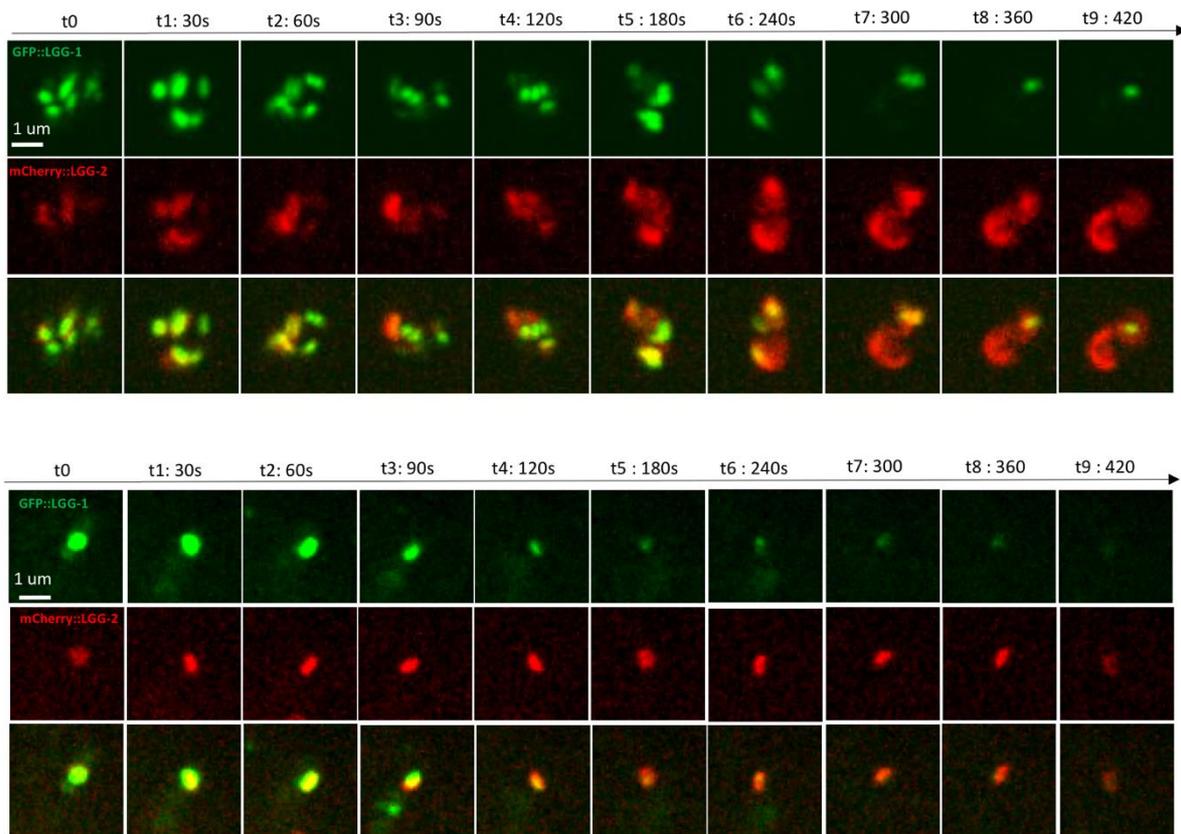


Figure 44 - Timelapse sur les populations positives pour LGG-1 et LGG-2

Analyses préliminaires de la dynamique des populations d'autophagosomes positifs pour LGG-1 et LGG-2 par vidéomicroscopie. Des populations majoritairement positives pour LGG-1 (vertes) deviennent de plus en plus jaunes (LGG-1 et LGG-2-) puis majoritairement positives pour LGG-2 (rouge).

Dans le but d'appréhender ces questions j'ai effectué des expériences de vidéomicroscopie permettant d'analyser les différentes populations d'autophagosomes dans les embryons. Des expériences préliminaires sur une population autophagosomale positive à la fois pour LGG-1 et LGG-2 suggèrent un recrutement successif des protéines LGG-1 et LGG-2 dans les embryons précoces, **Figure 44**. En effet, cette population majoritairement verte, devient principalement jaune puis rouge. Ce résultat est retrouvé sur un point jaune isolé dans des embryons de 50 cellules. Ces résultats intéressants sont encore préliminaires et nécessitent d'être reproduits. Pour la première fois, nous pouvons suivre *in vivo* le profil d'expression des protéines LGG-1 et LGG-2 dès la fécondation et tout au long du développement, dans un contexte similaire à celui de la protéine endogène.

1.7 Obtention de nouveaux mutants du gène *lgg-1*

A mon arrivé au laboratoire, l'équipe a utilisé l'ingénierie CRISPR-Cas-9 pour construire une lignée comportant une mutation ponctuelle du gène *lgg-1* dans le but d'inhiber l'adressage de LGG-1 aux membranes des autophagosomes et également pour obtenir de nouveaux mutants. Par des mécanismes de recombinaisons homologues nous avons obtenu un mutant *lgg-1(G116A)*, chez lequel la glycine située en position 116 a été remplacée par une alanine. De plus, à l'issue du protocole de CRISPR, nous avons obtenu plusieurs mutants de délétion et d'insertion que nous avons séquencés. J'ai choisi d'étudier trois mutants de *lgg-1*, le mutant *lgg-1(G116A)* et les allèles mutants *lgg-1(pp22)* et *lgg-1(pp66)*. Les lignées générées sont récapitulées dans l'ANNEXE 2. Le mutant *lgg-1(pp22)* présente l'insertion d'une thymine en position C-terminale, provoquant un décalage du cadre de lecture, qui fait apparaître un codon STOP précoce, codant potentiellement une protéine plus courte. Quant au mutant *lgg-1(pp66)*, une délétion d'une quarantaine de nucléotides provoque un décalage du cadre de lecture à l'origine d'une protéine hypothétiquement plus longue. Le faible taux de recombinaison homologue direct pour ce premier CRISPR nous a permis d'établir une nouvelle stratégie pour l'obtention d'autres mutants comportant des mutations ponctuelles. En effet, la particularité chez *C. elegans* est la présence d'une seconde glycine en position 117. Dans le but de muter cette seconde glycine par une alanine ou un codon stop, plusieurs expériences ont été nécessaire pour obtenir les différents mutants.

CRISPR *lgg-1(G116AG117*)* / *lgg-1(G116AG117A)*

A

F0	F1			
Numéro du vers injecté	Nombre d'animaux [DPY]	Nombre d'animaux [ROL]	Nombre d'animaux [DPY ROL]	TOTAL des animaux ayant subi des modification au locus <i>dpy-10</i>
1	0	0	0	0
2	0	0	0	0
3	48	5	0	53
4	0	0	0	0
5	0	0	0	0
6	0	0	0	0
7	0	0	0	0
8	0	6	0	6
9	0	0	0	0
10	0	6	0	6
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	0	0	0	0
14	0	6	0	6
15	0	5	0	5
16	0	0	0	0
17	8	0	0	8
18	0	0	0	0
19	0	0	0	0
20	5	0	7	12
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	0	0	0	0

CRISPR *lgg-1(G116AG116A)*

B

F0	F1			
Numéro du vers injecté	Nombre d'animaux [DPY]	Nombre d'animaux [ROL]	Nombre d'animaux [DPY ROL]	TOTAL des animaux ayant subi des modification au locus <i>dpy-10</i>
1	0	2	0	2
2	0	0	0	0
3	0	0	0	0
4	0	0	0	0
5	D	E	A	D
6	3	8	4	15
7	0	0	0	0
8	0	0	0	0
9	0	2	0	2
10	0	0	0	0
11	0	0	0	0
12	0	0	0	0
13	6	16	10	32
14	0	0	0	0
15	0	0	0	0
16	0	2	2	4
17	D	E	A	D
18	D	E	A	D
19	D	E	A	D
20	0	0	0	0
21	0	0	0	0
22	0	0	0	0
23	0	0	0	0
24	D	E	A	D
25	24	11	20	55
26	0	0	0	0

C

Nombre d'animaux injectés	23
Nombre de vers [dpy] ou [rol] sélectionnés en F1	97
Nombre d'animaux ayant subi un événement de recombinaison au locus <i>lgg-1</i>	14
Nombre d'animaux <i>lgg-1(G116AG117*)</i>	12
Nombre d'animaux <i>lgg-1(G116AG117A)</i>	0
Nombre d'animaux présentant une insertion au locus <i>lgg-1</i> (NHEJ)	2
Nombre d'animaux présentant une délétion au locus <i>lgg-1</i> (NHEJ)	0

D

Nombre d'animaux injectés	26
Nombre de vers [dpy] ou [rol] sélectionnés en F1	110
Nombre d'animaux ayant subi un événement de recombinaison au locus <i>lgg-1</i>	2
Nombre d'animaux <i>lgg-1(G116AG117A)</i>	1
Nombre d'animaux présentant une insertion au locus <i>lgg-1</i> (NHEJ)	0
Nombre d'animaux présentant une délétion au locus <i>lgg-1</i> (NHEJ)	1

Figure 45 - Tableau récapitulatif des résultats obtenus suite à deux expériences de CRISPR pour l'obtention des mutants *lgg-1(G116AG117A)* et *lgg-1(G116AG117*)*

Tableau récapitulatif des résultats obtenus **A-** suite à la co-injection des matrices de réparation *lgg-1(G116AG117*)* et *lgg-1(G116AG117A)*. **B-** suite à l'injection seule de la matrice *lgg-1(G116AG117A)*. F0 correspond aux vers ayant subi l'injection. Après injection ces animaux s'autofécondent et donnent une génération F1. L'efficacité du CRISPR étant variable d'un individu à l'autre, nous avons isolé les animaux ayant eu des événements de recombinaison au locus *dpy-10* (surlignages jaunes). Ces événements sont visibles à l'œil par la présence d'un phénotype [dpy] ou [rol]. Si un événement s'est produit au locus *dpy-10*, c'est que l'injection a été correctement effectuée et qu'il y a des chances que le locus cible *lgg-1* ait subi des événements de recombinaison lui aussi. Les individus ayant obtenu un grand nombre de [dpy] ou [rol] sont surlignés en jaunes intenses, ces animaux sont appelés des « Jackpot brood » Tableau bilan des résultats obtenus. **C-** Suite à la co-injection des matrices de réparation *lgg-1(G116AG117*)* et *lgg-1(G116AG117A)*. **D-** suite à l'injection seule de la matrice *lgg-1(G116AG117A)*.

Par la suite nous avons voulu générer des mutations ponctuelles permettant d'obtenir les formes LGG-1.I et pLGG-1 seules. En effet, l'insertion simultanée de deux matrices de réparation différentes, G116AG117* et G116AG117A, n'a permis d'obtenir que l'un des deux mutants. Parmi les animaux sélectionnés, 12 % sont *lgg-1(G116AG117*)* et 0% *lgg-1(G116AG117A)*. Cela pourrait être dû à une différence d'affinité des crRNA avec l'ADN cible. En effet, l'insertion seule n'a permis d'obtenir qu'un seul individu *lgg-1(G116AG117A)*. Les différents rendements d'obtention des mutants sont détaillés dans les tableaux, **Figure 45**.

II. Les formes cytosoliques de LGG-1/GABARAP assurent des fonctions spécifiques au cours de l'autophagie et du développement chez *C.elegans*

Cette partie consiste à résumer les résultats obtenus au cours de mon projet de thèse avant d'insérer une première version du manuscrit en préparation.

La protéine « ubiquitine like » Atg8 est l'un des acteurs principaux de la macroautophagie qui chez la levure, est nécessaire à plusieurs étapes du processus telles que l'initiation, la reconnaissance et l'engloutissement du cargo et la fermeture des autophagosomes, (Ichimura *et al.*, 2000, 2004; Nakatogawa, Ichimura and Ohsumi, 2007; Kraft *et al.*, 2012; Knorr *et al.*, 2014) Il existe sept isoformes homologues d'Atg8 chez l'homme définissant deux familles le MAP-LC3 (LC3A-a, LC3A-b, LC3b, LC3C) et GABARAP (GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2), (Shpilka *et al.*, 2011). Les protéines LC3/GABARAP peuvent avoir des fonctions similaires et spécifiques au cours du flux autophagique, (Pankiv *et al.*, 2007; Weidberg *et al.*, 2010; Alemu *et al.*, 2012; Lystad *et al.*, 2014; Joachim *et al.*, 2015; Baeken *et al.*, 2020; Grunwald *et al.*, 2020; Jatana *et al.*, 2020). Les protéines GABARAP sont importantes notamment pour les étapes précoces d'initiation et la fermeture des autophagosomes, étapes pour lesquelles les protéines LC3 sont dispensables (Nguyen *et al.*, 2016).

La pléiotropie des protéines Atg8/LC3/GABARAP ne se limite pas à l'autophagie, ces protéines ont notamment un rôle dans le trafic de récepteurs intracellulaires, de suppresseur de tumeur, dans la phagocytose des corps apoptotiques (LAP), dans la voie ERAD, (Schaaf *et al.*, 2016; Galluzzi and Green, 2019). Plusieurs équipes ont tenté de décrire les rôles des sept protéines individuellement chez les mammifères. Mais les protéines d'une même famille

possèdent une forte similarité de séquence réduisant ainsi la spécificité des anticorps ou des ARN interférents.

De plus, une série de modifications post-traductionnelles, similaires à la conjugaison de l'ubiquitine, sont impliquées dans le ciblage membranaire des protéines Atg8/LC3/GABARAP. Ces protéines sont initialement synthétisées sous forme de précurseur (forme P), puis clivées à leur extrémité C-terminale après le résidu invariant glycine116 pour les protéines GABARAP (forme I) (ou la glycine en position 120 pour les LC3) et conjuguées à la phosphatidyl-éthanolamine (forme II) au niveau de la membrane des autophagosomes, (Scherz-Shouval *et al.*, 2003; Kabeya *et al.*, 2004; Betin and Lane, 2009). Par ailleurs, ces protéines peuvent être assujetties à d'autres modifications telles que des phosphorylations, ubiquitinations ou des acétylations (Schaaf *et al.*, 2016). Un tel niveau de complexité rend très difficile l'étude des fonctions spécifiques de chaque protéine chez l'homme, (Nguyen *et al.*, 2016).

Chez *C.elegans* la présence d'un unique homologue de chaque famille GABARAP et LC3, nommés respectivement LGG-1 et LGG-2 représente une situation simple pour la caractérisation des fonctions multiples de ces protéines. (Chen, Scarcelli and Legouis, 2017; Leboutet *et al.*, 2020). LGG-1 et LGG-2 sont impliquées dans le processus autophagique au cours du développement, de la longévité ou induites par un stress. Un des processus bien décrit et stéréotypé est le processus de dégradation des composés du spermatozoïde au moment de la fécondation appelé allophagie. LGG-1 joue un rôle dans la reconnaissance des cargos ubiquitinylés et interagit avec un récepteur autophagique, ALLO-1. LGG-1 est essentielle à la formation de ces autophagosomes allophagiques, en revanche LGG-2 est impliquée dans des étapes plus tardive de maturation des autophagosomes et de fusion avec les lysosomes (Manil-Ségalen *et al.*, 2014; Djeddi *et al.*, 2015). En outre, l'existence de trois populations d'autophagosomes, une seulement positive pour LGG-1, une seconde uniquement positive pour LGG-2 et une troisième doublement positive pour LGG-1 et LGG-2, suggère des fonctions spécifiques de ces protéines. De plus chez *C.elegans*, *lgg-1* est un gène essentiel à la viabilité du ver alors que *lgg-2* est dispensable (Manil-Ségalen *et al.*, 2014). Afin de déterminer les différents rôles de GABARAP/LGG-1, nous avons généré via l'ingénierie CRISPR-Cas9 des mutants permettant d'exprimer uniquement la forme précurseur (*lgg-1(G116AG117A)*), la forme mature cytosolique (*lgg-1(G116AG117*)*), ou les deux (*lgg-1(G116A)*).

Résultat 1: Glycine en position 116 est essentielle pour la localisation de LGG-1 aux membranes

Nous avons montré par des techniques de biochimie et d'immunomarquage que la glycine 116 en partie C-ter de LGG-1 est essentielle pour le clivage efficace permettant de créer la forme mature et pour la localisation de LGG-1 aux membranes des autophagosomes. La mutation de la glycine 116 en alanine a permis de mettre en évidence que la Glycine 117 pouvait être utilisée pour le clivage.

Résultat 2 : Les fonctions autophagiques de GABARAP/LGG-1 sont indépendantes de sa localisation aux autophagosomes

Nous avons montré qu'une forme non membranaire LGG-1(G116A) est suffisante pour permettre toutes les fonctions autophagiques testées. De plus, non seulement que l'autophagie globale n'est pas modifiée au cours de la longévité et en carence nutritionnelle mais également que la dégradation, par autophagie sélective des mitochondries paternelles, d'agrégats protéiques et des corps apoptotiques n'est pas altérée. Ces résultats permettent de considérer que la conjugaison des protéines Atg8 de type « ubiquitin like » n'est pas toujours un pré-requis à toutes leurs fonctions. Nos résultats suggèrent également que la fonction majeure de la forme clivée mature interviendrait dans des étapes précoces d'induction du processus.

Résultat 3 : Rôle compensatoire de LGG-2 au cours de la fonction autophagique

Nous avons déterminé qu'en absence de LGG-2, la fonction autophagique d'un mutant *lgg-1(G116A)* est fortement diminuée. Néanmoins l'obtention d'un double mutant *lgg-1(G116A);lgg-2(tm5755)* a permis de mettre en évidence une dégradation des mitochondries paternelles suggérant une fonction de LGG-1(G116A) maintenue en absence de LGG-2.

Résultat 4 : La fonction développementale de GABARAP/LGG-1 est indépendante de la fonction autophagique et de sa localisation membranaire

Lgg-1 est un gène essentiel, dont la déplétion entraîne une létalité embryonnaire. Nos résultats montrent pour la première fois que LGG-1 présente une fonction développementale indépendante de la fonction autophagique et indépendante d'une localisation autophagosomale, et ouvre une nouvelle voie d'exploration pour notre équipe.

Manuscrit Leboutet et al

41 **Introduction**

42 Macroautophagy is a highly dynamic vesicular degradation system that first sequesters
43 intracellular components in double membrane autophagosomes and then delivers them to
44 the lysosome. Upon induction, a flat membrane is nucleated from initiation sites generally
45 located on the endoplasmic reticulum, which further elongates, closes, and subsequently
46 fuses with the lysosome. The general scheme is the successive recruitment of a series of
47 protein complexes involved in the dynamic of the process through several steps -
48 phosphorylation of lipids, transfer of lipids from various reservoirs, the recognition of cargoes,
49 the tethering and the fusion. Albeit, the identification of numerous actors, the complete
50 mechanism and its regulation is still poorly understood. Moreover, an increasing amount of
51 data indicates that many of the components forming the molecular machinery for
52 macroautophagy are also involved in autophagy-unrelated functions. One of the key players
53 is the ubiquitin-like protein Atg8, which in yeast is required for several steps during autophagy,
54 such as initiation, cargo recognition and engulfment, and vesicle closure (Kirisako *et al.*, 2000;
55 Nakatogawa, Ichimura and Ohsumi, 2007; Klionsky, 2008; Kraft *et al.*, 2012; Knorr *et al.*, 2014).
56 There are seven isoforms of atg8 homologs in humans defining two families the MAP-LC3
57 (abbreviated as LC3A-a, LC3A-b, LC3b, LC3C) and the GABARAP (GABARAP, GABARAPL1,
58 GABARAPL2) (Shpilka *et al.*, 2011). LC3/GABARAP proteins are could have both similar and
59 very specific functions during the autophagic flux and for the recognition of specific cargoes
60 by selective autophagy (Pankiv *et al.*, 2007; Weidberg *et al.*, 2010; Alemu *et al.*, 2012; Lystad
61 *et al.*, 2014; Joachim *et al.*, 2015; Baeken *et al.*, 2020; Grunwald *et al.*, 2020; Jatana *et al.*,
62 2020). LC3/GABARAP proteins can bind multiple proteins through specific motifs (LIR LC3
63 interacting Region-several subtypes) and their interactomes are only partially overlapping
64 The pleiotropy of Atg8/LC3/GABARAP proteins is not restricted to autophagy but extends to
65 numerous cellular processes like intracellular receptor trafficking, tumor suppressor, ER
66 function (ERAD and ER exit sites), LAP, cell motility and growth (Schaaf *et al.*, 2016; Galluzzi
67 and Green, 2019).
68 Such a level of complexity make very difficult the study of the specific functions of each protein
69 in human (Nguyen *et al.*, 2016). Moreover, a series of post-translational modifications, similar
70 to the ubiquitin conjugation, is involved in the membrane targeting of Atg8/LC3/GABARAP
71 proteins. These proteins are initially synthesized as a precursor (P form), then cleaved at their
72 C-terminus after the invariant Glycine116 (or 120) residue (form I), and conjugated to
73 phosphatidyl-ethanolamine (form II) at the membrane of autophagosomes (Figure 1A)
74 (Scherz-Shouval *et al.*, 2003; Kabeya, 2004; Betin and Lane, 2009). Structural analyses have
75 shown that LC3/ GABARAP can adopt an open or close configuration. In addition, several other
76 post-translational modifications have been reported, like phosphorylation (Cherra *et al.*, 2010;
77 Wilkinson *et al.*, 2015; Herhaus *et al.*, 2020), ubiquitination (Joachim *et al.*, 2017) and
78 oligomerization (Coyle *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2007), whose effects on LC3/GABARAP
79 function and localization but are largely unknown. The subcellular localization of
80 Atg8/LC3/GABARAP proteins is multiple, either diffuse in the cytosol, or associated to the

81 membrane of various compartment (autophagosome, phagosome, Golgi, other) or the
82 cytoskeleton

83 The existence of this versatile and pleiotropic repertoire raises a number of questions about
84 the autophagy and the non autophagy functions of LC3/GABARAP proteins. It is of particular
85 interest to address the level of redundancy and specificity, including tissue specificity, of the
86 various members, and the possible functions of the forms P and I. In the nematode
87 *Caenorhabditis elegans*, the presence of single homologs of LC3 and GABARAP, called
88 respectively LGG-2 and LGG-1, represents an ideal situation to characterize their multiple
89 functions (Chen, Scarcelli and Legouis, 2017; Leboutet *et al.*, 2020).

90 The structure of LGG-1/GABARAP and LGG-2/LC3 is highly conserved (Wu *et al.*, 2015) and
91 both proteins are involved in autophagy processes during development, longevity and stress
92 (Samokhvalov, Scott and Crowder, 2008; Alberti *et al.*, 2010; Chang *et al.*, 2017). In particular,
93 the elimination of paternal mitochondria upon fertilization (also called allophagy) has become
94 a paradigm for dissecting the molecular mechanisms of selective autophagy (Zhou, Li and Xue,
95 2011; Djeddi *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2016). Genetic analyses indicated that LGG-1 and LGG-2
96 do not have similar functions in autophagy (Alberti *et al.*, 2010; Manil-Ségalen *et al.*, 2014;
97 Jenzer *et al.*, 2019). During allophagy LGG-1 is important for the recognition of ubiquitinated
98 cargoes through interaction with the specific receptor ALLO-1 (Sato *et al.*, 2018) and the
99 formation of autophagosomes, whereas LGG-2 is involved in their maturation into
100 autolysosomes and trafficking (Manil-Ségalen *et al.*, 2014; Djeddi *et al.*, 2015). Based on the
101 presence of LGG-1 and LGG-2, three populations of autophagosomes have been described in
102 *C. elegans* embryo: the major part is LGG-1 only, but LGG-2 only and double positives
103 autophagosomes are also present. Moreover, LGG-1 is an essential gene, while LGG-2 is
104 dispensable (Manil-Ségalen *et al.*, 2014).

105 In this study, we investigated the functions of the precursor and the form I of LGG-1/GABARAP.
106 Using CRISPR-CAS9 editing, we created specific mutations in the endogenous *lgg-1* gene that
107 result in the production of the P-like and I-like forms, but not the lipidated form II. We have
108 characterized the functionality of these new alleles of LGG-1/GABARAP for bulk autophagy,
109 selective mitophagy and aggrephagy, but also during starvation and longevity as well as
110 apoptotic cell engulfment and morphogenesis. LGG-1/GABARAP is an essential gene in *C.*
111 *elegans*, but we discovered that most of its functions could be achieved independently of its
112 localization to the membrane. We used genetic analyses to decipher whether LGG-2 could
113 have compensatory function and show that the functionality of these LGG-1 mutants cannot
114 be fully explained by a redundant role of LGG-2. Our data revealed that the precursor form is
115 not capable to maintain either autophagy or developmental functions, and that its cleavage is
116 necessary for functionality of LGG-1 form I. Further analysis of the dynamic of the autophagic
117 flux indicated that LGG-1 form I allows the initiation of autophagosome biogenesis, but is less
118 efficient for autophagosome maturation.

119

120

121 **Results**

122

123 **1) The G116G117 di-Glycine motif is a substrate for cleavage of LGG-1 precursor.**

124 The LGG-1 protein is very highly conserved from residue 1 to residue 116, sharing 92% and
125 74% similarity with the human GABARAP and the yeast Atg8, respectively (Manil-Ségalen *et al.*, 2014). However, the GEVEKKE C-terminus of LGG-1 is unusual by its size and the presence
126 of a non-conserved glycine residue in position 117 (Figure 1B, SupFig 1). Found also in others
127 *Caenorhabditis* species and several nematodes and arthropods, the presence of a C-terminal
128 diglycine is reminiscent of other ubiquitin-like proteins such as SUMO and Nedd8 (Jentsch
129 and Pyrowolakis, 2000; Cappadocia and Lima, 2018). These specificities raise the possibility
130 that the C-terminus could confer particular functions to the precursor form (LGG-1 P) and the
131 cleaved form (LGG-1 I).

132 To analyze the functions of LGG-1 P and LGG-1 I, a CRISPR-Cas9 approach was used to
133 substitute the conserved glycine 116 by an alanine, and generate three specific *lgg-1* mutants
134 with various C-terminus (Figure 1B). In theory, both LGG-1(G116A) and LGG-1(G116AG117A)
135 mutants are expected to accumulate a P form due to the blockage of its cleavage by ATG-4
136 (Wu *et al.*, 2012). Alternatively, the LGG-1(G116AG117*) mutant protein should correspond
137 to a form I. Five supplementary *lgg-1* frameshift mutants were isolated during the CRISPR
138 experiments, resulting in deletion/insertion at the C-terminus (Figure 1 and Supfigure1).
139 Among them, LGG-1(Δ C100-123) and LGG-1(Δ C111-123) have been used later in the present
140 study. The allele *lgg-1(tm3489)*, which deletes 48% of the open reading frame, was used as a
141 negative control (Manil-Ségalen *et al.*, 2014) because it is considered as a null mutant, and
142 thereafter noted LGG-1(Δ). To assess whether *lgg-1(g116a)*, *lgg-1(g116ag117a)* and *lgg-*
143 *1(G116A*)* alleles code for a precursor and form I, respectively, we performed a western blot
144 analysis with two different LGG-1 antibodies (Al Rawi *et al.*, 2011; Springhorn and Hoppe,
145 2019)(Figure 1C). In basal conditions the wild-type LGG-1 is present mainly as form I (13.9
146 kDa) with a low amount of the faster migrating form II and no precursor (14,8 kDa) (Figure
147 1B), while no band was observed in the allele *lgg-1(tm3489)* confirming that it is a *bona fide*
148 null mutant. While the *lgg-1(G116AG117*)* mutant presents a majority form I, the *lgg-*
149 *1(G116A)* mutant accumulates both the expected precursor form and a form I. This indicates
150 that the cleavage of the LGG-1(G116A) precursor is still present although less efficient. In both
151 mutant, an unexpected minor form is observed migrating differently to the lipidated form II,
152 which is no longer detectable. The *lgg-1(G116AG117A)* mutant accumulates the precursor
153 form (96% of the protein) indicating that the cleavage observed in the LGG-1(G116A) is linked
154 to the presence of a second glycine in position 117.

155 This data is the first evidence that the G116 is dispensable for LGG-1 cleavage but confirms
156 that it is essential for its conjugation.

157

158

159

160

161

2) Glycine 116 but not glycine 117 is a substrate for lipidation

To further confirm WB analyses, we next performed immunofluorescence in the embryo to analyze the subcellular localization of LGG-1 protein in the various alleles. At the 1 cell-stage and around 100 cells-stage two selective autophagy processes have been well characterized, allophagy and aggrephagy respectively embryo (Zhang *et al.*, 2009; Al Rawi *et al.*, 2011; Sato and Sato, 2011). The punctate staining observed in the wild-type animals (Figure 1D) with independent anti-LGG-1 antibodies is characteristic of the autophagosomes formed during each process, and is absent in the *lgg-1(Δ)* mutant (Figure 1E). The three mutants *lgg-1(G116A)*, *lgg-1(G116AG117A)* and *lgg-1(G116AG117*)* present no puncta but a diffuse cytosolic staining confirming that neither the precursor nor the form I are able to conjugate to the membrane (Figure 1F-L). Moreover, the increase of the diffuse signal (quantification in Figure 1M) confirms that the protein is less degraded in these mutants. To exclude the possibility that a small portion -below the sensitivity of the experiment of the protein was excluded by analyzing the *epg-5 (RNAi)*, which results in the strong accumulation of autophagosome (Figure 1N-Q).

Together, these results indicate that G116 is essential for LGG-1 conjugation to membranes. LGG-1(G116AG117*) is present only as a precursor form while LGG-1(G116A) produces both a precursor and a form I. The form I of LGG-1(G116A) is presumably ending with a glycine at position 117, while those of LGG-1(G116AG117*) by an alanine in position 116. This allelic series defines an ideal situation to address the respective roles of the precursor and the form I in absence of the lipidated form II.

3) Autophagy is functional in LGG-1(G116A) - The lipidation of LGG-1 is dispensable for autophagy

To address the functionality of the precursor and form I of LGG-1, we analyzed autophagy related processes which has been well characterized during *C. elegans* life cycle. Selective autophagy was studied in the embryonic development, during which a mitophagy and an aggrephagy process are occurring in a stereotype manner upon fertilization and few hours later, respectively (Figure 2A-J).

In both situations, the degradation of selective cargos was observed in the live embryo using specific GFP markers of the paternal mitochondria (HSP-6::GFP, Figure 2A-E) and the P-granules (SEPA-1::GFP, Figure 2F-J). In *lgg-1(Δ)* animals, the cargo accumulate at a stage when they are degraded in the wild-type situation. In *lgg-1(G116A)*, but not in *lgg-1(G116AG117*)* mutants both paternal mitochondria and SEPA-1 are degraded suggesting that LGG-1(G116A) maintains an autophagy activity (Figure 2C-E, H, I). Bulk autophagy was then studied in the context of the adult longevity (Figure 2K) and after induction by starvation of the first stage larvae (Figure 2L). While *lgg-1(G116AG117*)* mutants displayed a marked decrease of the longevity and the starvation survival, *lgg-1(G116A)* mutants showed no difference with the wild type animals. Finally, the capacity of *lgg-1(G116A)* mutants to perform autophagy was confirmed in two other processes, the elimination of apoptotic corpses (Figure 2M, (Jenzer *et al.*, 2019) and upon acute heat stress (not shown, (Chen *et al.*, 2021)). Once again, the *lgg-*

203 *l(G116AG117*)* mutants are defective in these autophagy processes indicating that it is a
204 particular feature of the LGG-1(G116A) protein.

205 To address whether the autophagy activity is dependent of the accumulation of the precursor
206 form, we then analyzed the aggrephagy process in the *lgg-1(G116AG117A)* mutant. The
207 accumulation of SEPA-1::GFP in *lgg-1(G116AG117A)* animals indicates that the precursor form
208 is not able to promote autophagy (Figure 2J).

209 Altogether, our data demonstrate that despite its absence of localization at the
210 autophagosome, LGG-1(G116A) achieves a functional autophagy in both physiological and
211 stress conditions. This is the first *in vivo* evidence that the autophagy functions of LGG-
212 1/GABARAP can be uncoupled from its membrane conjugation. The non-function of LGG-
213 1(G116AG117*) suggests that the presence of a C-terminal glycine is essential for the
214 autophagic function of form I.

215

216

217 **4) The essential function of LGG-1 during development is unrelated to autophagy and** 218 **independent of its conjugation.**

219 The developmental phenotypes of three mutants *lgg-1(G116A)*, *lgg-1(G116AG117A)* and *lgg-1(G116AG117*)*
220 were then explored in embryo, larvae and adults and compared with *lgg-1(Δ)*
221 and wild-type animals (Figure 3). We confirmed that *lgg-1(Δ)* homozygous animals present a
222 massive lethality, during late embryogenesis or first larval stage (Figure 3B, H) (Manil-Ségalen
223 *et al.*, 2014). However, a careful analysis revealed that rare escapers, representing 11% of the
224 progeny, were able to reach adulthood and reproduce, allowing to maintain *lgg-1(Δ)*
225 homozygous population.

226 Neither *lgg-1(G116A)* nor *lgg-1(G116AG117*)* homozygous animals present any observable
227 defect in development (Figure 3C, D, H) or adulthood and they reproduce at a similar rate than
228 wild-type animals. By contrast, *lgg-1(G116AG117A)* and the five independent mutants
229 harboring various frameshifts of the C-terminus present a very strong lethality with the
230 characteristic embryonic phenotype of *lgg-1(Δ)* animals (Figure 3E-H and not shown). Among
231 them *lgg-1(Δ111-123)* presents a premature stop codon at position 111 and two others a
232 frameshift in position 114 leading to an extension of the C-terminus (Figure 3 and FigSup1).

233 These data indicate that the form I of both LGG-1(G116A) and LGG-1(G116AG117*) but not
234 the precursor form is sufficient to recapitulate the normal development and viability, and
235 support that its developmental functions are independent from its conjugation to the
236 membrane. These data suggest that in a wild-type context the cleavage of the C-terminal part
237 is essential for the developmental function of form I, but contrary to autophagy functions, the
238 presence of a glycine at the C-terminus is not a requisite.

239

240 **5) The mutation of G116A blocks the autophagy activity of Atg8 in yeast**

241 Our results demonstrate that the localization of LGG-1 to the membrane is dispensable for its
242 functions. To check whether it is a particularity of the *C. elegans* LGG-1/GABARAP a similar
243 strategy was performed for Atg8 in the yeast *S. cerevisiae*. Atg8 precursor ends with an

244 arginine at position 117 ([FigSup2](#)) and using transgenic strains Oshumi lab (Kirisako *et al.*,
245 2000; Nakatogawa *et al.*, 2012) have shown that G116 is essential for autophagy. We target
246 the endogenous *Atg8* by an homologous recombination strategy to generate *Atg8(G116A)*
247 and *Atg8(G116AR117*)* alleles. The functionality of autophagy was assessed with the
248 Pho8 Δ 60 (Noda and Klionsky, 2008) and quantification demonstrated that both *Atg8(G116A)*
249 and *Atg8(G116AR117*)* mutants are unable to achieve a functional autophagic flux ([SupFig2](#)).
250 This result was further confirmed by the inability of both mutants to survive upon nitrogen
251 starvation. These data confirm that in *S. cerevisiae* the autophagic function of *Atg8* is strictly
252 dependent of its cleavage/conjugation and suggest that form I functions could be a
253 particularity of the GABARAP family or the *C. elegans* LGG-1.

254

255 **6) Functionality of LGG-1(G116A) partially depends on LGG-2 for autophagy but not** 256 **development**

257 Our previous study have shown a partial redundancy of LGG-1 and LGG-2 in resistance to
258 starvation and longevity (Alberti *et al.*, 2010) which raises the possibility of compensation of
259 *lgg-1(G116A)* by *lgg-2*. To analyze this possibility we used the large deletion mutant *lgg-*
260 *2(tm5755)*, which is considered as a null (Manil-Ségalen *et al.*, 2014), and constructed the
261 double mutant *lgg-1(G116A);lgg-2(tm5755)*. Similarly to the single mutants *lgg-1(G116A)* and
262 *lgg-2(tm5755)*, the double *lgg-1(G116A);lgg-2(tm5755)* animals were viable and presented no
263 morphological defect ([Figure 4A-F](#)). These data indicate that the correct development of *lgg-*
264 *1(G116A)* is not due to a compensative mechanism involving *lgg-2*. In contrast it was not
265 possible to obtain *lgg-1(Δ);lgg-2(tm5755)* animals, suggesting that LGG-2 have some
266 redundant functions with LGG-1 during development.

267 Next, we addressed whether LGG-2 compensates the autophagy functions in *lgg-1(G116A)*
268 animals. Because *lgg-1(Δ);lgg-2(tm5755)* animals are not viable, we constructed as a negative
269 control the viable double mutant *lgg-1(G116AG117*);lgg-2(tm5755)*. If LGG-2 compensates
270 LGG-1(G116A) for autophagy, *lgg-1(G116A);lgg-2(tm5755)* animals should behave similarly to
271 *lgg-1(G116AG117*);lgg-2(tm5755)*. The *lgg-1(G116A);lgg-2(tm5755)* animals presented a
272 decrease for both survival to starvation and longevity compare *lgg-1(G116A)* single mutant.
273 However, they survived better than *lgg-1(G116AG117*);lgg-2(tm5755)* animals ([Figure 4G, H](#)).
274 These results indicate that only a part of the autophagy functionality of LGG-1(G116A)
275 depends of LGG-2. Selective autophagy during early embryogenesis was then quantitatively
276 analyzed in the double mutant strains ([Figure 4I-K](#)) using HSP-6::GFP. Paternal mitochondria
277 were eliminated in the *lgg-1(G116A);lgg-2(tm5755)* animals but with some delay compare to
278 *lgg-1(G116A)* animals. This data indicates that LGG-1(G116A) is necessary and sufficient for
279 the allophagy process. Interestingly, this detailed analysis also revealed a slight delay in the
280 elimination of paternal mitochondria in *lgg-1(G116A)* animals.

281 Together our results show that there is a partial redundancy between LGG-1 and LGG-2 in
282 autophagy and possibly in development, and demonstrate that LGG-1(G116A) maintains an
283 autophagy activity independently of LGG-2. The observation that LGG-1(G116A) is less

284 efficient than the wild-type suggests that one or several of its functions in autophagy are more
285 affected by a loss of membrane localization.

286

287

288 **7) The autophagy flux is slowed down in LGG-1(G116A)**

289 To understand whether the absence of lipidation of LGG-1 affects specifically some of its
290 functions, we compared the autophagic flux and the dynamic of autophagosome formation in
291 *lgg-1(G116A)*, *lgg-1(G116AG117*)* and *lgg-1(Δ)* animals. We first focused on the early embryo
292 because the autophagy process is stereotyped and well characterized particularly concerning
293 the nature of the cargos and the timing for their degradation. Moreover, the autophagosomes
294 sequestering the paternal mitochondria are clustering and can be visualized using LGG-2
295 antibodies (Figure 5A) (Manil-Ségalen *et al.*, 2014). In *lgg-1(Δ)* mutant, LGG-2
296 autophagosomes are not detected as a cluster but are spread out as single puncta in the whole
297 embryo, and persist after the 15-cells stage (Figure 5B, E). This indicates that LGG-2 positive
298 structures can be formed in absence of LGG-1, but are not correctly localized and not
299 degraded properly, presumably because of the role of LGG-1 in cargo recognition (Sato *et al.*,
300 2018) and of a latter involvement in the maturation of autophagosomes. The pattern of LGG-
301 2 is somehow different in *lgg-1(G116A)* and *lgg-1(G116AG117*)* mutants, forming spread
302 structures persisting longer and the size of which could be increased (Figure 5C-F). These data
303 suggest that both forms I affect the autophagic flux and could modulate the biogenesis of the
304 autophagosomes. We then checked if the localization of LGG-2 structures correlates with
305 paternal mitochondria in *lgg-1(G116A)* or *lgg-1(G116AG117*)* mutants. Surprisingly, in both
306 mutants we did not observe an increase of the colocalization between HSP-6::GFP and LGG-2
307 (Figure 5G-J). These data confirmed that the elimination of paternal mitochondria in *lgg-1(G116A)*
308 animals is not achieved through an enhanced recruitment of LGG-2. It also suggests
309 that autophagic structures devoid of both LGG-1 and LGG-2 are responsible of paternal
310 mitochondria degradation in *lgg-1(G116A)*.

311 Next, we analyzed the autophagy flux in 50-100 cells embryo, by quantifying the colocalization
312 between ATG-18/WIPI2 and LGG-2 ::GFP in *lgg-1(G116A)* and *lgg-1(G116AG117*)* mutants
313 (Figure 5K-Q). ATG-18::GFP is considered as an earlier marker than LGG-1 and LGG-2 in the
314 autophagosome biogenesis (Chang *et al.*, 2017) and its mammalian homolog WIPI2 labels the
315 omegasome (Polson *et al.*, 2010). In the wild-type and *lgg-1(G116A)* animals more than 40%
316 of the ATG-18 structures colocalize with LGG-2, while less than 30% of them are colocalizing
317 in the *lgg-1(Δ)* and the *lgg-1(G116AG117*)* mutants. This indicates that LGG-1(GA) is as
318 efficient as the LGG-1(+) for the early step of autophagosome biogenesis. It also suggests that
319 the LGG-1(GA) form I retains a particular function which has been lost in LGG-1(G116AG117*).
320 To confirm these observations, we use electron microscopy to characterize the
321 autophagosomes in the *lgg-1(G116A)* and *lgg-1(G116AG117*)* and wild-type early embryos
322 (Figure 6). In wild-type animals autophagosomes containing cellular materials and in particular
323 the characteristic paternal mitochondria (Zhou *et al.*, 2016) were observed in 1-4 cells (5 for 7
324 sections analyzed) but not in 10 cells embryos (Figure 6A). In *lgg-1(G116A)* embryos, the

325 number of autophagosomal structures increased both in 1-4 cells (23 for 4 sections) and in
326 later embryos (133 for 14 sections). The autophagosomes were closed and contained various
327 cellular materials some of which identifiable as membrane compartments (Figure 6B-E). The
328 structures observed in *lgg-1(G116AG117)* mutants largely differed from both wild-type and
329 *lgg-1(G116A)*, forming multi-lamellar structures containing cytoplasm mainly devoid of
330 membrane compartments (13 for 12 sections). These abnormal structures were detected in
331 the oocyte as well as the embryo, which also present unsequestered paternal mitochondria
332 (Figure 6G-I).

333 Altogether, these data support the conclusion that LGG-1(G116A), but not LGG-
334 1(G116AG117*), is able to form functional autophagosomes which degradation is delayed.

335

336

337 **8) LGG-1 form I regulates negatively the initiation of the autophagy**

338 The analyses of LGG-1(G116A) indicate that most of the functions of LGG-1 in autophagy can
339 be achieved by the non lipidated form I. By comparison with the non functional LGG-
340 1(G116AG117*) it appears that the most important function resides in the early steps of
341 autophagic flux. Data in yeast and mammals have revealed that Atg8/LC3/GABARAP can
342 interact with ULK1 and modifies the kinase activity of the ULK1 complex(Chang *et al.*, 2017).
343 Moreover, *in vitro* studies (Wu *et al.*, 2015) have shown that LGG-1 but not LGG-2 can
344 directly binds UNC-51, the *C. elegans* homolog of ULK1. In absence of specific tools to monitor
345 the kinase activity of UNC-51, we performed a genetic approach to decipher the function of
346 LGG-1 form I in the induction of autophagy. Using ATG-18::GFP, the initiation events were
347 quantified *in vivo* for *lgg-1(G116A)*, *lgg-1(G116AG117*)* and *lgg-1(RNAi)* embryos in control
348 or UNC-51 depleted conditions (Figure 7). As expected, depletion of UNC-51 results in the
349 decrease ATG-18::GFP puncta (Figure 7A, E, I). In *lgg-1(RNAi)* embryos, a marked increase of
350 puncta number and intensity was observed (Figure 7B), which could result from a blockage of
351 the autophagy flux after initiation has started. However, the double depletion of UNC-51 and
352 LGG-1 showed a further increase in the number of initiation events (Figure 7F, I), suggesting
353 that LGG-1 negatively controls the induction. In *lgg-1(G116AG117*)* mutants the number of
354 ATG-18::GFP puncta is increased but no further significant increase was observed upon UNC-
355 51 depletion (Figure 7D, H, I). For *lgg-1(G116A)* animals, no difference was observed in the
356 number of puncta with the wild-type animals and a weak decrease of their intensity was
357 detected. Moreover, the depletion of UNC-51 did not induce any increase confirming that
358 LGG-1(G116A) almost behave like the wild-type LGG-1 for the initiation (Figure 7C, G, I).

359

360 **Discussion**

361

362 Our study demonstrate that *C. elegans* is a good paradigm for analyzing the specificity and the
363 redundancy of the GABARAP and LC3 family and decipher the functions of the precursor, the
364 cytosolic form I and the lipidated form II. In mammalian cell lines, an elegant CRISPR strategy

365 allowed to knock out together 6 LC3/GABARAP homologs, but point mutations of the
366 conserved glycine have not been reported (Nguyen *et al.*, 2016). Most of the studies on the
367 terminal glycine used transgenic overexpression constructs (Kabeya, 2004; Chen *et al.*, 2007;
368 Poillet-Perez *et al.*, 2017).

369 Our data is the first evidence that LGG-1/GABARAP function in *C. elegans* development is
370 independent of autophagy and not dependent of its conjugation. The precursor is not
371 functional indicating that its C-terminus is not compatible for developmental functions, while
372 either the A116 or the G117 terminus is functional compatible. Non autophagic functions for
373 LC3/GABARAP have been identified in eukaryotic cells (Schaaf *et al.*, 2016; Wesch, Kirkin and
374 Rogov, 2020), apicomplex parasites (Mizushima and Sahani, 2014; Lévêque *et al.*, 2015), and
375 yeast (Liu *et al.*, 2018; Ishii *et al.*, 2019) but the role of the cytosolic forms are poorly
376 documented especially in the context of the development. A recent publication has shown
377 that the drosophila Atg8a is involved in several developmental processes independently of
378 autophagy and lipidation (Jipa *et al.*, 2020). The two Atg8 homologs of drosophila are highly
379 similar and both correspond to GABARAP homologs (Manil-Ségalen *et al.*, 2014). It is possible
380 that duplication of Atg8 during evolution allows the acquisition of specific developmental
381 functions by GABARAP proteins.

382 Our results also revealed that both glycine 116 and 117 of LGG-1 can be a substrate for
383 cleavage of the precursor. Further studies would be necessary to determine if the cleavage is
384 present in the wild-type LGG-1 or only occurs when G116 is mutated. The former hypothesis
385 open the possibility of differential functions for the two forms, however, the non conservation
386 of this di-glycine in many species supports a particularity restricted to *C. elegans* and few
387 others species.

388 The most surprising result from our study is the discovery that LGG-1(G116A) is functional for
389 all the autophagy processes than have been tested, covering physiological or stress conditions
390 and selective or bulk autophagy. Several studies previously identified that a very specific type
391 of autophagy persist in mutants of the conjugation machinery (Nishida *et al.*, 2009; ARAKAWA
392 *et al.*, 2017) but to our knowledge, it is the first report demonstrating that autophagy is almost
393 normal *in vivo* in a non lipidable mutant.

394 Several studies have used mutations in the conjugation machinery (atg3, atg5, atg7) or the
395 atg4 protease to analyze the role of the form I and the precursor, respectively (Fujita *et al.*,
396 2008; Hirata, Ohya and Suzuki, 2017, p. 7; Hill *et al.*, 2019; Ohnstad *et al.*, 2020; Vujić *et al.*,
397 2021). The presence of several homologs of Atg4 in mammals which specificity versus
398 LC3/GABARAP is unknown and its dual role in the cleavage of the precursor and the
399 delipidation tremendously complicate the analysis of the phenotypes. Similarly, blocking the
400 conjugation system presumably affects all LC3/GABARAP homologs. One study using tumor
401 cell lines proposed that part of the autophagy functions of GABARAP1 in is independent of
402 its lipidation (Poillet-Perez *et al.*, 2017).

403

404 The combination of two characteristics of the *C. elegans* Atg8 repertoire could explain why
405 autophagy is functional with LGG-1(G116A) but not LGG-1(G116AG117*). i) The presence of

406 at least one residue after the conserved G116 in LC3/GABARAP suggests that the sequence of
407 the c-terminal end of the precursor is not important *per se* but the cleavage itself is essential.
408 It is possible that similarly to other Ubiquitin-like proteins this step is a prerequisite for
409 LC3/GABARAP activation. Form I of LGG-1(G116A) results from a cleavage and present a
410 terminal glycine. To these regards it is more comparable to the wild-type form I than LGG-
411 1(G116AG117*) which is not cleaved and ends with an alanine. ii) *C. elegans* possesses both a
412 LC3 and a GABARAP homolog, and the functionality of autophagy in *lgg-1(G116A)* mutant
413 partially resides in the presence of LGG-2.
414 In this context, our genetic approach bring new insights concerning the implication of LGG-1
415 form I in various steps of autophagy, namely, the initiation, the recognition of cargoes, the
416 elongation of autophagosome, the closure of autophagosome and fusion with lysosome.
417 Our data indicate that form I of LGG-1 is sufficient for initiation, elongation and closure of
418 autophagosomes but that lipidated LGG-1 is important for the dynamic of degradation. This
419 report is the first evidence of a late function for LGG-1 that have been previously hypothesized
420 (Manil-Ségalen *et al.*, 2014). However the redundancy with LGG-2 is presumably a factor
421 important for the maturation and degradation process. Despite the effective degradation of
422 specific cargoes in *lgg-1(G116A)* mutant, it is unclear how the form I is still able to ensure such
423 a role. One can assume that interaction through LIR domains is still possible with LGG-
424 1(G116A) but in absence of lipidation, the extension of the phagophore around the cargoes
425 should be affected. If supplementary analyses will be necessary to identify the mechanism of
426 action of LGG-1 form I, our result is a supplementary *in vivo* illustration of the high level of
427 plasticity and robustness of autophagy.

428

429

430 **Acknowledgments**

431 The authors would like to thank Thorsten Hoppe for providing LGG-1 and the Caenorhabditis
432 Genetic Center, which is funded by the NIH National Center for Research Resources (NCRR),
433 for providing reagents. We are grateful to Legouis lab members for helpful discussions. The
434 present work has benefited from the core facilities of Imagerie-Gif, ([http://www.i2bc.paris-](http://www.i2bc.paris-saclay.fr)
435 [saclay.fr](http://www.i2bc.paris-saclay.fr)), member of IBiSA (<http://www.ibisa.net>), supported by “France-Biolmaging” (ANR-
436 10-INBS-04-01), and the Labex “Saclay Plant Science” (ANR-11-IDEX-0003-02).
437 This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (project EAT, ANR-12-BSV2-
438 018), the Association pour la Recherche contre le Cancer (SFI20111203826) and the Ligue
439 contre le Cancer (MM). RoL received a fellowship from Fondation pour la Recherche Médicale.
440 None of the authors of this work have a financial interest related to this work.

441

442

443 **Materials and Methods**

444

445 ***C. elegans* culture and strains**

446 Nematode strains were grown on nematode growth media (NGM) (autoclaved 1.5g NaCl
447 (Sigma-Aldrich, 60142) 1.5g bacto peptone (Becton-Dickinson, **211677**), 0.5ml cholesterol
448 (Sigma-Aldrich, C8667) 5mg/ml, 10g bacto agar (Becton-Dickinson, 214010) supplemented
449 with 500µl CaCl₂ (Sigma-Aldrich, C3306) 1M, 500µl MgSO₄ (Sigma-Aldrich, M5921) 1M, 10ml
450 KH₂PO₄ (Sigma-Aldrich, P5655) 1M, 1650µl K₂HPO₄ (Sigma-Aldrich, 60356) 1M and fed with
451 *Escherichia coli* strain OP50. The *C. elegans* Bristol N2 strain was used as a wild-type strain.
452 Other strain genotypes are listed in table 1.

453 For starvation experiments, adults hermaphrodites were bleached to obtain synchronized L1
454 stages. L1 are incubated in 0.5 mL sterilized M9 at 20°C on spinning wheel. At each time point,
455 an aliquot from each sample tube was placed on a plate seeded with *E. coli* OP50. The number
456 of worms surviving to adulthood was counted 2 or 4 days after.

457 Life-span analysis was performed on more than 100 animals for each genotype and in
458 independent duplicate. Kaplan-Meier method and Log-Rank (Mantel-Cox) test were
459 performed using GraphPad Prism 9.0 software (Graphpad Software INC.,).

460

461 ***Strained obtained by CRISPR Cas9***

462 We used CRISPR –Cas 9 approach optimized for *C.elegans*, using a *dpy-10* co-CRISPR protocol
463 (*Paix et al., 2015*). We co-targeted *dpy-10* locus with a reparation template that introduced a
464 missens mutation causing dominant roller phenotype which has been spotted under binocular.
465 We used <http://crispr.mit.edu/> to help us to choose the Cas9 cleavage site (NGG) close to
466 the edit site , the best sequence of the crRNAs (50 to 75% of GC content) , and also for off-
467 target prediction. CrRNA(s) and repair template(s) were design for *lgg-1* gene and injected
468 with universal Cas9 and tracrRNA in gonad of young adult hermaphrodites. We have used a
469 repair template of *lgg-1* locus containing specific DNA mutation leading the switch of the
470 glycine at the 116 level, into alanine (RD367), or the switch of the two successive C-terminal
471 glycines 116 and 117 into two alanines (RD421), or the first 116 Glycine into alanine and the
472 second 117 glycine by a stop codon (RD420).

473

474 ***RNA mediated interference***

475 RNAi by feeding was performed as described (Kamath & Ahringer, 2003; Timmons & Fire,
476 1998). Fourth-larval stage (L4) animals or embryos were raised onto 1 mM isopropyl-D-
477 b- thiogalactopyranoside (IPTG)-containing nematode growth media (NGM) plates seeded
478 with bacteria (*E. coli* HT115[DE3]) carrying the empty vector L4440 (pPD129.36) as a control or
479 the bacterial clones from the J. Ahringer library, Open Biosystem (*lgg-1*: JA:C32D5.9, *epg-*
480 *5*:).

481

482

483

484 **Western blot**

485 The worms were collected after centrifugation in M9 and then mixed with the lysis buffer
486 described previously (Springhorn et al 2019) (25mM tris-HCl,pH7.6 ; 150mM NaCl ; 1mM
487 ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) 1% Triton X-100 ; 1% sodium deoxycholate (w/v) ; 1%
488 SDS (w/v)) containing glass beads (Sigma-Aldrich 425-600um G8772100G) . They were then
489 denatured using Precellys 24 machine at 6000rpm with incubation for about 5 min twice to
490 cool down the sample. The protein extracts are then centrifuged at 15000 rpm and separated
491 on a NuPAGE 4%-12% Bis- Tris gel (Life Technologies, NP0321BOX). The non-specific sites are
492 then blocked after the incubation for one hour with PBS Tween 0,1% (Tris Base NaCl, Tween20)
493 BSA 2%. Blots were probed with, anti-LGG-1 antibodies, anti-Tubulin (1:2000; Sigma,
494 078K4763) and revealed using HRP-conjugated antibodies (1:10000, promega, W401B) and
495 the Super Signal Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, 34579). Signals were
496 revealed on a Las3000 photoimageer (Fuji) and quantified with Image Lab software.

497

498 **Light microscopy imaging.**

499 Embryos were prepared for immunofluorescence staining by freeze-fracture and methanol
500 fixation at -20°C around 30 minutes. Staining were probed with anti-LGG-1 (1;100) and anti-
501 GABARAP (1;200) . The uterus of about fifty adult hermaphrodites is cut to release the early
502 embryos on a previously poly-L-lysinated slide (0.1%). Late embryos are deposited using a
503 flattened platinum wire and bacteria as glue. Embryos were prepared for
504 immunofluorescence staining by freeze-fracture and methanol fixation at -20°C around 30
505 minutes at -20 ° C. They are then incubated for at least 40 minutes in a solution of PBS
506 (Phosphate Buffer Saline) 1X 0.5% Tween, 3% BSA of 5% milk to block the non-specific sites.
507 Two 30-minute washes in 1X 0.5M tween PBS are performed. The embryos were then
508 incubated with the primary antibodies at 4 ° C. overnight. The concentrations used are α -
509 Gabarap rabbit (1: 200), α -LGG-2 rabbit (1: 100). The embryos then undergo 2 additional
510 washes and were incubated with the secondary antibodies, Alexa488 and Alexa 568 (1: 1000),
511 2 hours at room temperature. The embryos were spotted between slide and coverslip with
512 DABCO (to preserve photobleaching).

513 Epifluorescence images were captured on an AxioImagerM2 microscope (Zeiss) equipped with
514 Nomarski optics, coupled to a camera (AxioCam506mono). Confocal images were cap-
515 tured on a confocal Leica TCS SP8 microscope with serial z sections of 0.5 to 1 μ m. Images
516 were analyzed using the ImageJ Cell Counter plugin .

517

518 **Electron microscopy**

519 Adults one day laying were transferred to M9 20% BSA (Sigma-Aldrich, A7030) on 1%
520 phosphatidylcholine (sigma-aldrich) pre-coated 200 μ m deep flat carriers (Leica Biosystems) ,
521 followed by cryo-immobilization in the EMPACT-2 HPF apparatus (Leica Microsystems; Vienna
522 Austria) as described (Largeau & Legouis, 2019).Cryo-substitution was performed using an
523 Automated Freeze-substitution System (AFS2) with integrated binocular lens and incubating
524 chamber (Leica Microsystems; Wetzlar, Germany) with acetone. Blocks were infiltrated with

525 100% EPON and embedded in fresh EPON (Agar Scientific, R1165). Ultrathin sections of 80 nm
526 were cut on a ultramicrotome (Leica Microsystems, EM UC7) and collected on a formvar and
527 carbon-coated copper slot grid (LFG, FCF-2010-CU-50). Sections were contrasted with 0,05%
528 Oolong tea extract (OTE) for 30 minutes and 0.08 M lead citrate (Sigma-Aldrich, 15326) for 8
529 minutes. Sections were observed with a Jeol 1400 TEM at 120 kV and images acquired with a
530 Gatan 11 Mpixels SC1000 Orius CCD camera.

531

532 **Yeast culture and autophagy assays**

533 The quantitative Pho8Δ60 assay of nonspecific autophagy, was performed as described (T.
534 Noda and J. Klionsky). Cells were grown to log phase in YPD medium then were transferred to
535 nitrogen starvation medium for 4h. At different time point, 5 OD₆₀₀ units of cells were
536 collected, washed and resuspended in ice-cold assay buffer (250mM Tris-HCl, pH 9 ; 10mM
537 MgSO₄ and 10 μM ZnSO₄) with 1mM PMSF. Then cells were broken using glass beads. For the
538 assay, 10 μl of lysed cells are added to 500 μl of ice-cold assay buffer and placed at 30°C for 5
539 min. The reaction is triggered by adding 50 μl of 55 mM α-naphthyl phosphate disodium salt
540 for a period of 20 min at 30°C. The reaction was stopped with 500 μl of 2M glycine-NaOH, pH
541 11. The fluorescence was measured at wavelengths of 345 nm for excitation and 472 nm for
542 emission. The Pho8Δ60 activity correspond at emission per the amount of protein in the
543 reaction (mg) and the reaction time (min).

544

545 **Statistical analyses**

546 GraphPad Software 9.0 was used for statistical tests and for the generation of graphs. P-value
547 calculated using Student's t-test or Mann Whitney test to compared conditions two by two or
548 Kruskal-Wallis test for comparisons between multiple conditions. Results are indicated with:
549 NS (Not Significant— $p>0.05$); * ($0.05>p>0.01$); ** ($0.01>p>0.001$); *** ($0.001>p>0.0001$) and
550 **** ($p<0.0001$).

551

552

553 **References**

- 554 Al Rawi, S. *et al.* (2011) 'Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal
555 mitochondrial DNA transmission', *Science (New York, N.Y.)*, 334(6059), pp. 1144–1147. doi:
556 10.1126/science.1211878.
- 557 Alberti, A. *et al.* (2010) 'The autophagosomal protein LGG-2 acts synergistically with LGG-1 in
558 dauer formation and longevity in *C. elegans*', *Autophagy*, 6(5), pp. 622–633. doi:
559 10.4161/auto.6.5.12252.
- 560 Alemu, E. A. *et al.* (2012) 'ATG8 Family Proteins Act as Scaffolds for Assembly of the ULK
561 Complex: SEQUENCE REQUIREMENTS FOR LC3-INTERACTING REGION (LIR) MOTIFS', *Journal*
562 *of Biological Chemistry*, 287(47), pp. 39275–39290. doi: 10.1074/jbc.M112.378109.
- 563 ARAKAWA, S. *et al.* (2017) 'Molecular mechanisms and physiological roles of Atg5/Atg7-
564 independent alternative autophagy', *Proceedings of the Japan Academy. Series B, Physical*
565 *and Biological Sciences*, 93(6), pp. 378–385. doi: 10.2183/pjab.93.023.
- 566 Baeken, M. W. *et al.* (2020) 'Novel Insights into the Cellular Localization and Regulation of
567 the Autophagosomal Proteins LC3A, LC3B and LC3C', *Cells*, 9(10). doi: 10.3390/cells9102315.
- 568 Betin, V. M. S. and Lane, J. D. (2009) 'Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1
569 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis', *Journal of Cell Science*,
570 122(Pt 14), pp. 2554–2566. doi: 10.1242/jcs.046250.
- 571 Cappadocia, L. and Lima, C. D. (2018) 'Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures,
572 Chemistry, and Mechanism', *Chemical Reviews*, 118(3), pp. 889–918. doi:
573 10.1021/acs.chemrev.6b00737.
- 574 Chang, J. T. *et al.* (2017) 'Spatiotemporal regulation of autophagy during *Caenorhabditis*
575 *elegans* aging', *eLife*, 6. doi: 10.7554/eLife.18459.
- 576 Chen, Y. *et al.* (2021) 'Autophagy facilitates mitochondrial rebuilding after acute heat stress
577 via a DRP-1-dependent process', *The Journal of Cell Biology*, 220(4). doi:
578 10.1083/jcb.201909139.
- 579 Chen, Y., Scarcelli, V. and Legouis, R. (2017) 'Approaches for Studying Autophagy in
580 *Caenorhabditis elegans*', *Cells*, 6(3). doi: 10.3390/cells6030027.
- 581 Chen, Z.-W. *et al.* (2007) 'C-terminal modification is required for GABARAP-mediated
582 GABA(A) receptor trafficking', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society*
583 *for Neuroscience*, 27(25), pp. 6655–6663. doi: 10.1523/JNEUROSCI.0919-07.2007.
- 584 Cherra, S. J. *et al.* (2010) 'Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation', *The*
585 *Journal of Cell Biology*, 190(4), pp. 533–539. doi: 10.1083/jcb.201002108.
- 586 Coyle, J. E. *et al.* (2002) 'Structure of GABARAP in two conformations: implications for
587 GABA(A) receptor localization and tubulin binding', *Neuron*, 33(1), pp. 63–74. doi:

588 10.1016/s0896-6273(01)00558-x.

589 Djeddi, A. *et al.* (2015) 'Sperm-inherited organelle clearance in *C. elegans* relies on LC3-
590 dependent autophagosome targeting to the pericentrosomal area', *Development*
591 (*Cambridge, England*), 142(9), pp. 1705–1716. doi: 10.1242/dev.117879.

592 Fujita, N. *et al.* (2008) 'An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and
593 causes defects in autophagosome closure', *Molecular Biology of the Cell*, 19(11), pp. 4651–
594 4659. doi: 10.1091/mbc.e08-03-0312.

595 Galluzzi, L. and Green, D. R. (2019) 'Autophagy-Independent Functions of the Autophagy
596 Machinery', *Cell*, 177(7), pp. 1682–1699. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.026.

597 Grunwald, D. S. *et al.* (2020) 'GABARAPs and LC3s have opposite roles in regulating ULK1 for
598 autophagy induction', *Autophagy*, 16(4), pp. 600–614. doi:
599 10.1080/15548627.2019.1632620.

600 Herhaus, L. *et al.* (2020) 'TBK1-mediated phosphorylation of LC3C and GABARAP-L2 controls
601 autophagosome shedding by ATG4 protease', *EMBO reports*, 21(1), p. e48317. doi:
602 10.15252/embr.201948317.

603 Hill, S. E. *et al.* (2019) 'Maturation and Clearance of Autophagosomes in Neurons Depends
604 on a Specific Cysteine Protease Isoform, ATG-4.2', *Developmental Cell*, 49(2), pp. 251-266.e8.
605 doi: 10.1016/j.devcel.2019.02.013.

606 Hirata, E., Ohya, Y. and Suzuki, K. (2017) 'Atg4 plays an important role in efficient expansion
607 of autophagic isolation membranes by cleaving lipidated Atg8 in *Saccharomyces cerevisiae*',
608 *PloS One*, 12(7), p. e0181047. doi: 10.1371/journal.pone.0181047.

609 Ishii, A. *et al.* (2019) 'Role of Atg8 in the regulation of vacuolar membrane invagination',
610 *Scientific Reports*, 9(1), p. 14828. doi: 10.1038/s41598-019-51254-1.

611 Jatana, N. *et al.* (2020) 'Human LC3 and GABARAP subfamily members achieve functional
612 specificity via specific structural modulations', *Autophagy*, 16(2), pp. 239–255. doi:
613 10.1080/15548627.2019.1606636.

614 Jentsch, S. and Pyrowolakis, G. (2000) 'Ubiquitin and its kin: how close are the family ties?',
615 *Trends in Cell Biology*, 10(8), pp. 335–342. doi: 10.1016/S0962-8924(00)01785-2.

616 Jenzer, C. *et al.* (2019) 'Autophagy mediates phosphatidylserine exposure and phagosome
617 degradation during apoptosis through specific functions of GABARAP/LGG-1 and LC3/LGG-2',
618 *Autophagy*, 15(2), pp. 228–241. doi: 10.1080/15548627.2018.1512452.

619 Jipa, A. *et al.* (2020) 'Analysis of *Drosophila* Atg8 proteins reveals multiple lipidation-
620 independent roles', *Autophagy*, pp. 1–11. doi: 10.1080/15548627.2020.1856494.

621 Joachim, J. *et al.* (2015) 'Activation of ULK Kinase and Autophagy by GABARAP Trafficking
622 from the Centrosome Is Regulated by WAC and GM130', *Molecular Cell*, 60(6), pp. 899–913.

623 doi: 10.1016/j.molcel.2015.11.018.

624 Joachim, J. *et al.* (2017) 'Centriolar Satellites Control GABARAP Ubiquitination and GABARAP-

625 Mediated Autophagy', *Current Biology*, 27(14), pp. 2123-2136.e7. doi:

626 10.1016/j.cub.2017.06.021.

627 Kabeya, Y. (2004) 'LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane

628 depending on form-II formation', *Journal of Cell Science*, 117(13), pp. 2805-2812. doi:

629 10.1242/jcs.01131.

630 Kirisako, T. *et al.* (2000) 'The Reversible Modification Regulates the Membrane-Binding State

631 of Apg8/Aut7 Essential for Autophagy and the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway',

632 *Journal of Cell Biology*, 151(2), pp. 263-276. doi: 10.1083/jcb.151.2.263.

633 Klionsky, D. J. (2008) 'Autophagy revisited: A conversation with Christian de Duve',

634 *Autophagy*, 4(6), pp. 740-743. doi: 10.4161/auto.6398.

635 Knorr, R. L. *et al.* (2014) 'Membrane morphology is actively transformed by covalent binding

636 of the protein Atg8 to PE-lipids', *PLoS One*, 9(12), p. e115357. doi:

637 10.1371/journal.pone.0115357.

638 Kraft, C. *et al.* (2012) 'Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8

639 regulates autophagy: Regulation of Atg1 kinase function', *The EMBO Journal*, 31(18), pp.

640 3691-3703. doi: 10.1038/emboj.2012.225.

641 Leboutet, R. *et al.* (2020) 'Mitophagy during development and stress in *C. elegans*',

642 *Mechanisms of Ageing and Development*, 189, p. 111266. doi: 10.1016/j.mad.2020.111266.

643 Lévêque, M. F. *et al.* (2015) 'Autophagy-Related Protein ATG8 Has a Noncanonical Function

644 for Apicoplast Inheritance in *Toxoplasma gondii*', *mBio*, 6(6), pp. e01446-01415. doi:

645 10.1128/mBio.01446-15.

646 Liu, X.-M. *et al.* (2018) 'Lipidation-independent vacuolar functions of Atg8 rely on its

647 noncanonical interaction with a vacuole membrane protein', *eLife*, 7. doi:

648 10.7554/eLife.41237.

649 Lystad, A. H. *et al.* (2014) 'Structural determinants in GABARAP required for the selective

650 binding and recruitment of ALFY to LC3B-positive structures', *EMBO reports*, 15(5), pp. 557-

651 565. doi: 10.1002/embr.201338003.

652 Manil-Ségalen, M. *et al.* (2014) 'The *C. elegans* LC3 Acts Downstream of GABARAP to

653 Degrade Autophagosomes by Interacting with the HOPS Subunit VPS39', *Developmental Cell*,

654 28(1), pp. 43-55. doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.022.

655 Mizushima, N. and Sahani, M. H. (2014) 'ATG8 localization in apicomplexan parasites:

656 apicoplast and more?', *Autophagy*, 10(9), pp. 1487-1494. doi: 10.4161/auto.32183.

657 Nakatogawa, H. *et al.* (2012) 'Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote

658 autophagosome biogenesis', *Autophagy*, 8(2), pp. 177–186. doi: 10.4161/auto.8.2.18373.

659 Nakatogawa, H., Ichimura, Y. and Ohsumi, Y. (2007) 'Atg8, a ubiquitin-like protein required
660 for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion', *Cell*, 130(1),
661 pp. 165–178. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.021.

662 Nguyen, T. N. *et al.* (2016) 'Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for
663 autophagosome–lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin
664 mitophagy and starvation', *The Journal of Cell Biology*, 215(6), pp. 857–874. doi:
665 10.1083/jcb.201607039.

666 Nishida, Y. *et al.* (2009) 'Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy',
667 *Nature*, 461(7264), pp. 654–658. doi: 10.1038/nature08455.

668 Noda, T. and Klionsky, D. J. (2008) 'The quantitative Pho8Delta60 assay of nonspecific
669 autophagy', *Methods in Enzymology*, 451, pp. 33–42. doi: 10.1016/S0076-6879(08)03203-5.

670 Ohnstad, A. E. *et al.* (2020) 'Receptor-mediated clustering of FIP200 bypasses the role of LC3
671 lipidation in autophagy', *The EMBO journal*, 39(24), p. e104948. doi:
672 10.15252/embj.2020104948.

673 Pankiv, S. *et al.* (2007) 'p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of
674 Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy', *Journal of Biological Chemistry*, 282(33),
675 pp. 24131–24145. doi: 10.1074/jbc.M702824200.

676 Poillet-Perez, L. *et al.* (2017) 'GABARAPL1 tumor suppressive function is independent of its
677 conjugation to autophagosomes in MCF-7 breast cancer cells', *Oncotarget*, 8(34). doi:
678 10.18632/oncotarget.19639.

679 Polson, H. E. J. *et al.* (2010) 'Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored
680 phagophores and positively regulates LC3 lipidation', *Autophagy*, 6(4), pp. 506–522. doi:
681 10.4161/auto.6.4.11863.

682 Samokhvalov, V., Scott, B. A. and Crowder, C. M. (2008) 'Autophagy protects against hypoxic
683 injury in *C. elegans*', *Autophagy*, 4(8), pp. 1034–1041. doi: 10.4161/auto.6994.

684 Sato, M. *et al.* (2018) 'The autophagy receptor ALLO-1 and the IKKE-1 kinase control
685 clearance of paternal mitochondria in *Caenorhabditis elegans*', *Nature Cell Biology*, 20(1),
686 pp. 81–91. doi: 10.1038/s41556-017-0008-9.

687 Sato, M. and Sato, K. (2011) 'Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered
688 autophagy in *C. elegans* embryos', *Science (New York, N.Y.)*, 334(6059), pp. 1141–1144. doi:
689 10.1126/science.1210333.

690 Schaaf, M. B. E. *et al.* (2016) 'LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related
691 functions', *The FASEB Journal*, 30(12), pp. 3961–3978. doi: 10.1096/fj.201600698R.

692 Scherz-Shouval, R. *et al.* (2003) 'The COOH terminus of GATE-16, an intra-Golgi transport

693 modulator, is cleaved by the human cysteine protease HsApg4A', *The Journal of Biological*
694 *Chemistry*, 278(16), pp. 14053–14058. doi: 10.1074/jbc.M212108200.

695 Shpilka, T. *et al.* (2011) 'Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family', *Genome*
696 *Biology*, 12(7), p. 226. doi: 10.1186/gb-2011-12-7-226.

697 Springhorn, A. and Hoppe, T. (2019) 'Western blot analysis of the autophagosomal
698 membrane protein LGG-1/LC3 in *Caenorhabditis elegans*', in *Methods in Enzymology*.
699 Elsevier, pp. 319–336. doi: 10.1016/bs.mie.2018.12.034.

700 Vujić, N. *et al.* (2021) 'ATG7 is dispensable for LC3-PE conjugation in thioglycolate-elicited
701 mouse peritoneal macrophages', *Autophagy*, pp. 1–6. doi:
702 10.1080/15548627.2021.1874132.

703 Weidberg, H. *et al.* (2010) 'LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act
704 differently in autophagosome biogenesis', *The EMBO Journal*, 29(11), pp. 1792–1802. doi:
705 10.1038/emboj.2010.74.

706 Wesch, N., Kirkin, V. and Rogov, V. V. (2020) 'Atg8-Family Proteins-Structural Features and
707 Molecular Interactions in Autophagy and Beyond', *Cells*, 9(9). doi: 10.3390/cells9092008.

708 Wilkinson, D. S. *et al.* (2015) 'Phosphorylation of LC3 by the Hippo Kinases STK3/STK4 Is
709 Essential for Autophagy', *Molecular Cell*, 57(1), pp. 55–68. doi:
710 10.1016/j.molcel.2014.11.019.

711 Wu, F. *et al.* (2012) 'Differential Function of the Two Atg4 Homologues in the Aggrephagy
712 Pathway in *Caenorhabditis elegans*', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(35), pp. 29457–
713 29467. doi: 10.1074/jbc.M112.365676.

714 Wu, F. *et al.* (2015) 'Structural Basis of the Differential Function of the Two *C. elegans* Atg8
715 Homologs, LGG-1 and LGG-2, in Autophagy', *Molecular Cell*, 60(6), pp. 914–929. doi:
716 10.1016/j.molcel.2015.11.019.

717 Zhang, Y. *et al.* (2009) 'SEPA-1 mediates the specific recognition and degradation of P
718 granule components by autophagy in *C. elegans*', *Cell*, 136(2), pp. 308–321. doi:
719 10.1016/j.cell.2008.12.022.

720 Zhou, Q. *et al.* (2016) 'Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal
721 mitochondria upon fertilization', *Science (New York, N.Y.)*, 353(6297), pp. 394–399. doi:
722 10.1126/science.aaf4777.

723 Zhou, Q., Li, H. and Xue, D. (2011) 'Elimination of paternal mitochondria through the
724 lysosomal degradation pathway in *C. elegans*', *Cell Research*, 21(12), pp. 1662–1669. doi:
725 10.1038/cr.2011.182.

726

727

728 **Legends of the figures**

729 **Figure 1 – G116A abolishes the conjugation of LGG-1 to the membrane but not its cleavage.**

730 **A)** Schematic representation of the various isoforms of Atg8s proteins after cleavage of the
731 precursor and reversible conjugation to a phosphatidyl-ethanolamine (PE).

732 **B)** Diagram of the theoretical proteins produced by the allelic *lgg-1* series used in this study.

733 LGG-1(Δ) protein corresponds to the reference allele *lgg-1(tm3489)*, which is considered as a
734 null, all others mutants have been generated using CRISP/Cas9. Black arrows point to the di-
735 glycine residues which are mutated in alanine or stop codon (*). Other deletion mutants of the
736 C-terminus result from non-homologous end joining. The mapping of the epitopes recognized
737 by the LGG-1 antibodies (Ab#1, 2, 3) used in this study are indicated by double arrows.

738 **C** Western blot analysis of endogenous LGG-1 from total protein extracts of larvae-young
739 adults *wild-type*, *lgg-1(G116A)*, *lgg-1(G116AG117*)*, *lgg-1(G116AG117A)*, *lgg-1(Δ)*. Data
740 shown, is representative of three experiments using LGG-1 Ab#3 and was confirmed with
741 Ab#1. The theoretic molecular mass of the precursor, and the form I are 14.8kDa and 14.0
742 kDa, respectively, while the lipidated form II migrates faster. The asterisk indicates an unknown
743 band. The quantification of each LGG-1 isoforms was normalized using tubulin.

744 **(D-M)** Immunofluorescence analysis of endogenous LGG-1 in early and late embryos in *wild-*
745 *type* (D), *lgg-1(Δ)* (E), *lgg-1(G116A)* (F), *lgg-1(Δ 111-123)* (G), *lgg-1(G116AG117*)* (H), *lgg-*
746 *1(G116AG117A)* (I), *lgg-1(Δ 100-123)* (J), using Ab#2 or Ab#3. Box-plots quantification showing
747 the absence of puncta in all *lgg-1* mutants (**K**, n= 19, 13, 11, 10, 6, 7, 6), **L** (n= 18, 14, 12, 10,
748 10, 9,) and the increase of cytosolic staining in *lgg-1(G116A)* and *lgg-1(G116AG117*)*. Kruskal
749 Wallis test, **** p-value<0.0001. The same observation was also obtained with different
750 antibodies, in independent **(N-Q)** Mutant of the cleavage *atg4.1(bp501)* (N), presents some
751 puncta. LGG-1(G116A) and LGG-1(G116AG117*) do not form puncta in autophagosome
752 maturation defective *epg-5(RNAi)* embryo.

753 Scale bar is 10 μ m.

754

755 **Figure 2 –Autophagy is functional in *lgg-1(G116A)* but not in *lgg-1(G116AG117*)* and *lgg-***
756 ***1(G116AG117A)***

757 **(A-D)** *In vivo* epifluorescence imaging of paternal mitochondria (HSP-6::GFP) at the 1-cell and
758 15-cells stages in *wild-type* (A), *lgg-1(Δ)* (B), *lgg-1(G116A)* (C), *lgg-1(Δ 110-123)* (D), *lgg-*
759 *1(G116AG117*)* (H) embryos. The quantification of paternal mitochondria indicates an
760 effective degradation in *wt* and *lgg-1(G116A)* but not in and *lgg-1(Δ)* and *lgg-1(G116AG117*)*
761 animals (E).

762 **(F-J)** *In vivo* epifluorescence images of the aggrephagy marker SEPA-1::GFP in late embryos for
763 *wild-type* (F), *lgg-1(Δ)* (G), *lgg-1(G116A)* (H), *lgg-1(G116AG117*)* (I) and *lgg-1(G116AG117A)*
764 (J). SEPA-1::GFP is degraded in *wt*, and *lgg-1(G116A)* while it accumulates in *lgg-1(Δ)*, *lgg-*
765 *1(G116AG117*)* and *lgg-1(G116AG117A)*.

766 **(K –L)** Bulk autophagy during aging and in stress was assessed by worm longevity (K, log rank
767 test n > 100 animals, ****p-Value<0.0001) and starvation survival (L, Khi-2 test at J15

768 ****<0.0001). In *lgg-1(Δ)* and *lgg-1(G116AG117*)*. The survival is significantly reduced in both
769 conditions, compared to *wt* and *lgg-1(G116A)*, NS: Non-significant. **(M)** Specific degradation
770 of apoptotic corpses is altered in *lgg-1(G116AG117*)* and *lgg-1(Δ)* (Mean with SD n=22, 40,
771 46, 14).

772

773 **Figure 3 - *lgg-1(G116A)* and *lgg-1(G116AG117*)* mutants are viable with no developmental**
774 **defect**

775 DIC images of embryos after morphogenesis in *wild-type* (A), *lgg-1(Δ)* (B), *lgg-1(G116A)* (C),
776 *lgg-1(G116AG117*)*(D), *lgg-1(G116AG117A)* (E), *lgg-1(Δ111-123)* (F), *lgg-1(Δ100-123)* (G).
777 Mutants *lgg-1(G116AG117A)*, *lgg-1(Δ111-123)*, *lgg-1(Δ100-123)*, *lgg-1(Δ)*, present severe
778 developmental defects correlated with strong lethality. White arrows point to the anterior (a)
779 and posterior (p) part of the pharynx. **(H)** Percentage of viability (Experiments were performed
780 in independent (42<n< to 103) (H).

781

782 **Figure 4 – LGG-2 partially compensates *lgg-1(G116A)* mutant for autophagy**

783 **(A-F)** DIC images of embryos after morphogenesis and adults in *wild-type* (A), *lgg-2(tm5755)*
784 (B, F), *lgg-1(G116A);lgg-2(tm5755)* (C, E). Quantification of the percentage of viability for the
785 *lgg-1* mutants (D). *lgg-1(G116A);lgg-2(tm5755)* animals are viable with no morphological
786 defects.

787 **(G-H)** Bulk autophagy during aging and in stress was assessed by worm longevity (G, log rank
788 test n > 100 animals, ***p-Value<0.001) and starvation survival (H, Khi-2 test at J9 ***<0.001).
789 General autophagy is tested physiologically by the analyze of adult survival (log rank test n >
790 100 animals). In double mutant *lgg-1(G116A);lgg-2(tm5755)* and *lgg-1(G116AG117*);lgg-*
791 *2(5755)* the survival is significantly reduced in both conditions compared to *wild-type* and
792 single mutant *lgg-1(G116A)* and *lgg-2(tm5755)*.

793 **(I-K)** *In vivo* epifluorescence imaging of paternal mitochondria (HSP-6::GFP) at the 1-cell 15-
794 cells and 30-cells stages in *lgg-2(tm5755)*, (I) *lgg-1(G116A);lgg-2(tm5755)* (J) embryos and
795 quantification (K). Elimination of mitochondria is efficient but delayed in *lgg-1(G116A);lgg-*
796 *2(5755)* and *lgg-1(G116A)* compared to *wild-type*.

797

798 **Figure 5 – Autophagy flux is slow-down in *lgg-1(G116A)* and blocked in *lgg-1(G116AG117*)***

799 **(A-F)** Confocal images of LGG-2 immunofluorescence in 2 cells, 4 cells and 15 cells in *wild-type*
800 (A), *lgg-1(Δ)* (B), *lgg-1(G116A)* (C), *lgg-1(G116AG117*)* (D) and quantification of the number
801 (E) and size of puncta (F).

802 **(G-J)** Confocal images of the colocalization between HSP-6::GFP (green) and LGG-2 (red) in
803 *wild-type* (G), *lgg-1(G116A)* (H), *lgg-1(G116AG117*)* (I) early embryos and quantification (J,
804 mean and SD n= 9; 20 12). Paternal mitochondria and LGG-2 autophagosomes co-localize in a
805 cluster in *wild-type* but not in *lgg-1(G116A)* and *lgg-1(G116AG117*)*.

806 (K-Q) Colocalization between ATG-18::GFP (green) and LGG-2 (red) in *wild-type* (K), *lgg-1(RNAi)*
807 (*L*), *lgg-1(G116A)* (M), *lgg-1(G116AG117*)* (N) embryos and quantification (O-Q). A decreased
808 co-localization is observed in *lgg-1(RNAi)* and *lgg-1(G116AG117*)* but not *lgg-1(G116A)*.

809

810 **Figure 6 – *lgg-1(G116A)* embryos display an increase of autophagic vesicles and *lgg-***
811 ***1(G116AG117*)* of multimembranous structures**

812 Electron microscopy images of autophagosomes in *wild-type* (A), *lgg-1(G116A)* (B, F) and *lgg-*
813 *1(G116AG117*)* (G, I) early embryos. Autophagosome containing paternal mitochondria
814 (arrows) are observed in *wild-type* and *lgg-1(G116A)* embryos. The latter also present various
815 closed autophagosomes containing cargos, suggesting a delay in the degradative step. In *lgg-*
816 *1(G116AG117*)* no *bona fide* autophagosome are present but multimembranous structures.

817

818 **Figure 7– A non lipidated LGG-1 regulates the initiation of autophagy**

819 (A-H) *In vivo* confocal images of ATG-18::GFP, showing the early steps of autophagosome
820 biogenesis, in *wild-type* (A), *lgg-1(RNAi)* (B), *lgg-1(G116A)* (C), *lgg-1(G116AG117*)* (D), *unc-*
821 *51(RNAi)* (E), *unc-51(RNAi); lgg-1(RNAi)* (F), *unc-51(RNAi); lgg-1(G116A)* (G) and *unc-*
822 *51(RNAi); lgg-1(G116AG117*)*(H) embryos.

823 (I) Boxplot of the number (left, n= 29; n=20; n=33; n=27; n=29; n=24; n=36; n=28) and the
824 mean intensity (right, n= 233, 555, 256, 568, 156, 328,186, 288) of ATG-18::GFP puncta
825 (Kruskal-Wallis test was used (p value *<0,05, **p<0,01 ***p<0,001, ****p<0,0001.)

826

827 **Supplementary Figure 1- Description of *lgg-1* alleles (related to Figure 1)**

828 **A)** Schematic representation of *lgg-1* locus indicating the exon/intron composition and the
829 localization of the PAM used for CRISPR/CAS9. The name of the alleles and the theoretical
830 sequences of the proteins series are indicated. Residues in red are the results of the point
831 mutations or the frameshifts. The red arrow shows the diglycine motif in position 116-117.

832 **B)** Comparison of Atg8/GABARAP homologs in yeast (Sc), Human (Hs), Drosophila (Dm),
833 zebrafish (Dr) and worm (Ce). The conserved core sequence (blue box) is represented with a
834 LOGO analysis and the variable C-terminus sequences are indicated. Green arrows points to
835 the invariable glycine 116.

836

837 **Supplementary Figure 2 – The yeast *Atg8(G116A)* is not sufficient for autophagy**

838 **A)** Schematic representation of the wild-type and mutant Atg8 proteins.

839 **B)** Autophagic activity is abolished in *S. cerevisiae* strains expressing the mutant Atg8 *G116A*
840 or Atg8 *G116A-R117Δ* forms of Atg8. Autophagic activity of WT, *atg1Δ*, *atg8Δ*, *atg8G116A*
841 (clones 1 and 2) and *atg8G116A-R117Δ* (clones 1 and 2) strains was measured using the
842 quantitative Pho8Δ60 assay, before and after 4hours of nitrogen starvation. The data shown
843 are the mean ± s.e.m. of 3 independent experiments. **** p<0,001, Mann-Whitney test.

844 C) *S. cerevisiae* strains expressing the mutant Atg8 G116A or Atg8 G116A-R117Δ forms of Atg8
 845 display the same cell viability defect as the *atg8Δ* mutant. Cells were grown to log phase then
 846 transferred to nitrogen starvation medium. After 2 to 4 days starvation, cells were diluted,
 847 dropped on YPD and cultured for 2 days at 30°C.

848

849 **Supplementary Table 1: Strains used in this study**

Strain name	Description
RD367	<i>lgg-1(pp65) [G116A]</i>
RD368	<i>lgg-1(pp66)</i>
RD363	<i>lgg-1(pp22)</i>
RD351	<i>lgg-1(tm3489)</i>
RD353	<i>lgg-2(tm5755)</i>
RD421	<i>lgg-1(pp142) [G116AG117A]</i>
RD420	<i>lgg-1(pp141) [G116AG117*]</i>
RD441	<i>lgg-1(pp65) [G116A] ; lgg-2(tm5755)</i>
RD440	<i>lgg-1(pp141) [G116AG117*] ; lgg-2(tm5755)</i>
RD435	<i>lgg-1(pp65) [G116A] ; atg-18p::atg-18::gfp+rol-6(su1006)</i>
RD434	<i>lgg-1(pp141) [G116AG117*] ; atg-18p::atg-18::gfp+rol-6(su1006)</i>
MAH 247	<i>sqIs25[atg-18p::atg-18::gfp+rol-6(su1006)]</i>

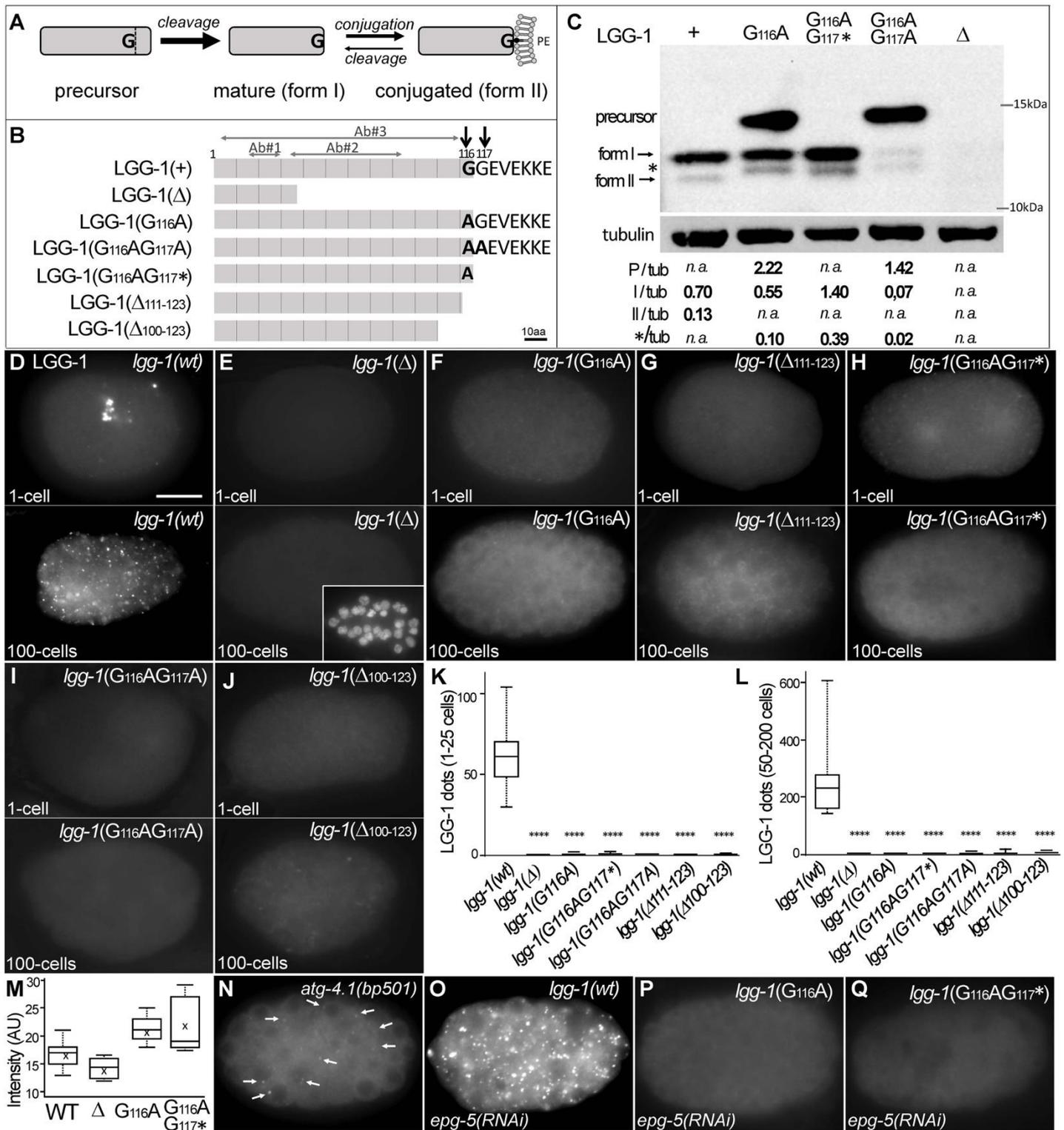


Figure 1- G116A abolishes the conjugation of LGG-1 to the membrane but not its cleavage

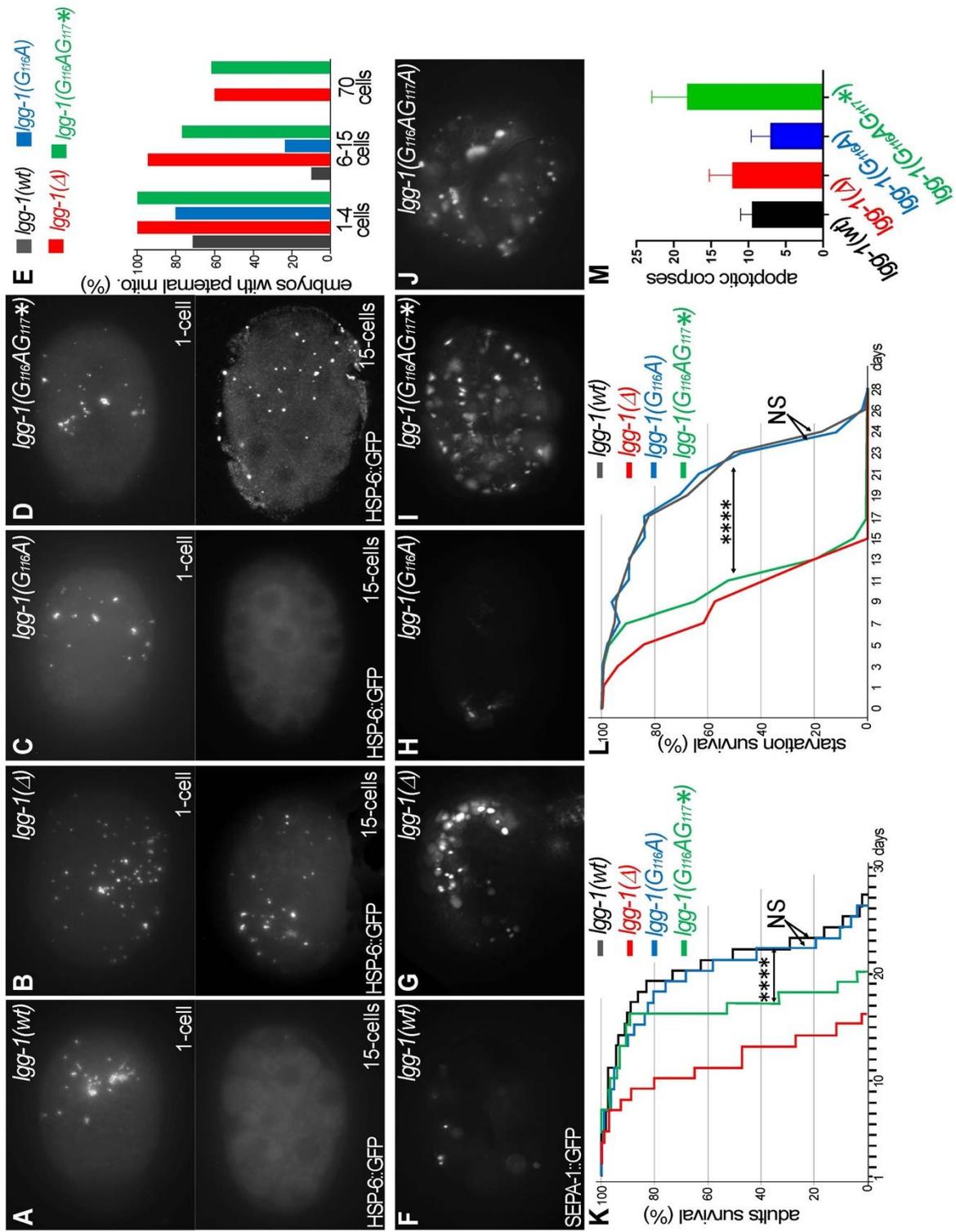


Figure 2 – Autophagy is functional in *Igg-1(G116A)* but not in *Igg-1(G116AG117A)* but not in *Igg-1(G116AG117A)*

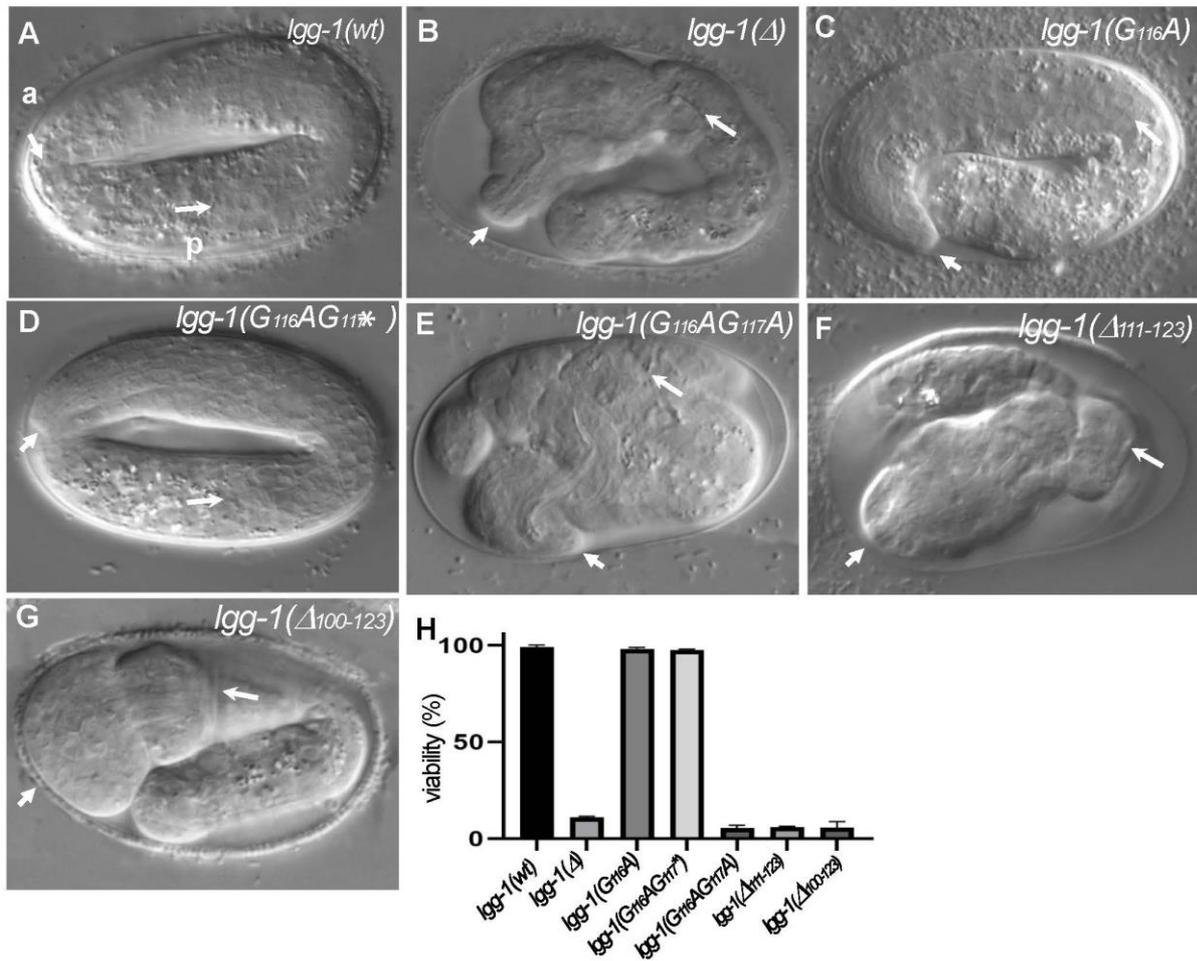


Figure 3- *lgg-1(G116A)* and *lgg-1(G116AG117*)* mutants are viable with no developmental defect

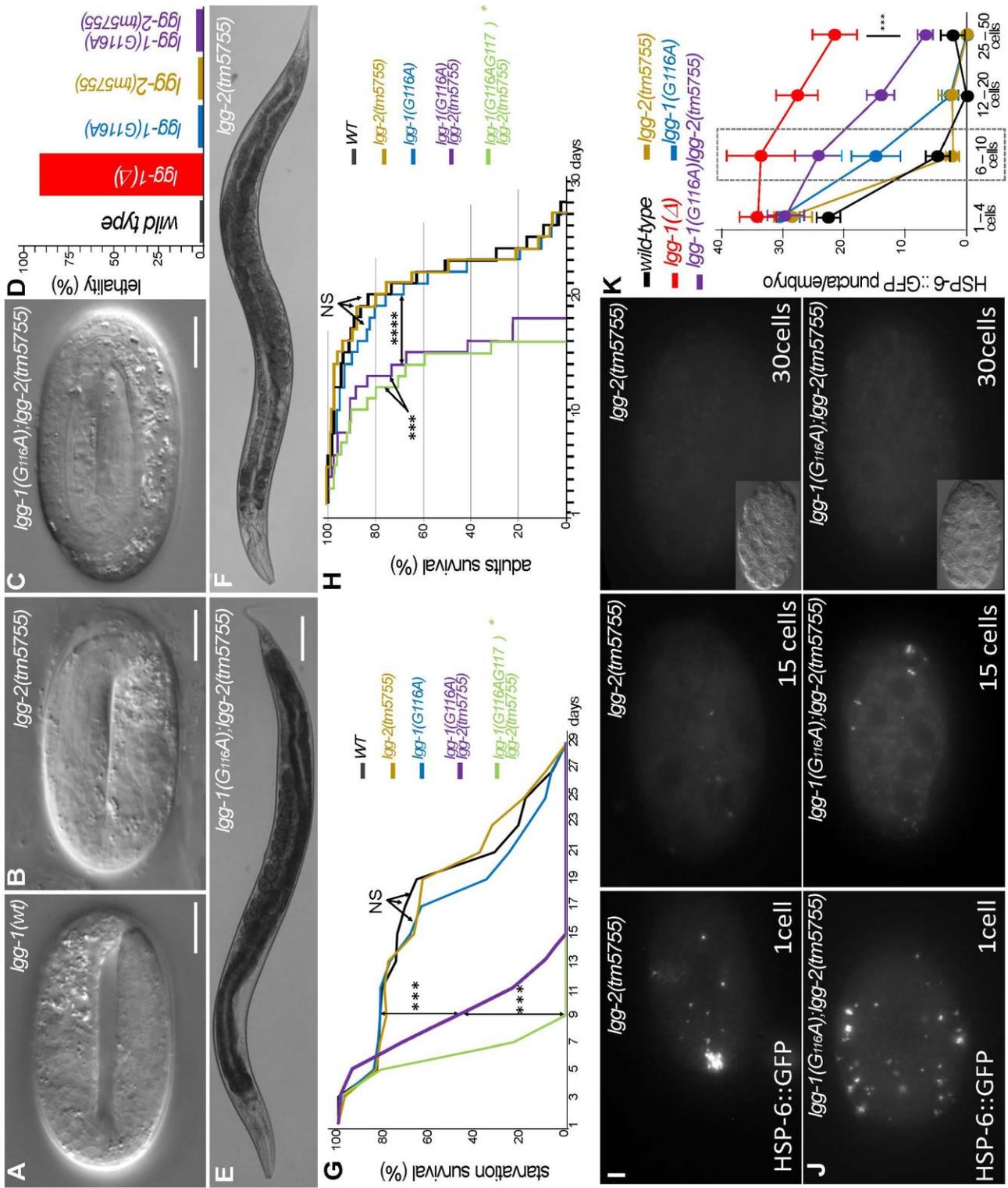


Figure 4- LGG-2 partially compensates *lgg-1*(G116A) mutant for autophagy

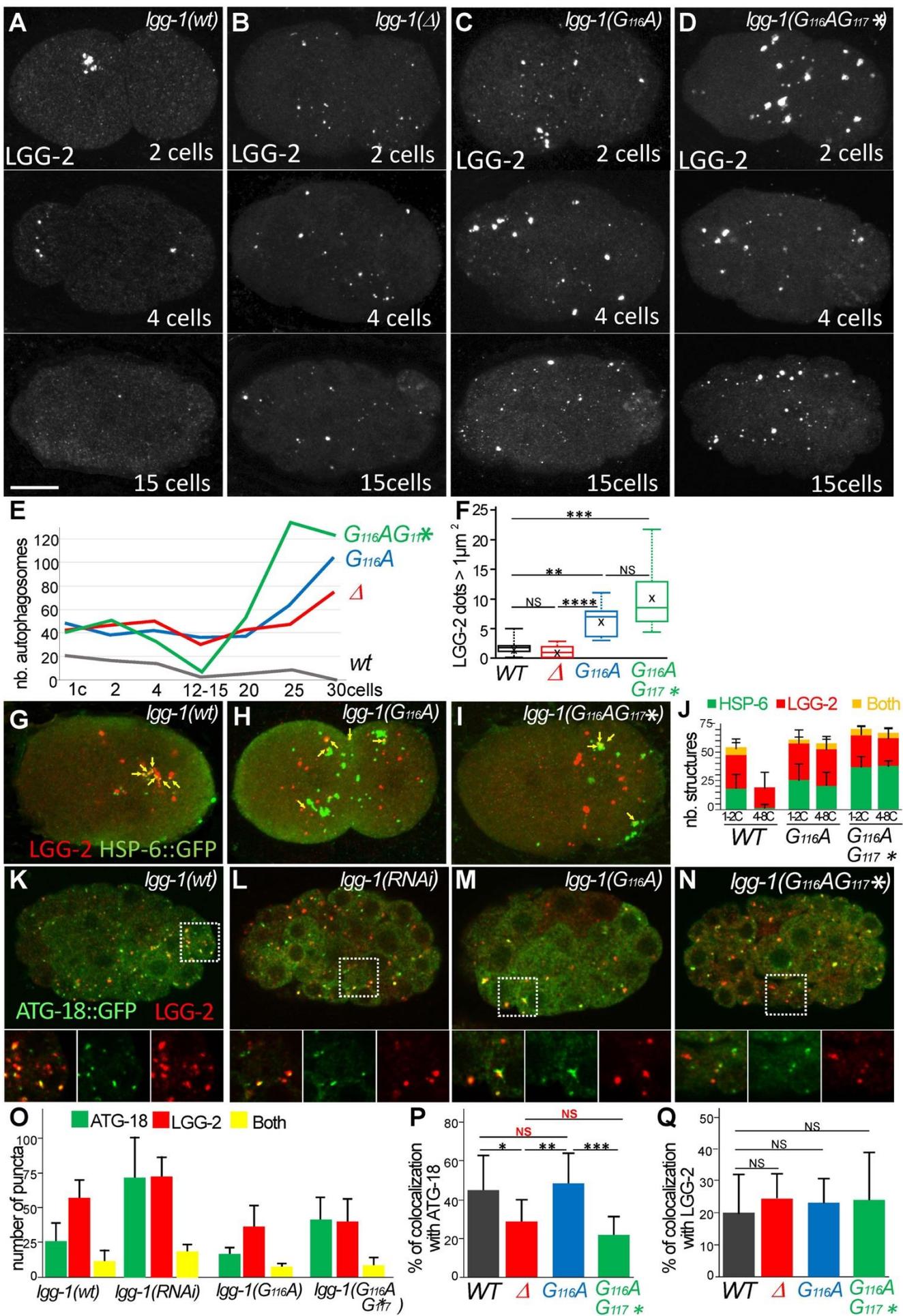


Figure 5- Autophagy flux is slow-down in *lgg-1(G116A)* and blocked in *lgg-1(G116AG117*)*

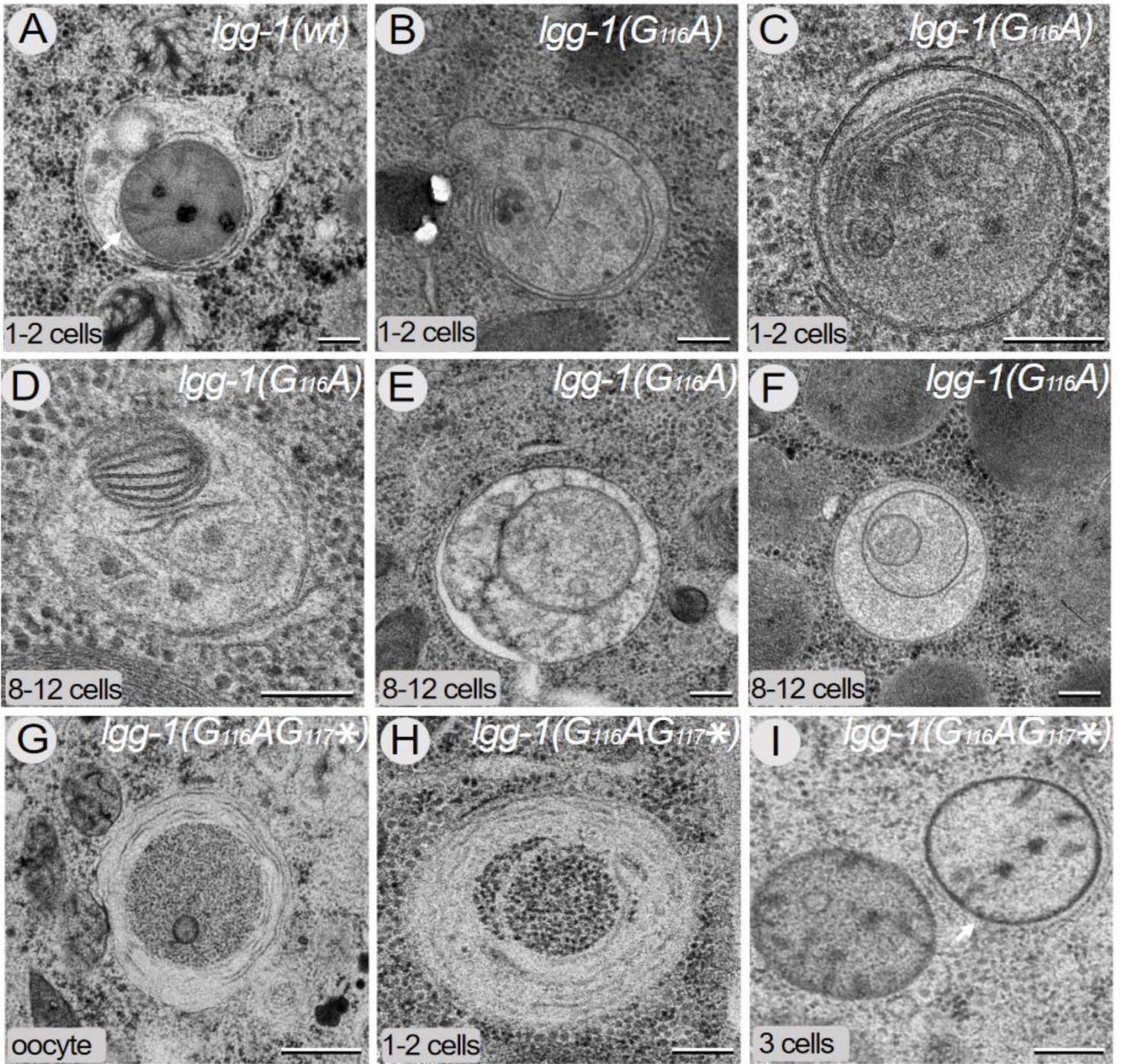


Figure 6- *lgg-1(G116A)* display an increase of autophagic vesicles and *lgg-1(G116AG117*)* multimembranous structures

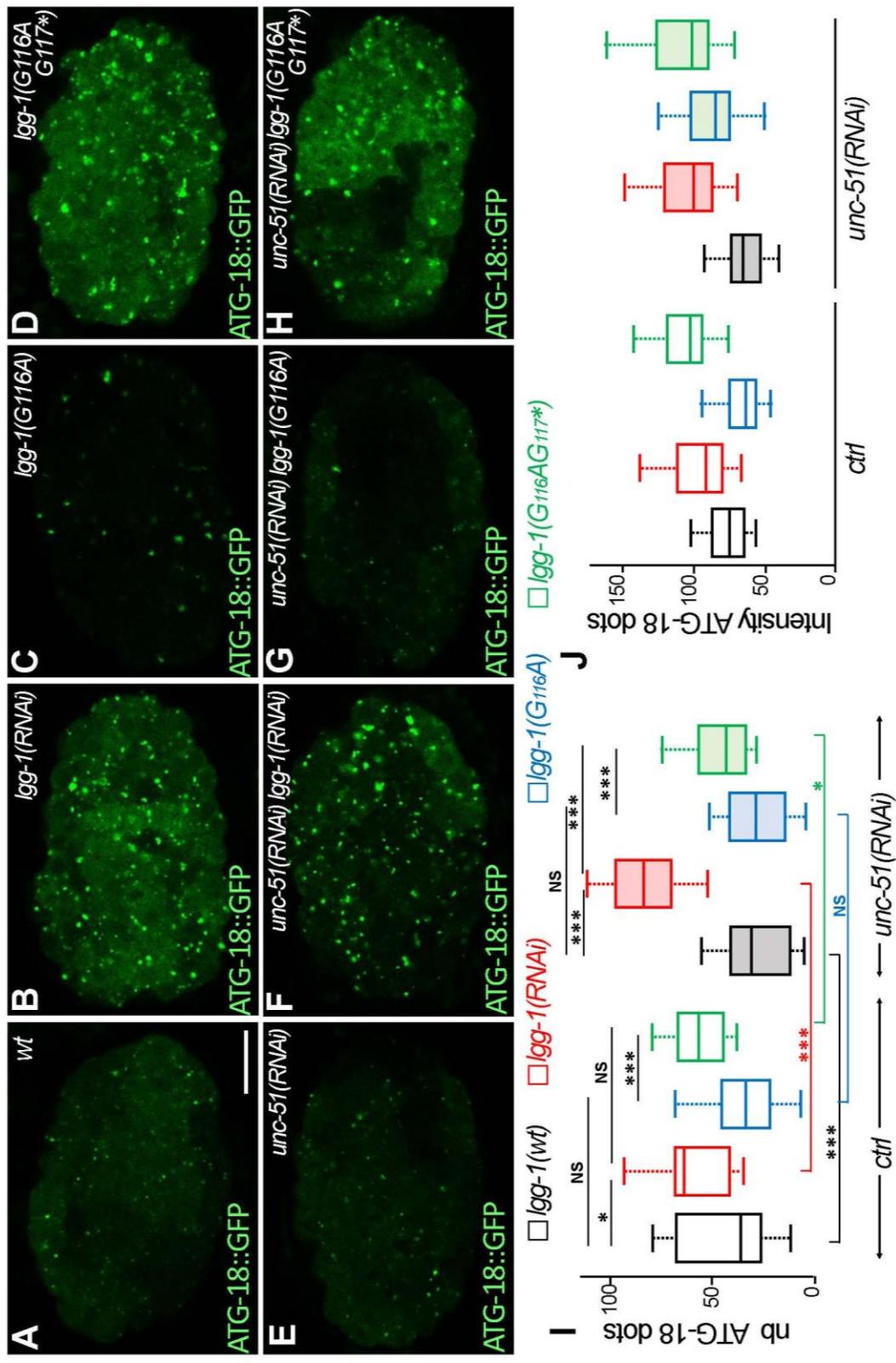
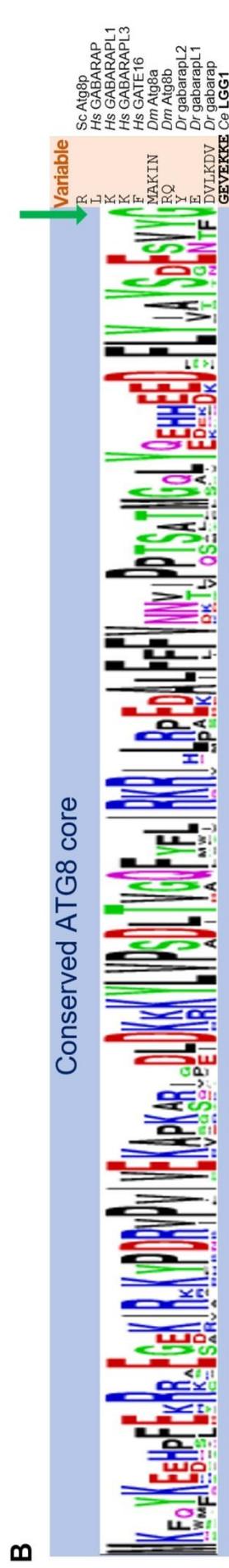
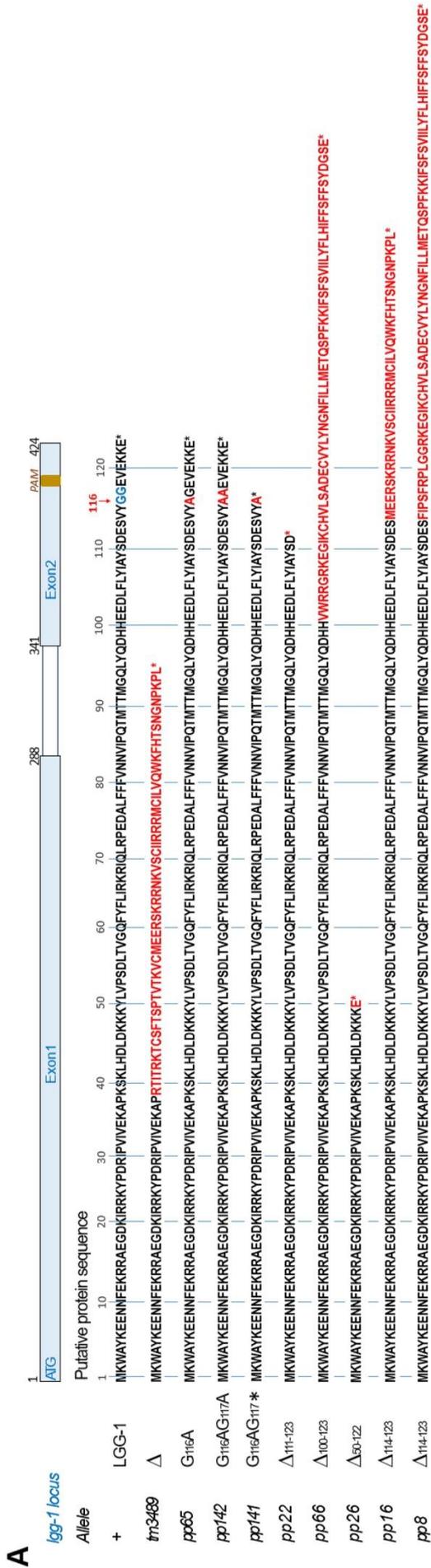
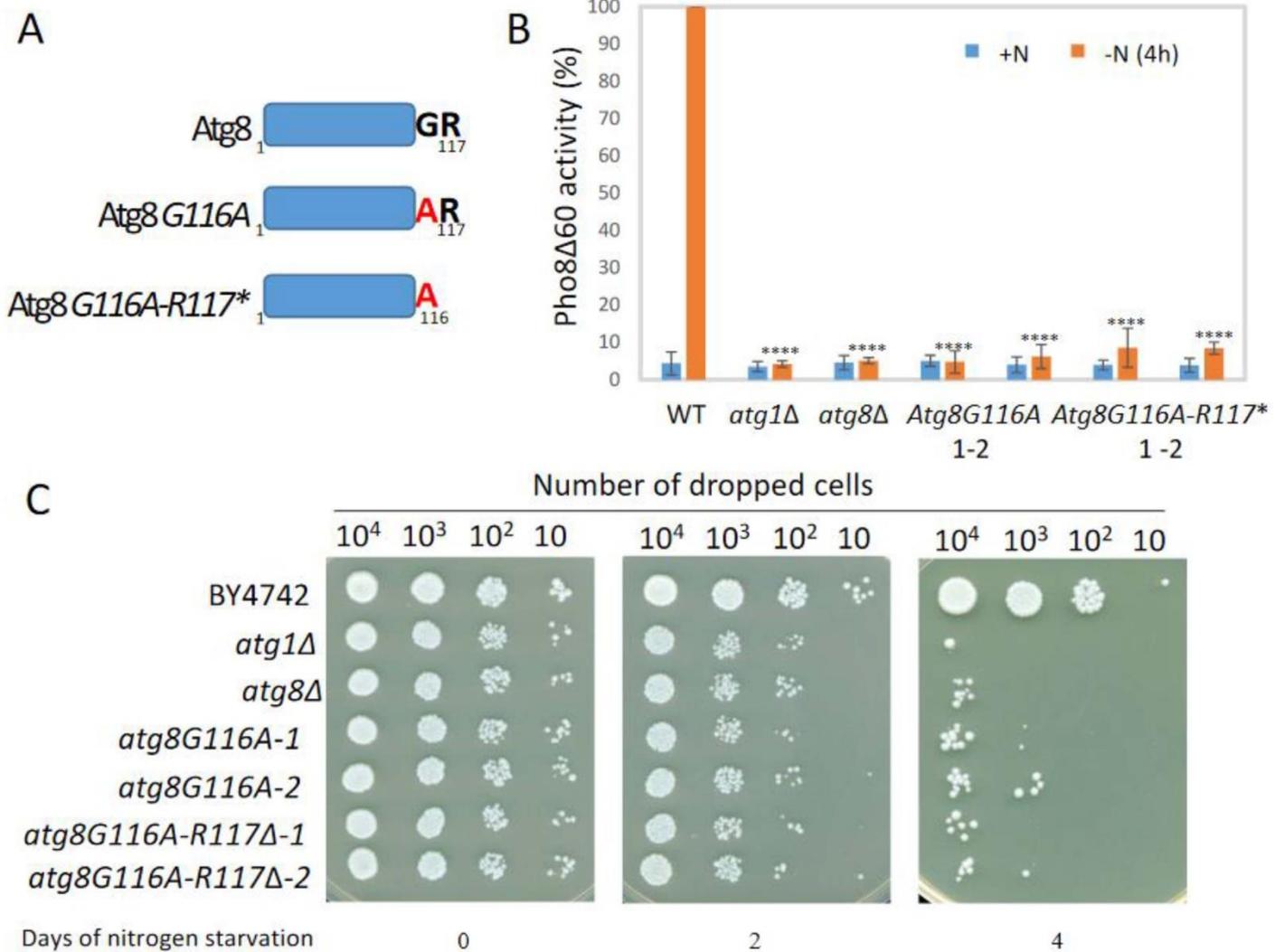


Figure 7 - A non lipidated LGG-1 regulates the initiation of autophagy



Supplementary Figure 1- Description of *Igg-1* alleles (related to Figure 1)



Supplementary Figure 2- The yeast *Atg8(G116A)* is not sufficient for autophagy

PARTIE II. – L'autophagie facilite la reconstruction du réseau mitochondrial et la récupération développementale après un stress thermique via un processus dépendant de DRP-1

Comprendre comment l'autophagie dite sélective participe aux processus développementaux et d'adaptation au stress des animaux est un défi majeur. En effet, l'autophagie est impliquée dans le contrôle qualité des protéines et des organites de manière physiologique, ou induite à la suite d'un stress. La dérégulation de l'autophagie peut être à l'origine de cancers ou de maladies neurodégénératives (Morishita and Mizushima, 2019).

C'est dans ce cadre que s'inscrit un des projets du laboratoire, par la caractérisation du mécanisme d'autophagie à la suite d'un stress cellulaire. Y. Chen a pu mettre en évidence qu'une élévation aiguë de la température modifie l'homéostasie mitochondriale et induit un flux autophagique et des événements de mitophagie.

Un stress thermique aigu induit un délai développemental et des modifications de la morphologie du RE et des mitochondries.

Pour la première fois, l'équipe a pu développer un protocole permettant d'induire la formation d'autophagosomes suite à un choc thermique de 37°C pendant 60 minutes (aHS). L'analyse des dommages cellulaires a été bien caractérisée dans plusieurs tissus et à différents stades larvaires. La morphologie du RE et des mitochondries est modifiée après HS. En plus d'une augmentation des vésicules semblables à des autophagosomes, les mitochondries sont plus petites, plus rondes, paraissent plus sombre, et la matrice contient des structures irrégulières et denses, visibles par microscopie électronique. De plus, l'impact du HS sur des animaux L4 a été bien caractérisé et entraîne un retard de développement sans affecter ni la viabilité ni la fertilité des vers.

La morphologie et les fonctions mitochondriales sont transitoirement altérées après un aHS.

Des expériences de Seahorse ont permis de mesurer la capacité respiratoire des animaux après le HS. Une heure après le aHS, la consommation maximale d'oxygène des animaux est fortement réduite. La visualisation des mitochondries par microscopie photonique a révélé que les mitochondries de l'épiderme sont fortement touchées et fragmentées. Le réseau mitochondrial, 2 heures, 4 heures, et 24 heures après que le aHS a été caractérisé a permis

d'indiquer que le aHS déclenche une fragmentation rapide des mitochondries suivie d'une lente reconstruction et récupération d'un réseau tubulaire normal.

Le aHS induit un flux autophagique.

L'utilisation des protéines ATG-18, LGG-1, et LGG-2, couplée à la GFP a permis d'identifier que le nombre d'autophagosomes est augmenté après HS. L'analyse par westernblot de la quantité de LGG-1 lipidées à la membrane des autophagosomes confirme l'induction du flux autophagique. Par ailleurs des approches génétiques par l'utilisation de mutants et d'ARNi (*atg-3*, *atg-7*, *lgg-1*, *epg-5* or *lgg-1*) permettent de mettre en évidence, une augmentation du nombre d'autophagosomes après le aHS.

L'autophagie protège les larves du aHS et facilite la reconstruction du réseau mitochondrial

L'autophagie est impliquée dans la réponse adaptative et la récupération du développement du ver suite au aHS. La taille des animaux *atg-7*(ARNi) ou *lgg-1*(ARNi) mesurée 24h après le aHS a pu mettre en évidence des animaux plus petits que les animaux sauvages. De plus, les animaux présentant une altération de l'autophagie commencent à pondre des œufs plus tard que les animaux contrôle, indiquant que le HS a un impact plus important. De plus la quantification de la reconstruction mitochondriale des animaux *atg-7*(ARNi) ou *lgg-1*(ARNi) est retardée par rapport aux animaux contrôle. Ces données démontrent que l'autophagie protège les larves du retard développemental et est importante pour la dynamique de reconstruction mitochondriale après un aHS

La mitophagie est dispensable pour la réponse adaptative au HS

Dans le but de comprendre le lien entre induction de l'autophagie et la reconstruction mitochondriale. L'analyse par microscopie entre GFP::LGG-1 et les mitochondries n'a pas permis de montrer une colocalisation entre les mitochondries et les autophagosomes. Néanmoins, les autophagosomes ont révélé une distribution non aléatoire et une association entre autophagosomes et mitochondries. Après aHS, de nombreux autophagosomes sont retrouvés proches des mitochondries et certains colocalisent, suggérant des événements de mitophagie. Néanmoins, l'utilisation de mutants ARNi des récepteurs autophagiques *pink-1*, *pdr-1* *dct-1* et *fndc-1* n'a pas permis de mettre en évidence un rôle spécifique de mitophagie dans la réponse d'adaptation au stress.

DRP-1 est nécessaire pour la fragmentation mitochondriale induite par le aHS

Un mutant drp-1, qui affecte la fission mitochondriale, ne permet pas la fragmentation du réseau suite au aHS, suggérant que drp-1 est une protéine essentielle pour la fragmentation des mitochondries. Néanmoins, le réseau mitochondrial a été modifié après HS. Ensemble, ces résultats indiquent qu'en absence de DRP-1 les mitochondries soumises à un stress thermique ont tendance à modifier leur forme mais ne parviennent pas à réaliser de fission.

DRP-1 est impliquée dans la formation des autophagosomes et dans la réponse adaptative au aHS.

En absence de drp-1, le aHS induit un regroupement de structures autophagiques. La dynamique de ces structures autophagiques a été observée par vidéomicroscopie. Ces structures persistent, suggérant des autophagosomes dysfonctionnels. Sans drp-1 les structures autophagosomales sont irrégulières et présentent des bras ouverts étendus. Par ailleurs la taille des animaux après 24 heures de récupération est diminuée par rapport aux animaux contrôle. Ces données indiquent que DRP-1 est nécessaire pour la réponse autophagique et l'adaptation au aHS.

Les autophagosomes se forment sur les sites de fission mitochondriale lors du aHS.

Après un stress thermique les animaux mutant pour drp-1 (ou 1941), ont pu montrer des autophagosomes associés aux mitochondries. Les animaux mutants drp-1 permettent la localisation de drp-1 au niveau des sites de fission mitochondriale mais ne sont pas capables de permettre la fission. Le nombre de points GFP::DRP-1 associés aux autophagosomes positif pour LGG-1 et aux mitochondries a été augmenté en contexte de aHS mais est resté faible. Cependant, la fraction de points mCherry::LGG-1 positifs pour GFP :: DRP-1 a été augmentée à 41% contrairement aux animaux contrôles. Ces données suggèrent que DRP-1 est impliquée dans la coordination entre la fission mitochondriale et la biogénèse des autophagosomes suite à un stress thermique.

En conclusion, cette étude fournit la première preuve que, à la fois au cours de l'autophagie basale, et induite, les autophagosomes sont formés proches des mitochondries dans l'épiderme chez *C. elegans*. La réponse autophagique et mitophagique suite à un stress thermique est réalisée dans les mutant drp-1. De plus, nos données suggèrent que la fission mitochondriale pourrait réguler le flux autophagique et soutiennent l'hypothèse que DRP-1 est impliquée dans la coordination entre fission et biogénèse des autophagosomes.

Manuscrit – *Chen et al* 2021 JCB

ARTICLE

Autophagy facilitates mitochondrial rebuilding after acute heat stress via a DRP-1-dependent process

Yanfang Chen¹, Romane Leboutet^{1,2}, Céline Largeau^{1,2}, Siham Zentout¹, Christophe Lefebvre^{1,2}, Agnès Delahodde¹, Emmanuel Culetto^{1,2*}, and Renaud Legouis^{1,2*}

Acute heat stress (aHS) can induce strong developmental defects in *Caenorhabditis elegans* larva but not lethality or sterility. This stress results in transitory fragmentation of mitochondria, formation of aggregates in the matrix, and decrease of mitochondrial respiration. Moreover, active autophagic flux associated with mitophagy events enables the rebuilding of the mitochondrial network and developmental recovery, showing that the autophagic response is protective. This adaptation to aHS does not require Pink1/Parkin or the mitophagy receptors DCT-1/NIX and FUNDC1. We also find that mitochondria are a major site for autophagosome biogenesis in the epidermis in both standard and heat stress conditions. In addition, we report that the depletion of the dynamin-related protein 1 (DRP-1) affects autophagic processes and the adaptation to aHS. In *drp-1* animals, the abnormal mitochondria tend to modify their shape upon aHS but are unable to achieve fragmentation. Autophagy is induced, but autophagosomes are abnormally elongated and clustered on mitochondria. Our data support a role for DRP-1 in coordinating mitochondrial fission and autophagosome biogenesis in stress conditions.

Introduction

Organisms are exposed to variations of the environmental temperature and should manage to preserve their cellular homeostasis in heat stress (HS) conditions. The HS response relies on the protective activity of the heat shock protein chaperones and the elimination of damage materials by macroautophagy, which are both activated by the transcription factor HSF1 (Desai et al., 2013; Dokladny et al., 2013). For instance, in *Caenorhabditis elegans* adults after a mild HS, HSF1 positively controls autophagy gene expression, which participates in a protective hormetic response resulting in lifespan extension (Kumsta et al., 2017). Organelles have evolved specific responses, aiming to maintain their proteostasis, in various stress conditions. Among them, the mitochondria can trigger the specific mitochondrial unfolded protein response (Haynes et al., 2013), an adaptive transcriptional pathway that promotes the recovery of mitochondrial function when it is stressed (Shpilka and Haynes, 2018). Moreover, a mitochondrial stress can stimulate the HS response during *C. elegans* aging (Labbadia et al., 2017). However, when dysfunctions are persistent and the mitochondrial unfolded protein response is overwhelmed, elimination of the mitochondria can occur by a selective macroautophagy process called mitophagy (Palikaras et al., 2018; Pickles et al., 2018). Mitophagy engulfs dysfunctional mitochondria in double-membrane vesicles, the autophagosomes, which fuse with

the lysosome to allow their degradation. Mitophagy occurs at various basal levels, depending on the cell types, but is also induced in stress conditions, such as HS or oxidative stress (Lee et al., 2012).

Mitochondria are highly dynamic organelles that reorganize through fusion or fission events, which participate in the mitochondrial homeostasis and can modulate the establishment of contact sites with other cell organelles (Wu et al., 2018; Youle and van der Bliek, 2012). Among those, ER-mitochondria contacts could be a site of biogenesis of autophagosomes in yeast and mammalian cells (Hamasaki et al., 2013; Böckler and Westermann, 2014). Dynamin-related protein 1 (Drp1), a member of the dynamin family, is a key player in mitochondrial fission, a multistep process including the formation of an ER-mediated mitochondrial constriction site (Friedman et al., 2011; Labrousse et al., 1999; Lee et al., 2016). Drp1 oligomerization on the outer mitochondrial membrane (OMM) further increases the constriction, a prerequisite step to achieve membrane scission (Ji et al., 2015; Kraus and Ryan, 2017). Recent data highlighted a new function for Drp1 in the quality control of mitochondria via an interaction with the mitochondrial Zn²⁺ transporter Zip1 during mitophagy (Cho et al., 2019).

The nematode *C. elegans*, which develops and reproduces in a range of temperatures from 15°C to 25°C (Hirsh and Vanderslice,

¹Université Paris-Saclay, CEA, CNRS, Institute for Integrative Biology of the Cell (I2BC), 91198, Gif-sur-Yvette, France.; ²INSERM U1280, Gif-sur-Yvette, France.

*E. Culetto and R. Legouis contributed equally to this paper; Correspondence to Renaud Legouis: renaud.legouis@i2bc.paris-saclay.fr; Y. Chen's present address is College of Life Sciences, Animal Resources Center, Nankai University, Tianjin, China.

© 2021 Chen et al. This article is distributed under the terms of an Attribution-Noncommercial-Share Alike-No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms/>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution-Noncommercial-Share Alike 4.0 International license, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

1976), is a powerful model to study the effects of HS (Momma et al., 2017). For instance, adult animals submitted to 35°C or 37°C for 3–6 h present a mitochondrial fragmentation in the muscle cells (Momma et al., 2017). Adaptation to HS has been described mainly in adults, but the high heterogeneity of the HS (28°C to 37°C for 1–6 h or more) resulted in opposite effects, ranging from hormesis to lethality. A 1-h 36°C stress applied to young adult animals has been shown to trigger a hormetic stress response (Kumsta et al., 2017), while a 1.5-h 37°C stress on adults results in 40% lethality (Zevian and Yanowitz, 2014). Moreover, recent data on *C. elegans* adults have shown that, in muscle cells, a severe and prolonged HS induces a DCT-1-, PINK-1-, and PDR-1-dependent mitophagy (Palikaras et al., 2015).

Here we analyzed the contribution of autophagy to adaptation to stress during the development of *C. elegans*. We developed a novel paradigm to characterize the physiological effects of a sublethal acute HS (aHS) on mitochondrial homeostasis and development. aHS induces a rapid fragmentation of mitochondria, the formation of aggregates in the matrix, the decrease of mitochondrial respiration, and mitophagy events. Stressed animals first present a blockage of development, but an autophagic flux enables the rebuilding of the mitochondrial network and developmental recovery. We report that, in the epidermis, the autophagosome biogenesis occurs mainly on mitochondria upon HS but also in physiological conditions. Finally, we discovered that DRP-1 is important for the adaptation to aHS and participates in the coordination between mitochondrial fission and autophagy.

Results

aHS induces organelle modifications and developmental delay

To analyze whether a sublethal HS could induce cellular damage, we submitted either young adults or fourth-stage larvae (L4) to 37°C during 60 min and performed transmission EM (TEM). The analysis of four tissues—the epidermis, the muscles, the intestine, and the germinal gonad—revealed three major subcellular alterations that were detected in both adults (Fig. 1) and L4 HS animals (Fig. S1) compared with control animals maintained at 20°C. First, the ER was fragmented and formed round, inflated vesicles compared with the tubular network in control animals (Fig. 1, A–H). Second, the appearance of mitochondria was modified; they looked darker, and the matrix contained irregular electron-dense structures, which could correspond to aggregates. Moreover, the measure of the area and the roundness of the mitochondrial sections in the epidermis indicates smaller but rounder mitochondria (Fig. S1). Third, a number of vesicles containing cytoplasmic materials and looking similar to autophagosomes (Manil-Ségalen et al., 2014) were present in stressed animals (Fig. 1, B, D, E, and F; quantification in Fig. S1). These data indicate that, independently of the stage of development, several tissues react similarly to HS, which alters both ER and mitochondrial morphology and triggers autophagy. It suggests that such a response to the HS is an intrinsic cellular property.

We then analyzed whether the effects of HS on L4 could affect their survival, development, and fertility. After a 1-h recovery period at 20°C following the HS, the animals were alive,

moving correctly, and presenting no obvious morphological difference from the non-HS controls (Fig. 1, I and J). 24 h later, there was no significant difference in survival between HS and control animals, but while control worms had reached adulthood and started laying eggs, HS animals were smaller and initiated egg laying with some delay (Fig. 1, K–M). Almost all HS animals became fertile in the next 24 h (Fig. 1 M and Fig. S1), and the progeny were viable. These data indicate that a 1-h 37°C HS in L4 animals results in a developmental delay without affecting the viability and fertility of the worms. The HS parameters, the cellular effects, and the developmental consequences on L4 animals indicate that these conditions correspond to a sublethal aHS and define a paradigm to analyze the mechanisms of adaptation. For that reason, the rest of this study concentrated on L4 to analyze the cellular mechanisms of response to aHS in *C. elegans* and focused on the mitochondrial phenotype and autophagy.

Mitochondrial function and morphology are transiently altered upon aHS

We next addressed whether the altered mitochondrial morphology and the accumulation of abnormal structures in the matrix observed by TEM correlate with mitochondrial dysfunction. We used the Seahorse technology to measure the basal and the maximal respiratory capacity in aHS and control animals. 1 h after the aHS, both the basal and maximal oxygen consumption of aHS animals were strongly reduced, indicating that the mitochondrial respiration was altered (Fig. 2 A). Because TEM is limited for analyzing the mitochondrial network integrity, we performed immunofluorescence or in vivo imaging using various mitochondrial markers expressed in the gonad, the muscle cells, the intestine, and the epidermis (Fig. 2 and Fig. S2). Among those, two transgenic strains displayed an abnormal mitochondrial network at 20°C (Fig. S2) and were not further used for the study. aHS results in the fragmentation of mitochondria in the gonad, muscles, and epidermis, indicating that the mitochondrial stress-induced phenotype observed by TEM is accompanied by a complete reorganization of the network. Visualization of mitochondria using matrix mitoGFP (Zhao et al., 2017), CMXRos dye, OMM TOMM-20::mKate2 (Ahier et al., 2018), and mitochondrial ATPase inhibitor 2 (MAI-2)::GFP (Fernández-Cárdenas et al., 2017) revealed that mitochondria in the epidermis are very strongly affected by aHS, forming numerous small and round vesicular structures instead of the long and reticulated network (Fig. 2, D, E, I, J, M, and N). Quantitative analyses of the length (aspect ratio) and the branching (form factor; Koopman et al., 2016; Marchi et al., 2017) confirmed the massive fragmentation of the mitochondria (Fig. 2, F and K).

The amount of the epidermal mitoGFP was further quantified by Western blotting in aHS and control animals. In control animals, a 25–30-kD major band, corresponding to the mitochondrial matrix form after removal of the N-terminal presequence, was detected, as well as two weak bands corresponding to the precursor forms (Fig. 2 L). After aHS, the amount of mitochondrial GFP decreased and the amount of the precursor forms increased, suggesting that the mitochondrial import is somehow affected.

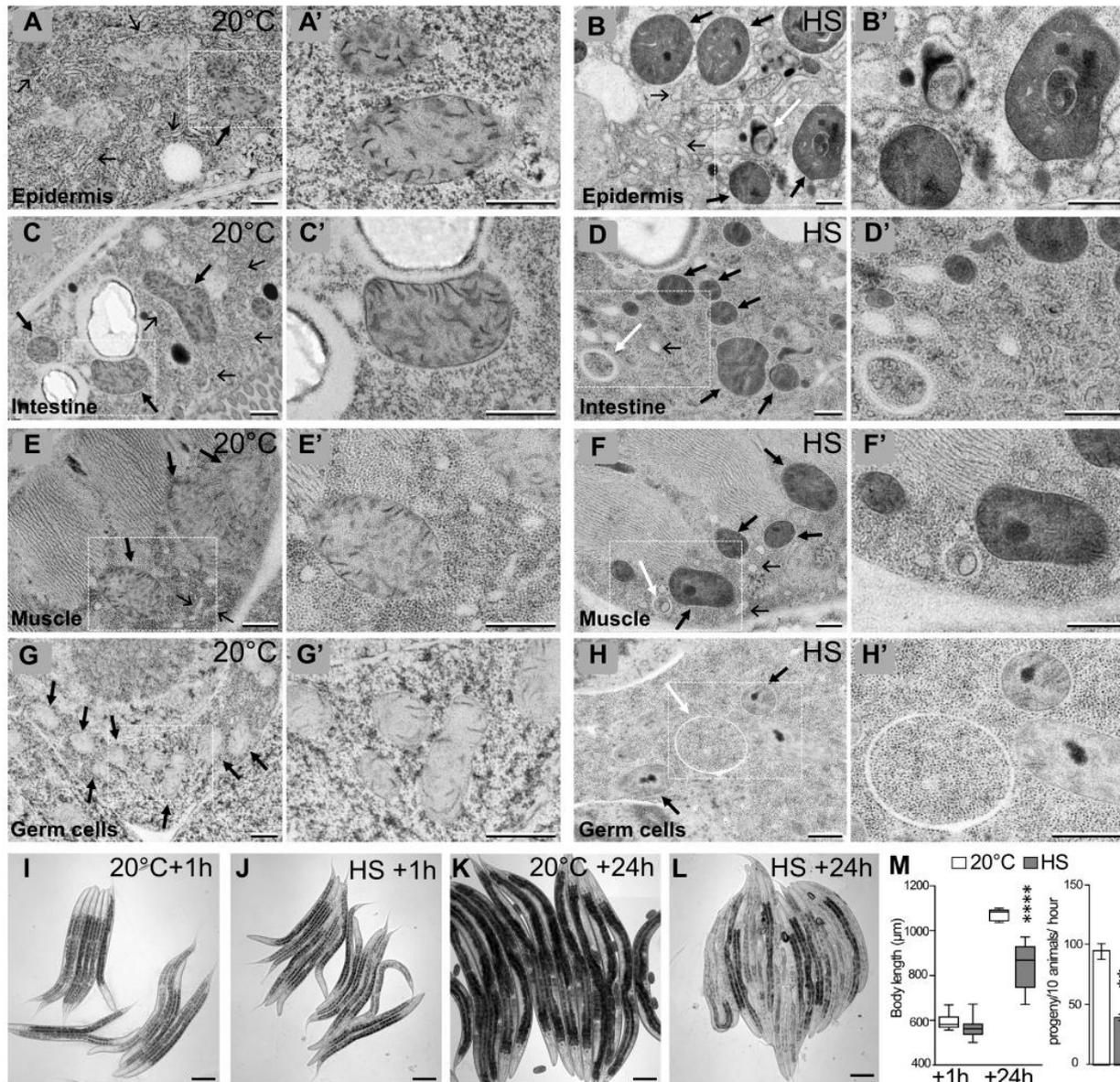


Figure 1. Heat shock induces alterations of subcellular structures and a developmental delay. (A–H) TEM images of epidermis (A and B), intestine (C and D), muscle (E and F), and germ cells (G and H) in control (A, C, E, and G) and HS (B, D, F, and H). Animals were submitted to 37°C during 60 min followed by 60 min of recovery at 20°C. HS induces a fragmentation and inflation of the ER (thin black arrows), the formation of electron-dense structures within the matrix of mitochondria (thick black arrows), and the formation of autophagic vesicles (white arrows). (A'–H') Magnifications of the boxed areas in A–H. (I–M) aHS in L4 animals results in a developmental delay but no lethality. Early L4 animals were submitted to 37°C during 60 min and analyzed after 1-h (I and J) or 24-h (K and L) recovery at 20°C. (M) Left: Boxplot showing the size of the animal. $n = 27, 44, 8, 32$; ****, $P < 0.0001$, t test. Right: Fertility was calculated after 24 h of recovery. Mean \pm SEM from 4 independent experiments with 30 worms per condition. **, $P < 0.005$, paired t test. The scale bars are 0.5 μm (A–H, A'–H') or 100 μm (I–M).

Despite the strong fragmentation of mitochondria after aHS, L4 were able to resume development and became fertile after 24 h (Fig. 1). Therefore, we analyzed the mitochondrial network 2, 4, and 24 h after aHS (Fig. 2, M–Q; and Fig. S2). After 4 h of recovery, some tubular mitochondria were already visible (Fig. 2 O), and in almost all animals studied, a reticulated mitochondrial network was rebuilt after 24 h (Fig. 2 P). Altogether, our data

indicate that aHS triggers a rapid mitochondrial fragmentation with functional decrease, followed by a slow rebuilding and recovery of a normal network.

aHS induces an autophagic flux

Our TEM analyses after aHS revealed the presence of autophagic vesicles in various tissues (Fig. 1 and Fig. S1). We next wanted to

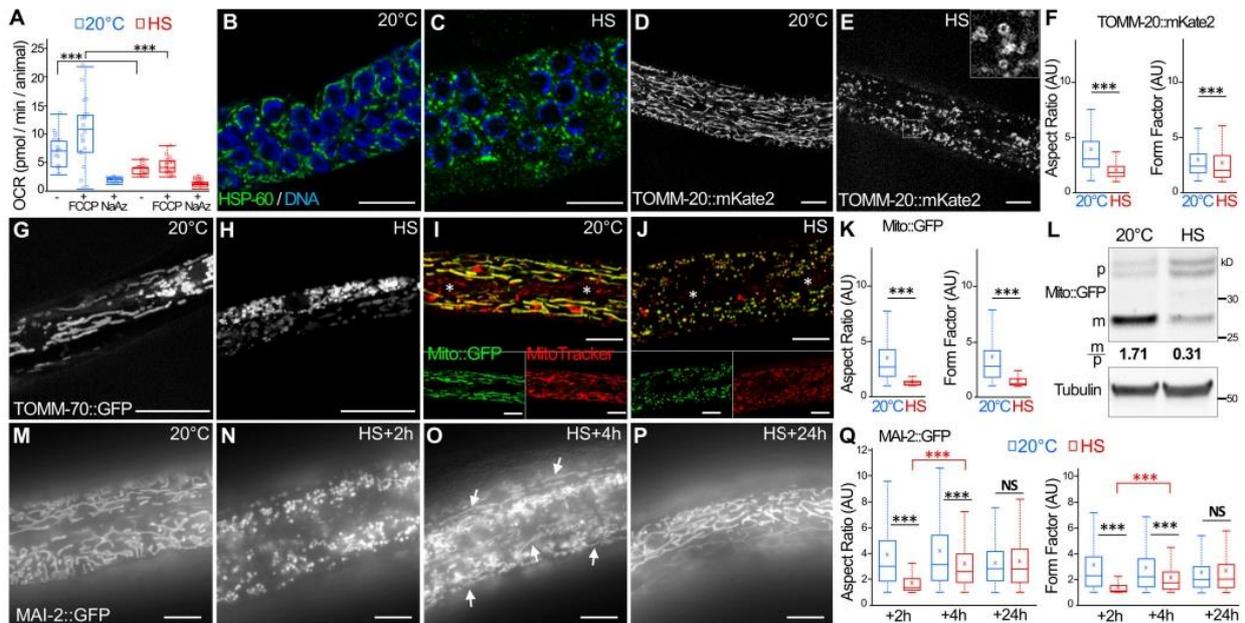


Figure 2. aHS induces transitory fragmentation and dysfunctions of mitochondria. (A) Oxygen consumption rate (OCR) in control and HS animals. FCPP, cyanide-4(trifluoromethoxy)phenylhydrazine; NaAz, sodium azide. Boxplot, triplicates $15 < n < 22$; ***, $P < 0.001$, Wilcoxon test. (B and C) Confocal images of mitochondrial network in the gonad (anti-HSP60 staining) of control (B) and HS (C) animals. DNA of germ cells is stained with Hoechst (blue). (D–F) Confocal images of the mitochondria in the epidermis, visualized with mKate2 fused with the outer membrane localization domain of TOMM-20, in control (D) and HS (E) animals. Quantification of the mitochondrial shape descriptors aspect ratio and form factor using TOMM-20::mKate2 (F). Boxplot showing a total of 200–500 mitochondria analyzed from five animals. ***, $P < 0.001$, Wilcoxon test. (G and H) Confocal images of the mitochondria in the muscle visualized with GFP fused with the outer membrane localization domain of TOMM-70 in control (G) and HS (H) animals. (I–K) Colocalization of mito::GFP (green) and MitoTracker CMXRos (red) in the epidermis of control (I) and HS (J) animals. The white asterisks show the positions of the specialized seam cells of the epidermis that do not express Mito::GFP but are labeled with CMXRos. Quantification of the mitochondrial shape descriptors aspect ratio and form factor using Mito::GFP (K). Boxplot showing >300 mitochondria measured per animal from five animals. ***, $P < 0.001$, Wilcoxon test. (L) Western blot analysis of epidermal Mito::GFP. The quantification of the cytoplasmic precursor (p) and mitochondrial (m) forms shows a decrease of the GFP import after HS. (M–Q) Epifluorescence images of MAI-2::GFP showing the mitochondria in the epidermis in control (M) and HS after 2-h (N), 4-h (O), or 24-h (P) recovery. The rebuilding of the network is visible 4 h after HS by the presence of tubular mitochondria (white arrows). The quantification of the mitochondrial shape descriptors (aspect ratio and form factor) indicates a partial rebuilding after 4 h of recovery (Q). Boxplot, five animals were analyzed, and >500 mitochondria were measured per animal. ***, $P < 0.001$, Wilcoxon test. The scale bars are $10 \mu\text{m}$.

confirm that these structures are bona fide autophagosomes and addressed whether aHS triggers a functional autophagic flux (Fig. 3 and Fig. S3). Using GFP-tagged LGG-1, LGG-2, and ATG-18, the *C. elegans* homologues of GABARAP, LC3, and WIPI1/2, respectively (Alberti et al., 2010; Jenzer et al., 2014; Jia et al., 2007), we first examined the formation of puncta in the gonad, the intestine, the muscle, and the epidermis upon aHS and confirmed that aHS induces an increase in the number of autophagosomes in various tissues (Fig. S3) with a stronger response in the epidermis (Fig. 3, A–I). The ATG-18 dots, which correspond to initiation of autophagosomes, were detected during aHS, while the increase of LGG-1 and LGG-2 dots was maximum 90 to 120 min after aHS (Fig. 3, A–H). To exclude the possibility that the dots correspond to GFP aggregates induced by HS, we analyzed the mutated GFP::LGG-1(G116A) and GFP::LGG-2(G130A), which are unable to localize to autophagosomes (Alberti et al., 2010; Manil-Ségalen et al., 2014), and we observed no formation of puncta but a diffuse staining after HS (Fig. S3, G–J). Western blot analysis and quantification of the lipidated and nonlipidated forms of endogenous LGG-1 confirmed the

induction of an autophagic flux (Fig. 3 J). The last evidence that aHS induces a functional autophagic flux was obtained by a genetic approach. Using mutants and RNAi that block either the formation (*atg-3*, *atg-7*, *lgg-1*) or the degradation (*epg-5*, *lgg-2*) of autophagosomes (Chen et al., 2017), we observed a decrease or an increase in the number of autophagosomes, respectively (Fig. 3, K–O).

We reported previously that the localization of LGG-1 and LGG-2 defines three populations of autophagosomes in *C. elegans* embryo (Manil-Ségalen et al., 2014). The in vivo analysis of mCherry::LGG-2 (Jenzer et al., 2019) and GFP::LGG-1 in the epidermis revealed that aHS induces three types of autophagosomes: LGG-1 only, LGG-2 only, and double positive (Fig. 3 P). Moreover, we observed that the depletion of LGG-1 partially decreases the number of LGG-2 dots (Fig. 3 Q and R), while the depletion of LGG-2 rather increases the number of LGG-1 dots (Fig. 3, S and T). These observations suggest that the sequential functions of LGG-1 and LGG-2, previously described in the early embryo (Manil-Ségalen et al., 2014), could be conserved in stress-induced autophagy.

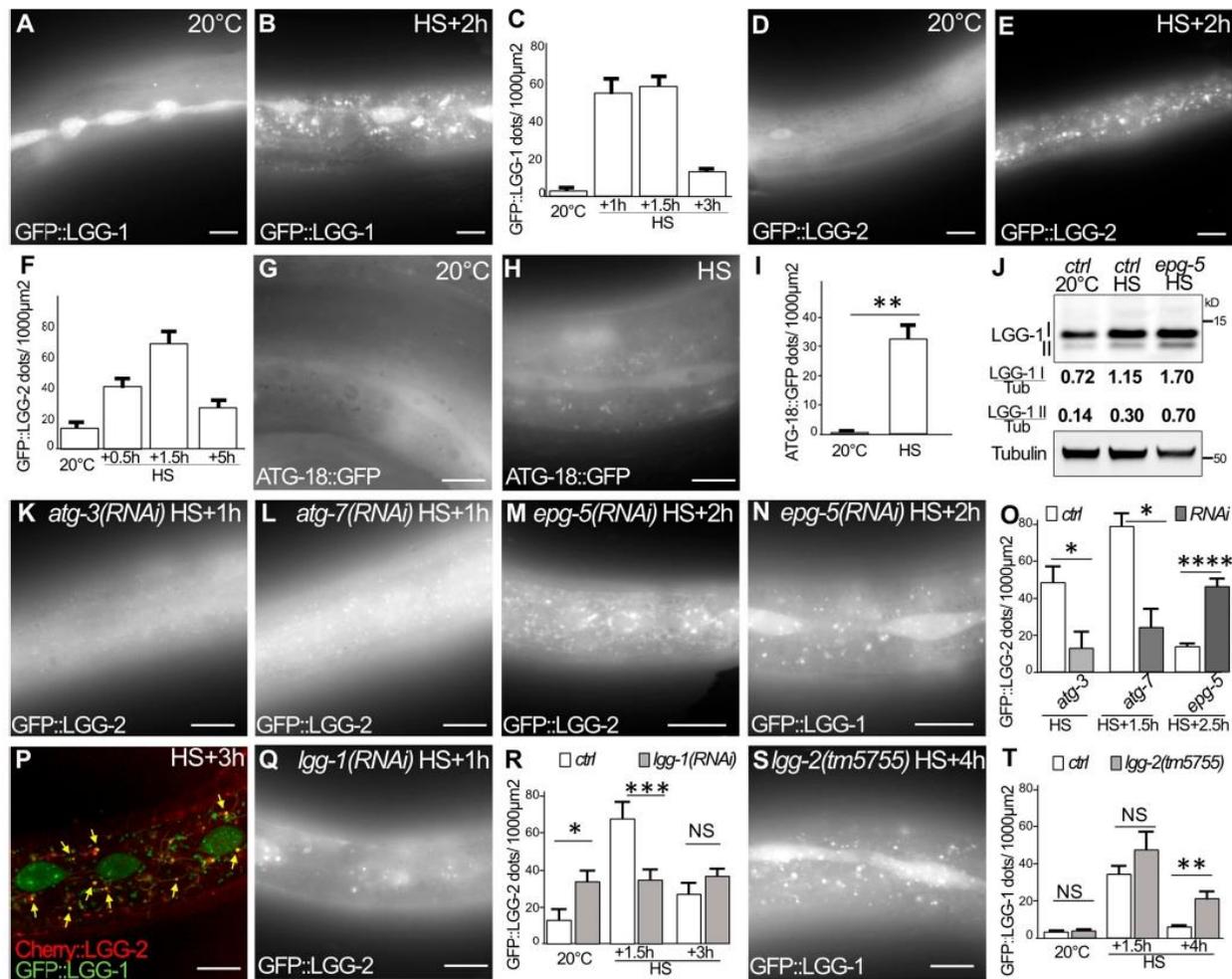


Figure 3. aHS induces an autophagic flux in the epidermis. (A–F) Autophagosomes are visualized with GFP::LGG-1 (A and B) or GFP::LGG-2 (D and E) in control (A and D) and HS (B and E) animals and quantified (mean ± SEM; $n = 10, 8, 11, 11$ in C; $n = 13, 10, 10, 8$ in F). (G–I) The initiation sites of autophagosomes are visualized with ATG-18::GFP after 30-min treatment in control (G) and HS (H) animals and quantified (I; mean ± SEM, $n = 7, 6$; **, $P < 0.005$, Wilcoxon test). (J) Western blot analysis using anti-LGG-1 antibody to quantify the cleaved (I) and lipidated (II) forms. aHS induces an increase of the autophagic flux with a further accumulation of lipidated LGG-1 in *epg-5(RNAi)* animals where maturation of autophagosomes is altered. (K–O) The autophagic flux induced by HS was analyzed by imaging of GFP::LGG-2 or GFP::LGG-1 autophagosomes in the autophagy-deficient animals *atg-3* (K), *atg-7* (L), and *epg-5* (M and N) and quantified (O; mean ± SEM, $n = 5, 5, 4, 5, 7, 11$; *, $P < 0.05$; ****, $P < 0.0001$, Wilcoxon test). (P–T) LGG-1 acts upstream of LGG-2 during aHS autophagic flux. Three types of autophagosomes are detected after HS: LGG-1 only (green), LGG-2 only (red), and double positive (yellow arrows; P). The depletion of *lgg-1* (Q and R) decreases the number of LGG-2 autophagosomes, while the depletion of *lgg-2* (S and T) increases the number of LGG-1 autophagosomes. Mean ± SEM; $n = 13, 10, 10, 10, 8, 8$; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0005$, two-way ANOVA. The scale bars are 10 µm.

Autophagy protects larvae from aHS and facilitates mitochondrial rebuilding

We next asked whether the induction of autophagic flux upon aHS could be involved in the adaptive response and the worm development recovery. We compared the survival and the size after aHS of autophagy mutants with wild-type animals (Fig. 4, A–F). 3 h after HS, the *lgg-1*, *atg-3*, or *atg-7* animals did not look different from control animals, suggesting that the autophagic flux is not essential for the immediate survival of animals upon aHS. However, 24 h after aHS, *atg-7(RNAi)* or *lgg-1(RNAi)* animals were smaller than wild-type animals (Fig. 4, D–H). Moreover, autophagy-deficient animals started to lay eggs later than

the controls (Fig. 4 I), indicating that the aHS-induced developmental delay was further increased. These data demonstrate that the autophagic flux is protective for the larvae and important for developmental recovery after aHS.

We then investigated whether the autophagic flux is involved in the rebuilding of the mitochondrial network in the epidermis after aHS (Fig. 4, J–R; and Fig. S4). The quantification of mitochondrial rebuilding was performed 2 h, 4 h, and 24 h after aHS in control and autophagy-deficient animals (*lgg-1*, *atg-7*). *lgg-1(RNAi)* and *atg-7(RNAi)* animals presented no alteration of the mitochondrial network at 20°C. However, a delay in the rebuilding was observed in these animals 4 h after aHS (Fig. 4, J,

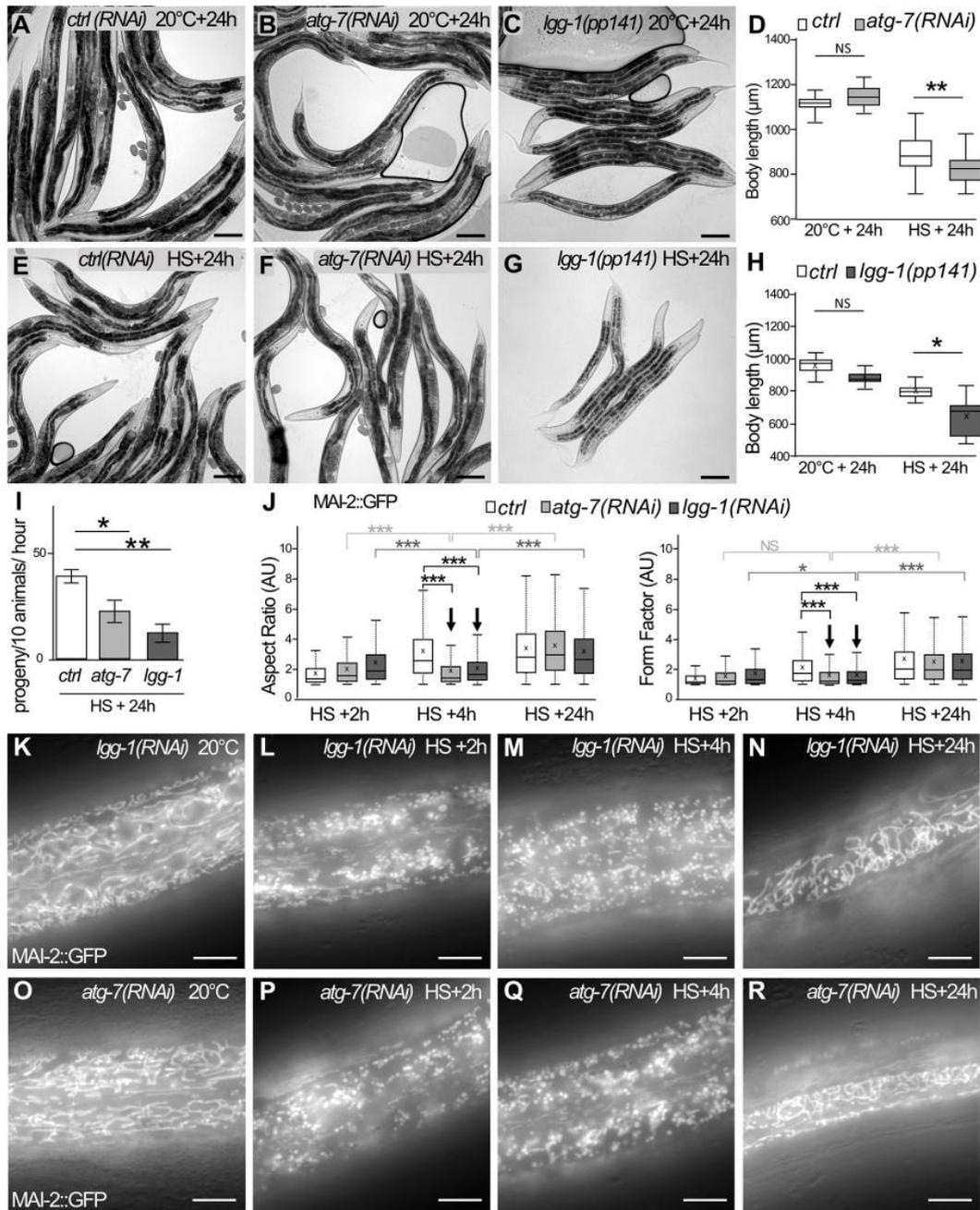


Figure 4. Autophagy is protective and facilitates mitochondrial rebuilding after aHS. (A–I) The blockage of the autophagic flux exacerbates the developmental phenotypes induced by aHS. *ctrl(RNAi)* (A and E), *atg-7(RNAi)* (B and F), or *lgg-1(pp141)* (C and G) animals were maintained at 20°C (A–C) or submitted to aHS (E–G) and analyzed after 24-h recovery. The body length of the autophagy-defective animals is decreased 24 h after aHS (D, boxplot; $n = 65, 72, 78, 61$; **, $P < 0.005$, t test; H; boxplot; $n = 9, 8, 8, 9$; **, $P < 0.001$, Kruskal-Wallis test). The number of progeny of *atg-7* and *lgg-1* animals is decreased (I; mean \pm SEM from 4 independent experiments, >10 animals; *, $P < 0.05$; **, $P < 0.005$, t test). (J–R) Blocking autophagy affects the mitochondrial rebuilding in the epidermis. Boxplot of the mitochondrial shape descriptors aspect ratio and form factor using MAI-2::GFP (J). 4 h after aHS, the rebuilding of the network is less efficient in *lgg-1(RNAi)* and *atg-7(RNAi)* animals. Three to five animals were analyzed, and >500 mitochondria were measured per animal. ***, $P < 0.0001$, t test. (K–R) Epifluorescence images of MAI-2::GFP showing the mitochondrial network in the epidermis at 20°C (K and O) and after HS with 2-h (L and P), 4-h (M and Q), or 24-h (N and R) recovery. 4 h after aHS, almost all mitochondria are still fragmented in *lgg-1(RNAi)* and *atg-7(RNAi)* animals (compare with Fig. 2 O showing wild-type animals). The scale bars are 100 μm (A–G) or 10 μm (K–R).

M, and Q). 24 h after aHS, most of the *lgg-1(RNAi)* and *atg-7(RNAi)* animals showed a recovery of the tubular mitochondrial network (Fig. 4, J, N, and R). Our data demonstrate that autophagy is important for the dynamic of mitochondrial rebuilding after aHS-induced fragmentation.

Autophagosomes form on mitochondria, but selective mitophagy is dispensable for adaptation to aHS

The correlation between the induction of an autophagic flux and the mitochondrial rebuilding defect prompted us to investigate mitophagy after aHS. In the epidermis of control animals, the analysis of GFP::LGG-1 and MitoTracker showed no colocalization between mitochondria and autophagosomes (Fig. 5 A). However, measurement of the minimal distance between autophagosomes and mitochondria revealed a nonrandom distribution and a close association of the two organelles (Fig. 5, A and B). In aHS animals, numerous autophagosomes were found in close proximity with mitochondria, and a fraction of them colocalized with fragmented mitochondria, suggestive of mitophagy events (Fig. 5 C). The measure of the distance between ATG-18::GFP and mitochondria (Fig. 5, D and E) confirmed that, upon aHS, the autophagosome biogenesis is initiated in very close proximity to mitochondria. The presence of small mitochondria within vesicular structures was also observed several times by TEM (Fig. 5 F). We also used Western blot analysis to monitor the level of mitochondrial degradation induced upon aHS (Fig. 5, G and H). 2 h after aHS, the quantification of the mitochondrial encoded cytochrome c oxidase subunit 1, CTC-1/COX1, and the nuclear encoded ATP synthase subunit, ATP-5, indicated an increase of the mitochondrial proteins in both control or *atg-7* mutant animals. These results suggest that aHS induces the degradation of some mitochondria by autophagy but also an increase of the mitochondrial mass.

Next, to analyze whether mitophagy is involved in the adaptation to aHS, we depleted the PINK/PARKIN or Nix or FUN14 domain containing 1 (FUNDC1) pathways, which are involved in various selective mitophagy processes in *C. elegans* (Leboutet et al., 2020). Using mutants or RNAi for *pink-1*, *pdr-1*, *dct-1*, and *fn/dc-1*, we characterized the formation of autophagosomes, the size of the animals, and the mitochondrial rebuilding after aHS (Fig. 5, I-P; and Fig. S4). The number of LGG-1 autophagosomes did not decrease in *pdr-1* mutant animals or in *pink-1(RNAi)* or *dct-1(RNAi)* (Fig. 5, I-K), and colocalization events between autophagosomes and mitochondria were still present (Fig. 5 L). Moreover, the depletion of *pdr-1*, *pink-1*, *dct-1*, or *fn/dc-1* did not affect the size of the worm 24 h after aHS (Fig. 5, M-O), contrarily to *atg-7* or *lgg-1* (Fig. 4). Finally, the mitochondrial network rebuilding was not strongly affected in *pink-1(RNAi)* and *dct-1(RNAi)* animals (Fig. 5 P and Fig. S4), as observed in *lgg-1(RNAi)* and *atg-7(RNAi)* animals (Fig. 4). These data indicate that *pdr-1*, *pink-1*, *dct-1*, or *fn/dc-1* is not essential for the adaptation to aHS and suggest that part of the fragmented mitochondria could be addressed to autophagosomes either by an unidentified mitophagy pathway or through bulk autophagy.

DRP-1 is necessary for aHS-induced mitochondrial fragmentation

Our results indicate that autophagy is involved in mitochondrial network recovery after fragmentation. To address whether the

mitochondrial fragmentation is a prerequisite for autophagy induction, we analyzed a null mutant of *drp-1*, the *C. elegans* homologue of *Drp1*, which affects mitochondrial fission (Breckenridge et al., 2008; Labrousse et al., 1999). DRP-1 function has been studied mainly in the muscle cells of *C. elegans* (Labrousse et al., 1999; Scholtes et al., 2018; Shen et al., 2014) but is not well characterized in the epidermis. The qualitative and quantitative analyses of the morphology of the mitochondria in *drp-1* animals were performed using mitoGFP and TOMM-20::mKate2 (Fig. 6, A-E). In the epidermis, at 20°C, the mitochondrial network of *drp-1* animals showed no regular tubular structures but three categories of abnormal mitochondria: the enlarged globular, the filament-like, and the clustered (Fig. 6 A; and Fig. 2 I for control). The OMM labeling showed that the three types of altered mitochondria remain connected (Fig. 6 C; and Fig. 2 D for control). These data confirmed that, similarly to muscle cells, maintenance of mitochondrial morphology in the epidermis is dependent on DRP-1 fission activity. After aHS, the mitochondrial network of *drp-1* animals did not form small, rounded vesicles, as observed in wild-type animals, indicating that the HS-induced fragmentation is DRP-1 dependent (Fig. 6, B and D; and Fig. 2, E and J, for controls). However, both the qualitative and quantitative analyses indicated that the mitochondrial network of *drp-1* animals was modified after aHS (Fig. 6 E). The clustering of mitochondria was more obvious, and the filament-like was more difficult to observe. To characterize further the phenotypes of mitochondria, we performed TEM analysis (Fig. 6, F-H). At 20°C, mitochondrial sections were very round but highly variable in size (Fig. 6 G; quantification in Fig. 6 F), confirming the *in vivo* analysis. After aHS, the presence of dark aggregates in the matrix was observed (Fig. 6 H), similarly to wild-type animals, but the mitochondria displayed a very heterogeneous shape and formed a connected network (Fig. 6 G; quantification in Fig. 6 H). Together, our results indicate that, in the absence of DRP-1, heat-stressed mitochondria tend to modify their shape but are unsuccessful in achieving fission.

DRP-1 is involved in autophagosome formation and adaptation to aHS

We then analyzed whether autophagy was induced upon aHS in the absence of fission of the mitochondria. The localization of ATG-18::GFP, GFP::LGG-1, and GFP::LGG-2 was monitored in *drp-1* animals at 20°C and after aHS (Fig. 7 and Fig. S5). At 20°C, the three autophagy markers presented a distribution pattern similar to that in wild-type animals (Fig. 7, A, C, D, G, and H; compare with Figs. 3 and 5 for controls). This indicated that, in basal conditions, DRP-1 is dispensable for the formation of autophagosomes, and its depletion does not induce autophagy. However, the distribution and appearance of the three autophagy markers were very different after aHS of *drp-1* animals (Fig. 7, B, E, and F). The autophagic markers formed groups of vesicle-like structures in close proximity to or even intermingled with mitochondria. Quantifications of the number and size of the dots suggested that, in the absence of DRP-1, the aHS induces a clustering of autophagic structures (Fig. 7, C, G, and H). The analysis of the nonlipidated GFP::LGG-1(G116A) indicates

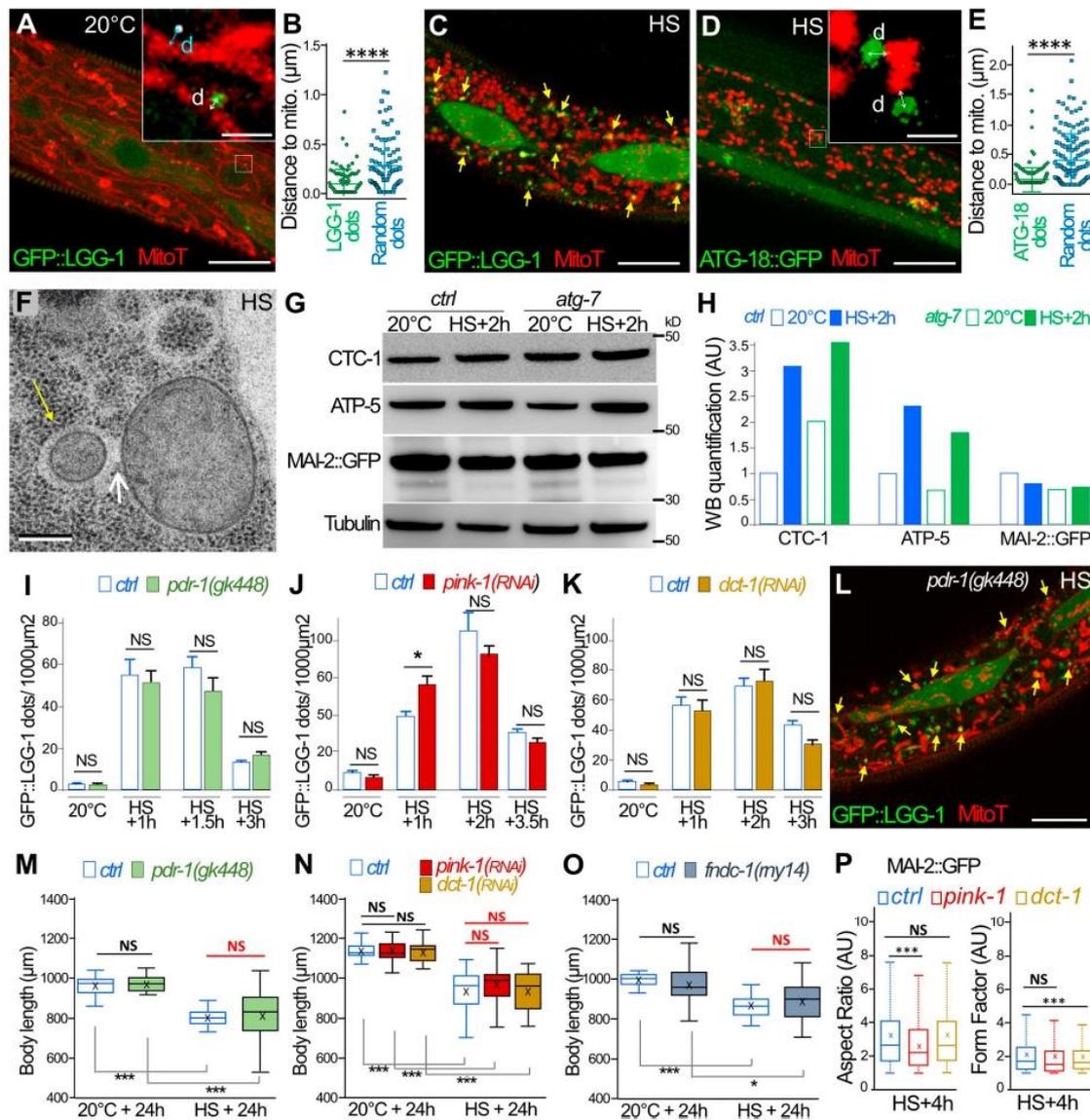


Figure 5. Mitochondria are the main site of autophagosome biogenesis in the epidermis, but mitophagy is not essential for adaptation and mitochondrial rebuilding after aHS. (A–E) Colocalization analysis of autophagosomes and mitochondria. Confocal images of GFP::LGG-1 (green) and MitoTracker (red) in the epidermis of a control animal (A). Insets in A and D show the minimal distance (d, indicated by the bidirectional arrows) between autophagosome and mitochondria, which is compared with random dots (white puncta). (B) Horizontal bars represent mean and SEM, $n = 89$, from 9 animals; ****, $P < 0.0001$, t test with Welch correction. (C) In an HS animal, a fraction of the fragmented mitochondria are colocalizing with autophagosomes (yellow arrows). (D) Confocal images of ATG-18::GFP (green) and MitoTracker (red) in the epidermis of an aHS animal showing that the initiation of the autophagosome occurs in close proximity with mitochondria (insets) compared with random dots (mean and SEM in E, $n = 151$, from 9 animals; ****, $P < 0.0001$, t test with Welch correction). (F) TEM images after aHS showing mitochondria within a vesicle (yellow arrow) in contact (white arrow) with nonengulfed mitochondria. (G and H) Western blot (WB) analysis of total protein extracts of control and *atg-7* animals at 20°C or after aHS plus 2 h of recovery (G). (H) Quantification of the mitochondrial proteins CTC-1/Cox1, ATP-5, and MAI-2::GFP in a whole animal shows that aHS does not induce a massive degradation of mitochondria. The signal was normalized using tubulin, and, for each mitochondrial protein, the control at 20°C was arbitrarily set at 1. (I–K) The depletion of *pdr-1* (I; $n = 10, 10, 8, 8, 11, 12, 11, 15$), *pink-1* (J; $n = 6, 7, 18, 12, 7, 11, 11, 12$), and *dct-1* (K; $n = 6, 9, 21, 15, 17, 16, 19, 17$) does not modify the number of LGG-1 autophagosomes formed after HS. Mean \pm SEM; *, $P < 0.05$, two-way ANOVA. (L) A single confocal image of GFP::LGG-1 (green) and MitoTracker (red) shows that colocalization events are present in *pdr-1(gk448)* mutant animals (yellow arrows). (M–P) The blockage of the mitophagy pathways does not exacerbate the developmental phenotypes induced by aHS. *ctrl*, *pdr-1(gk448)*, *pink-1(RNAi)*, *dct-1(RNAi)*, and *fundc1(my14)* animals were maintained at 20°C or submitted to aHS, and their body size was measured after 24 h of recovery. Boxplots ($n > 30$); *, $P < 0.01$; ***, $P < 0.0001$, Wilcoxon test. (P) Quantification of the mitochondrial shape descriptors aspect ratio and form factor using MAI-2::GFP. 4 h after aHS, the rebuilding of the network is not strongly altered in *pink-1(RNAi)* or *dct-1(RNAi)* animals (corresponding pictures in Fig. S4). Three to five animals were analyzed, and >500 mitochondria were measured per animal. ****, $P < 0.0001$, t test. The scale bars represent 10 μm (A, C, D, and L), 1 μm (insets in A and D), or 0.2 μm (F).

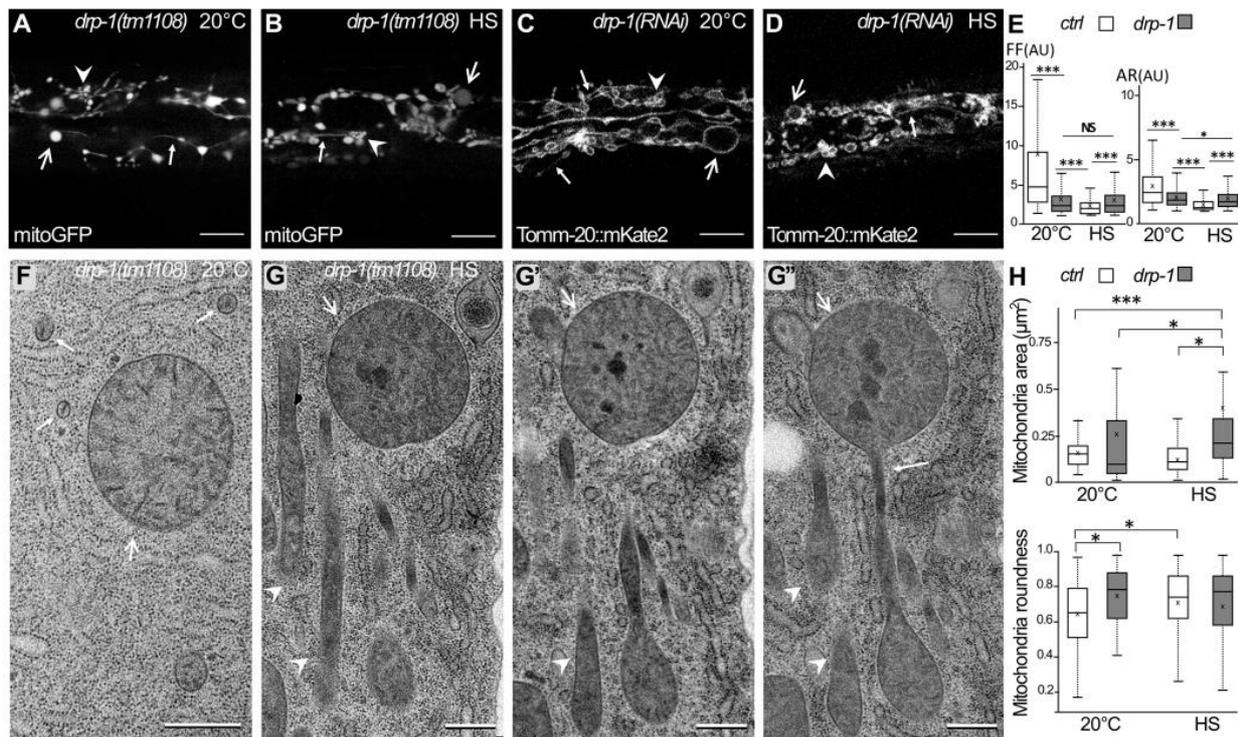


Figure 6. HS-induced mitochondrial fragmentation is dependent on DRP-1. (A–D) Confocal images of the mitochondria in the epidermis of *drp-1* animals visualized with the matrix-located mitoGFP (A and B) or outer membrane TOMM-20::mKate2 (C and D) at 20°C (A and C) or after HS (B and D). Abnormally shaped mitochondria are classified as enlarged (large arrow), clustered (arrowhead), and filament-like (small arrow). For comparison with wild type, see Fig. 2, D, E, I, and J. **(E)** Boxplots of the mitochondrial shape descriptors form factor (FF) and aspect ratio (AR) using mitoGFP. Seven or eight animals were analyzed, and >700 mitochondria were measured per animal. ***, $P < 0.001$, Wilcoxon test. **(F–G'')** EM pictures of mitochondria in the epidermis of *drp-1* animals at 20°C (F) or after HS (G). G, G', and G'' are serial sections of stress mitochondria containing dark occlusions and displaying enlarged (large arrows), clustered (arrowhead), and filament-like (small arrow) shapes. For comparison with wild type, see Fig. 1, A and B. **(H)** Measurements of the area and the roundness of mitochondria in the epidermis were performed on EM pictures. Boxplots; $n = 40, 65, 37, 51$; *, $P < 0.05$; ***, $P < 0.0005$, Kruskal-Wallis test. The scale bars are 10 μm (A–D) or 0.5 μm (F and G).

that the LGG-1 clusters are not protein aggregates (Fig. S5). To analyze the dynamics of these autophagic structures, time-lapse movies were acquired 30 min after aHS (Fig. 7, F and F'). Among the 31 LGG-1-positive structures that were visualized for 45–130 min, 74.2% persisted during the whole recording. The slight changes in their morphology and their long persistence support the notion that these structures are dysfunctional autophagosomes. EM in *drp-1* animals after aHS further confirmed the formation of irregular membranous structures that engulfed mitochondria and extended unclosed arms (Fig. 7 I). These data show that DRP-1 is dispensable for the induction of autophagy, but in its absence, the biogenesis of autophagosomes is aberrant and the completion or closure of autophagosomes is not correctly achieved.

The functional implication of DRP-1 in adaptation to aHS was confirmed by measuring the size of *drp-1* mutant animals after 24-h recovery (Fig. 7 I). *drp-1* animals presented an increase of the developmental delay similar to that of the autophagy mutants *lgg-1* and *atg-7*. Moreover, the depletion of both *drp-1* and *lgg-1* or *atg-7* resulted in a defect of similar size with no additive effect (Fig. 7 M and Fig. S5). Altogether, these data indicate that

DRP-1 is required in the autophagy response and adaptation to aHS. The deregulation of autophagy observed in *drp-1* mutants suggests a functional link between mitochondrial fission and autophagosome biogenesis.

Autophagosomes form at mitochondrial fission sites upon aHS

The clustering of autophagosomes observed in *drp-1* animals upon aHS could be an indirect consequence of the large, misshapen mitochondria. However, a careful examination of *drp-1* mutants revealed that abnormal autophagosomes can be formed on small mitochondria and not only on mitochondrial blebs (Fig. 7 E and Fig. S5). To assess this possibility, we submitted the *drp-1* mutants to an RNAi against *fzo-1*, the worm homologue of human mitofusin, implicated in the mitochondrial fusion (Fig. S5). The depletion of *fzo-1* results in the accumulation of fragmented mitochondria in the epidermis of animals grown at 20°C and partially restores some tubular mitochondria in the *drp-1* mutant animals (Fig. S5 G). Upon aHS, the formation of mitochondrial clustered autophagosomes was detected in the epidermis of *drp-1;fzo-1* depleted animals (Fig. S5 H). These data indicate that the formation of autophagosome clusters in *drp-1*

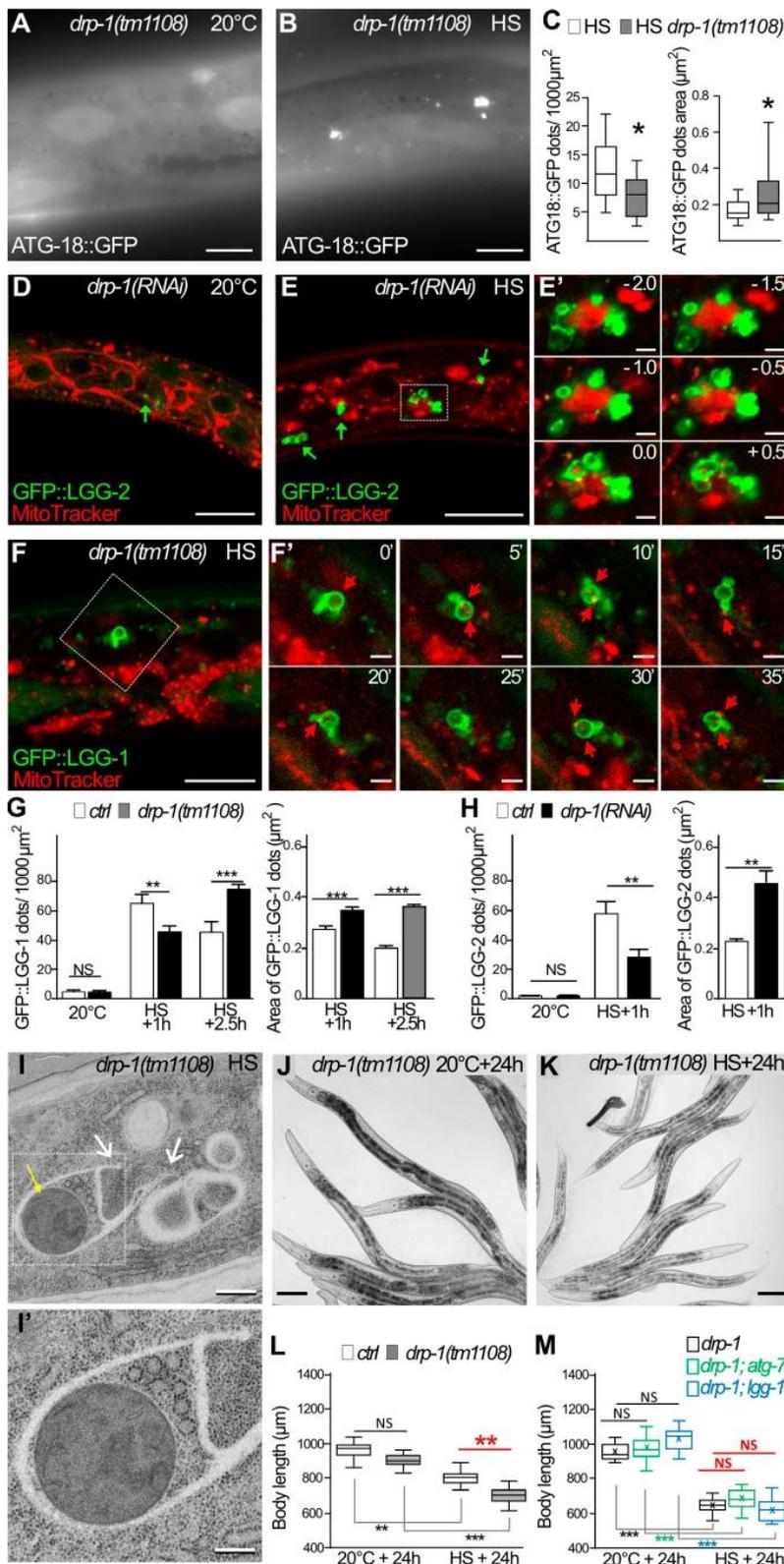


Figure 7. DRP-1 is necessary for functional autophagy after aHS. (A–C) The initiation sites of autophagosomes are visualized with ATG-18::GFP in the epidermis of *drp-1* animals at 20°C (A) and after HS (B). Upon HS, the initiation of autophagy is triggered in *drp-1* animals, but ATG-18 puncta are clustered (compare with Fig. 3, G and H, for a wild-type control). **(C)** Boxplots showing the number and the area of puncta ($n = 13, 14$; *, $P < 0.05$, Wilcoxon test). **(D and E)** Confocal images of mitochondria stained with MitoTracker (red) and autophagosomes visualized with GFP::LGG-2 (green) in the epidermis of *drp-1* animals at 20°C (D) and after aHS (E). Insets in E' are a 0.5-µm Z-series corresponding to the dotted square in E. After aHS, the *drp-1*-depleted animals display abnormal autophagosomes (green arrows) that clustered and intermingled with mitochondria. **(F)** Confocal time-lapse images of mitochondria stained with MitoTracker (red) and autophagosomes visualized with GFP::LGG-1 (green) in the epidermis of *drp-1(tm1108)* mutant after aHS. F' shows time lapse images, corresponding to the dotted square in F, captured every 5 mins. Despite changes in their morphology, the abnormal autophagosomes are persistent. **(G and H)** Quantification of the number and the area of LGG-1- and LGG-2-positive structures in *drp-1* animals at 20°C or after aHS (G, mean ± SEM, $n = 19, 16, 12, 11, 10, 10, 12, 11, 10, 10$, two-way ANOVA; H, mean ± SEM, Wilcoxon test, $n = 10, 4, 9, 10, 11, 10$; **, $P < 0.005$; ***, $P < 0.0005$). **(I)** EM picture of mitochondria (yellow arrow) and cytoplasmic material engulfed in membranous structures in the epidermis of a *drp-1* animal after HS. Membranous nonclosed extensions are visible (white arrows). I' is a zoom of the dotted square in I. **(J–L)** The depletion of DRP-1 exacerbates the developmental phenotypes induced by aHS. *ctrl* (see Fig. 1) and *drp-1(tm1108)* (J and K) animals were maintained at 20°C or submitted to aHS, and their body size was analyzed after 24-h recovery (L; boxplot, $n = 9, 13, 8, 13$; **, $P < 0.001$, Kruskal-Wallis test). **(M)** Blocking autophagy in *drp-1* mutants does not further increase the developmental delay after aHS. *ctrl(RNAi)*, *atg-7(RNAi)*, or *lgg-1(RNAi)* were applied to *drp-1(tm1108)* animals at 20°C or submitted to aHS, and the size of the animals was measured after 24 h (boxplot, $n > 10$, Kruskal-Wallis test). The scale bars are 10 µm (A–F), 1 µm (E'), 2 µm (F'), 0.5 µm (I), 0.5 µm (I') and 100 µm (J and K).

Downloaded from http://rupress.org/jcb/article-pdf/220/4/e201909139/1411672/jcb_201909139.pdf by Cnrs Insh user on 21 March 2021

animals is not a consequence of the inability of elongating autophagosomes to engulf the mitochondria due to their big size.

Because DRP-1 oligomerizes at mitochondrial fission sites, we next studied whether the formation of an autophagosome induced by aHS occurs at such sites (Fig. 8). To circumvent the difficulty of analyzing the rapid and transient fission process, we used a particular CRISPR-engineered allele of *drp-1(or1941)* (Lowry et al., 2015). *drp-1(or1941)* is an in-frame GFP insertion that results in a GFP::DRP-1 that correctly localizes at mitochondrial fission sites (constrictions and tips in heterozygous animal in Fig. 8 A) but is not able to achieve fission (abnormal mitochondrial network in homozygous animals in Fig. 8 B; Montecinos-Franjola et al., 2020). Therefore, *drp-1(or1941)*, which phenocopies a *drp-1* mutant, was used to visualize the presumptive mitochondrial fission sites and was compared with a wild-type *drp-1* as a positive control. The colocalization of GFP::DRP-1 with mitochondria (MitoTracker) was used to identify fission sites and analyzed together with autophagosomes (mCherry::LGG-1) in the epidermis of animals at 20°C or after aHS. The fission sites were visible in control animals at 20°C, where GFP::DRP-1 formed puncta associated with tubular mitochondria (Fig. 8 C'). After aHS, GFP::DRP-1 puncta were present and generally not associated with fragmented mitochondria (Fig. 8 D'), but on rare occasions, a codistribution of GFP::DRP-1 with mCherry::LGG-1 and mitochondria was observed (quantification in Fig. 8 G). In *drp-1(or1941)* at 20°C, GFP::DRP-1 formed puncta, in contact with blebs of mitochondria (Fig. 8, B and E'), suggestive of abortive fission sites. After aHS of *drp-1(or1941)* animals, clusters of autophagosomes associated with mitochondria were observed (Fig. 8 F') recapitulating the *drp-1* loss-of-function phenotype. The number of GFP::DRP-1 dots associated with both mCherry::LGG-1 and mitochondria was increased but remained low. However, the fraction of mCherry::LGG-1 puncta positive for GFP::DRP-1 was increased to 41% (Fig. 8 H). Moreover, 68% of the large autophagic clusters formed in *drp-1(or1941)* mutants presented a GFP::DRP-1 puncta (arrows in Fig. 8 F). Together, these results support the hypothesis that, upon HS, autophagosomes are formed at mitochondrial fission sites and remain associated with presumptive fission sites in a defective *drp-1* background. Altogether, our data suggest that DRP-1 could be involved in the coordination between mitochondrial fission and autophagosome biogenesis during aHS response.

Discussion

Stress response pathways help the organism to adapt to and survive changes in environmental conditions. Autophagy is one of the mechanisms used by the cell to resist and adapt to stress conditions. We have characterized a new aHS paradigm for studying the interplay between autophagy and mitochondrial homeostasis. Our data indicate that aHS modifies mitochondrial function, induces a DRP-1-dependent fission of the mitochondrial network, and triggers an autophagic flux with mitophagy events.

The aHS (1 h at 37°C) during the early fourth larval stage induces a marked developmental delay but no lethality or

sterility, confirming previous analyses at 35°C or 37°C (Jovic et al., 2017; Zevian and Yanowitz, 2014). When young adults are submitted to a similar HS, no obvious anatomical phenotype has been reported, and worms display a hormetic response and increased lifespan (Kumsta et al., 2017). This indicates that, during development, animals are more sensitive to a short but elevated heat than in adulthood. The adaptation to HS is a priority and may be detrimental to the ongoing developmental program. Thus, a transcriptomic analysis revealed a very global shift in expression dynamics during the first 3–4 h of HS and identified cuticle synthesis among the major developmental processes that are disrupted (Jovic et al., 2017). Interestingly, our study revealed a massive HS response in the epidermis, the main tissue involved in cuticle synthesis during larval stages (Page and Johnstone, 2007).

Our data show that mitochondria are rapidly fragmented upon aHS and present a decrease in oxygen consumption. Moreover, the TEM analysis revealed the characteristic presence of dark occlusions in the matrix of heat-stressed mitochondria, which could correspond to protein aggregates due to temperature-induced misfolding of proteins. Such inclusions have not been observed in the cytosol or in the inflated ER, suggesting that they reflect some specificity of the mitochondria. Noticeably, similar inclusions have been described in sperme-derived mitochondria before their elimination by mitophagy (Wang et al., 2016; Zhou et al., 2016; Al Rawi et al., 2011; Sato and Sato, 2011). A similar phenotype has also been reported in a fraction of mitochondria in *C. elegans* mutants for the fusion genes *eat-3/OPA1* and *fzo-1/mfn1* (Byrne et al., 2019), supporting a link between dark aggregate formation and mitochondrial morphological defects.

After aHS, the fragmented mitochondria recover a tubular shape, demonstrating the reversibility of the stressed phenotype. Our data demonstrate that autophagy is important for the mitochondrial rebuilding and for the developmental delay recovery. Studies on adult worm muscles after various stresses suggest a balanced response between PINK-1/PDR-1-dependent mitophagy and mitochondrial biogenesis (Palikaras et al., 2015), but they did not document the rebuilding of the network. After aHS, we observed a strong autophagy response in the epidermis but a weaker one in the muscles, confirming a previous report (Kumsta et al., 2017). We did not detect an obvious implication of the PINK/PARKIN or Nix or FUNDC1 pathways, which are involved in selective mitophagy in *C. elegans* (Leboutet et al., 2020). One possibility is that some mitochondria are eliminated through bulk autophagy, but the hypothesis of a redundancy or a different mitophagy pathway cannot be excluded.

Our study provides the first evidence that, in both basal and aHS-induced autophagy, the autophagosomes are formed close to mitochondria in *C. elegans* epidermis. In yeast and mammal cells, ER-mitochondria contact zones are a major site for autophagosome biogenesis in stress conditions (Hamasaki et al., 2013; Böckler and Westermann, 2014). One can suppose that a similar mechanism occurs in *C. elegans* at specific contact sites between the mitochondria and ER.

Studies in *Drp1* mouse models have shown that the mitochondrial network morphology is highly variable between

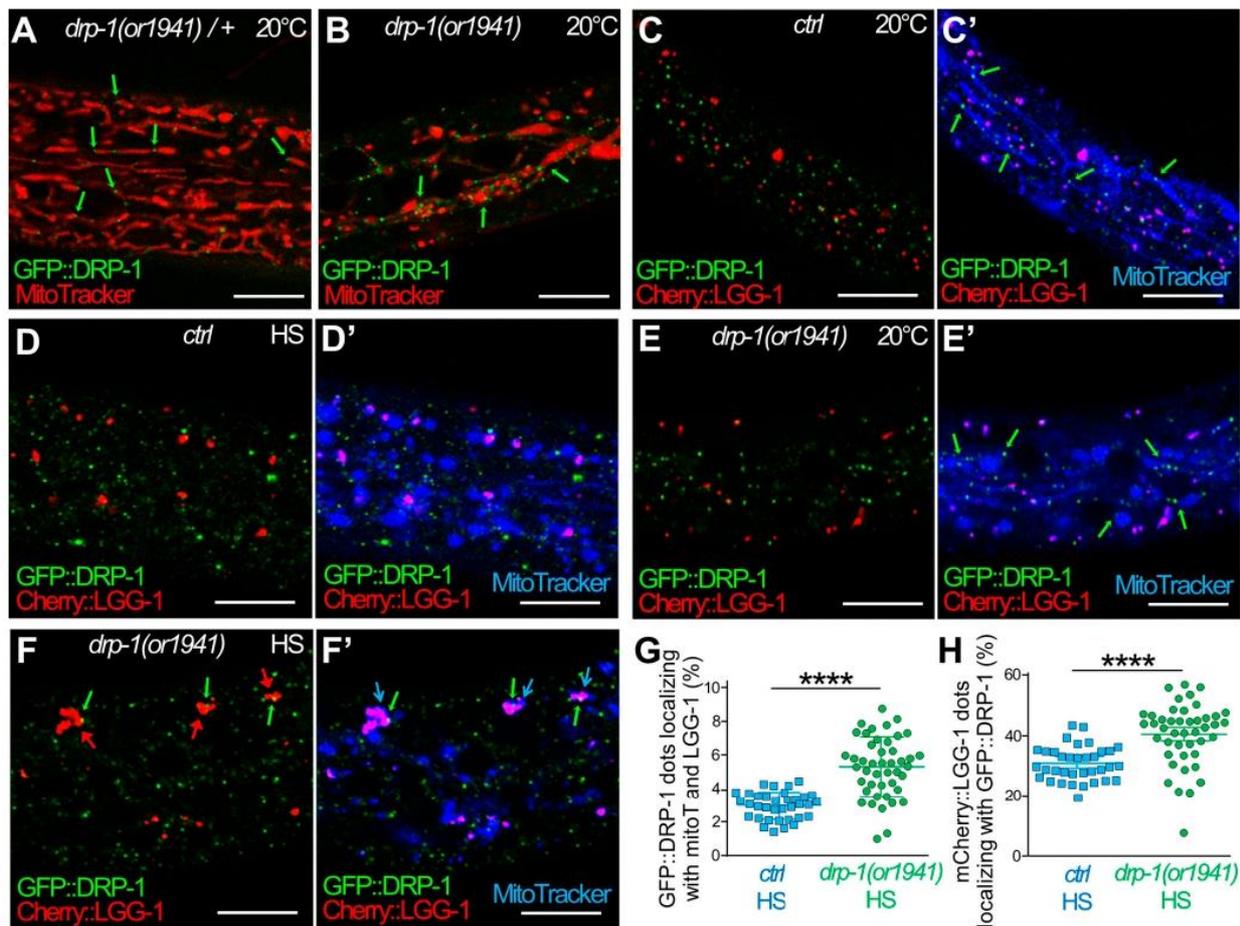


Figure 8. The dysfunction of DRP-1 during aHS induces the accumulation of autophagosomes at mitochondrial fission sites. (A and B) Confocal images of GFP::DRP-1 (green) and MitoTracker (red) in the epidermis of heterozygous control (A) and homozygous *drp-1(or1941)* mutants (B). *drp-1(or1941)* is an in-frame insertion of GFP at the *drp-1* locus that results in an abnormal mitochondrial network (blebs in B), indicating that GFP::DRP-1 is correctly localized (green arrows) but is not functional. This particular GFP allows visualizing the presumptive mitochondrial fission points in a context-phenocopying *drp-1* mutant (B). **(C)** Another transgenic GFP::DRP-1 strain where the *drp-1* locus wild type is used as a positive control. **(C–F)** Confocal live imaging of the epidermis of GFP::DRP-1 in control (C and D) and *drp-1(or1941)* mutant animals (E and F) at 20°C (C and E) and after HS (D and F). The mitochondria are stained with MitoTracker DeepRed (blue), and autophagosomes are visualized with mCherry::LGG-1 (red). C', D', E', and F' show three colors merging. **(C)** In control animals at 20°C, the GFP::DRP-1 puncta are associated to tubular mitochondria but not to mCherry::LGG-1 dots (C'). **(D)** Upon aHS, most of the GFP::DRP-1 puncta are not localizing with mitochondria (B) or with mCherry::LGG-1 dots (C'). **(E)** In *drp-1(or1941)* mutant at 20°C, the presumptive mitochondrial fission points (GFP puncta) are associated with blebs or filamentous mitochondria but not with mCherry::LGG-1 dots (E'). **(F)** After aHS of *drp-1(or1941)* mutants, the clustering of autophagosomes (red arrows pointing to mCherry::LGG-1) is associated with presumptive mitochondrial fission points (green and blue arrows in F'). **(G)** Quantification of the colocalization of GFP::DRP-1 puncta with MitoTracker (mitoT) and mCherry::LGG-1 in the epidermis of control and *drp-1(or1941)* animals after aHS (mean and SEM, $n = 35, 44$; ****, $P < 0.0001$, t test with Welch correction). **(H)** Quantification of the colocalization of mCherry::LGG-1 puncta with GFP::DRP-1 in the epidermis of control and *drp-1(or1941)* animals after aHS (mean and SEM, $n = 35, 44$; ****, $P < 0.0001$, t test with Welch correction). The scale bars are 10 μm .

tissues (Kageyama et al., 2014; Wakabayashi et al., 2009), which could be linked to differences in regard to mitochondrial needs such as ATP production. In *C. elegans*, the mitochondrial phenotype of the *drp-1* mutant has been studied mainly in muscles and neurons, but it has not been characterized in the epidermis. Our in vivo and TEM analyses confirm that, in the absence of DRP-1, the mitochondria form a highly connected network composed of blebs and thin tubules. This could result from the initial constriction steps for mitochondrial fission involving ER contacts (Elgass et al., 2015) and actin filament (Friedman et al., 2011; Korobova et al., 2013; Kraus and Ryan, 2017) but the

impossibility of processing further in the absence of DRP-1. The modification of the mitochondrial morphology of *drp-1* animals after HS suggests that mitochondria are initiating an unsuccessful fission process.

The autophagy/mitophagy response to aHS is affected in *drp-1* mutant worms, which could be due to impaired mitochondrial fission or a quality control defect. The selective elimination of mitochondria by mitophagy was initially linked to mitochondrial fission (Youle and van der Bliek, 2012). Several reports have shown that blocking fission or increasing fusion reduces the mitophagy (Gomes et al., 2011; Rambold et al., 2011;

Twig et al., 2008). Fission could allow a “stress test,” permitting mitochondrial screening and further triggering the complete depolarization followed by mitophagy when a mitochondrion is subfunctional. A recent report proposed that the coordination of mitochondrial fission and control quality involves the interaction of Drp1 with the Zn²⁺ transporter Zip1 (Cho et al., 2019). However, an alternative process has been proposed with a local mitochondrial removal mediated by the extending isolation membrane/phagophore during mitophagy (Yamashita et al., 2016). This study performed in hypoxia or deferiprone-induced mitophagy conditions showed that most of the autophagosomes are formed on or near mitochondria and concluded that Drp1 is not essential for this process, despite a decrease in mitophagy efficiency. Other studies in cultured cells and yeast also suggest that Drp1/Dnm1-dependent fission is not required for mitophagy (Burman et al., 2017; Murakawa et al., 2015; Mendl et al., 2011). Our data support a DRP-1-dependent mechanism of formation of autophagosomes, following aHS in *C. elegans*, in contact with mitochondria, and they open the possibility that DRP-1 plays a role in bulk autophagy. It is possible that the mechanisms of formation of autophagosomes vary depending on the types of stress and cells used. In the epidermis after aHS, the clustering of autophagosomes is observed on both small and large mitochondria and is not abolished in *drp-1;fzo-1*-depleted animals, suggesting that this is not an indirect effect due to a mitochondrial size limitation. Moreover, our data suggest that mitochondrial fission could regulate the autophagic flux and support the hypothesis that DRP-1 is implicated in the coordination between mitochondrial fission and autophagosome biogenesis. It is tempting to speculate that, in the absence of *drp-1*, the contact sites between ER and mitochondria are maintained for a longer time because mitochondrial fission is not achieved. If these contact sites are involved in autophagosome biogenesis, a prolonged initiation-elongation of isolation membrane could explain the clustering observed upon aHS.

Materials and methods

C. elegans culture and strains

Nematode strains were grown on nematode growth media (NGM: 1.5 g NaCl [Sigma-Aldrich, 60142], 1.5 g bacto-peptone [Becton-Dickinson, 211677], 0.5 ml of 5 mg/ml cholesterol [Sigma-Aldrich, C8667], 10 g bacto agar [Becton-Dickinson, 214010], add 500 ml of H₂O. Autoclave the NGM medium and supplement it with 500 μl of 1 M CaCl₂ [Sigma-Aldrich, C3306], 500 μl of 1 M MgSO₄ [Sigma-Aldrich, M5921], 10 ml of 1 M KH₂PO₄ [Sigma-Aldrich, P5655], 1,650 μl of 1 M K₂HPO₄ [Sigma-Aldrich, 60356]) and fed with *Escherichia coli* strain OP50 (Caenorhabditis Genetic Center). The *C. elegans* Bristol N2 strain was used as a wild-type strain. Genotypes of all the strains used in this study are listed in Table S1.

For HS, adult worms were allowed to lay eggs for 1–2 h at 20°C on NGM plates and then removed. NGM plates were maintained at 20°C until the progeny reached early L4 stage and were submitted to 37°C for 60 min in an incubator (Binder). For egg-laying analysis, 10 worms were placed on NGM-OP50 plates for 1 h at 20°C, then removed, and the number of eggs was

immediately scored. Each score was calculated in triplicate and reproduced four times independently.

For MitoTracker staining, L1–L2 worms were transferred to NGM agar plates containing 3.7 μM of Red CMXRos or DeepRed MitoTracker (Molecular Probes, Invitrogen) and incubated for overnight in the dark. Worms were transferred for 1 h into a normal NGM plate for lowering background staining.

RNA-mediated interference

RNAi was delivered by feeding (Kamath and Ahringer, 2003; Timmons and Fire, 1998). L4 animals or embryos were raised onto 1 mM IPTG-containing NGM plates seeded with bacteria *E. coli* HT115[DE3] carrying the empty vector L4440 (pPD129.36) as a control or the bacterial clones from the J. Ahringer library, Open Biosystem (*lgg-1*: C32D5.9, *lgg-2*: ZK593.6, *atg-7*: M7.5, *epg-5*: C56C10.12, *pink-1*: EEED8.9; *dct-1*: C14F5.1, *drp-1*: T12E12.4).

Light microscopy imaging

Epifluorescence images were captured on an AxioImagerM2 microscope (Zeiss) with 10×/0.3 NA EC Plan Neofluar or 100×/1.4 NA plan apochromat differential interference contrast (DIC) oil objectives using ZEN acquisition software (Zeiss) coupled to a camera (AxioCam506mono). Worms were immobilized by 40 mM sodium azide (in M9) and mounted on 2% agarose pads. Considering the effect of sodium azide on mitochondrial respiration, the observation duration after mounting was limited within 10 min.

Confocal images were captured with LAS-X software on a confocal Leica TCS SP8 DMI6000 microscope using an HC plan apochromat 63×/1.4 NA oil objective, with serial z sections of 0.3–1 μm. Images were analyzed using the ImageJ Cell Counter plugin (<http://imagej.nih.gov/ij>). The time of recovery after HS is indicative and could vary to a maximum of 30 min due to mounting and acquisition processes.

To perform time-lapse microscopy experiments, worms were grown in the dark on plates containing MitoTracker. Then, L4 worms were transferred for 1 h onto a normal plate for lowering background staining and then submitted to 1 h at 37°C. After 40 min of recovery at 20°C, the animals were immobilized in 30% (wt/vol) Pluronic F-127 gel (Sigma-Aldrich) containing 30-μm polystyrene microbeads. Confocal images were captured with serial z sections of 0.8 μm every 5 min (3% of 488-nm laser intensity, gain 600, binning 2 × 2; 10% of 638-nm laser intensity, gain 850, binning 2 × 2). Image analyses were performed with ImageJ or Fiji software.

Gonads were dissected in 1.25% PFA-PBS and fixed for 30 min in 4% PFA-PBS. After 30 min of saturation in PBS containing 4% BSA (Sigma-Aldrich; A7030) and 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich; T9284), samples were incubated overnight with 60-kD heat shock protein (HSP60) monoclonal antibodies (1:5; Developmental Studies Hybridoma Bank, University of Iowa). After incubation with anti-mouse antibodies Alexa Fluor 488 (Molecular Probes; 1:500, A28175) and Hoechst (Molecular Probes; 1:500), gonads were mounted in 1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane (Sigma-Aldrich).

Analyses of mitochondrial shape

The aspect ratio and the form factor, which are indicators of the mitochondrial length and branching, respectively, have been

quantified using ImageJ software. Briefly, the images are convolved using the matrix developed by Koopman (Koopman et al., 2016; Marchi et al., 2017), then a threshold is applied to isolate mitochondria from background. In the case of *drp-1* mutant, the convolution was not applied, because it generated artificial objects. Shape descriptors of the mitochondria were calculated by implementing the Analyze Particles tool with a minimum filter of 15. For EM pictures, the outlines of mitochondria were manually drawn using freehand selections in ImageJ, then area, perimeter, and shape descriptors (roundness) were measured.

Statistics

All statistical analyses were performed using either GraphPad Prism or R software (<https://www.r-project.org/>). The Shapiro-Wilk test was used to evaluate the normal distribution of the values, and the Hartley F_{\max} test was used for similar variance analysis. Data derived from different genetic backgrounds were compared by two-sided Student's *t* test, ANOVA, Kruskal-Wallis test, or Wilcoxon-Mann-Whitney test. Fisher's exact test was used for nominal variables. Boxplot representations indicate the first (Q1/25th percentile), median (Q2/50th percentile), and third (Q3/75th percentile) quartiles, and whiskers are a maximum of 1.5 times the interquartile range (excluding any outliers). The cross X indicates the mean.

EM

L4 larvae were transferred to M9 20% BSA (Sigma-Aldrich; A7030) on 200- μ m-deep flat carriers (Leica Biosystems), followed by cryoimmobilization in the EMPACT-2 high-pressure freezer apparatus (Leica Microsystems) as described previously (Largeau and Legouis, 2019). Cryosubstitution was performed using an automated freeze-substitution system (AFS2) with an integrated binocular lens and incubating chamber (Leica Microsystems) with acetone. Blocks were infiltrated with 100% Epon and embedded in fresh Epon (Agar Scientific; R1165). Ultrathin sections of 80 nm were cut on a ultramicrotome (Leica Microsystems; EM UC7) and collected on a formvar- and carbon-coated copper slot grid (LFG; FCF-2010-CU-50). Sections were contrasted with 0.05% oolong tea extract for 30 min and 0.08 M lead citrate (Sigma-Aldrich; 15326) for 8 min. Sections were observed with a Jeol 1400 TEM instrument at 120 kV, and images were acquired with a Gatan 11-megapixel SC1000 Orius charge-coupled device camera.

Oxygen consumption measurements

Synchronized young L4 larvae were recovered in M9 buffer (Brenner, 1974) and washed three times in the following solution: 60 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 60 mg $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 4 mg KCl per liter of double distilled water (Luz et al., 2015) and separated by 2-min centrifugation at 100 *g* at 21°C. Worms were transferred in Seahorse XF plate wells in a final 180- μ l volume, and six measurements were performed with a setting corresponding to 2 min mixing, 30 s waiting, and 2 min measuring. 15 mM carbonyl cyanide-4-(trifluoromethoxy)phenylhydrazone (Sigma; C2920) in 0.17% DMSO was used to determine maximal respiration, and 40 mM sodium azide was used to inhibit mitochondrial respiration. The number of animals (15–30 per well)

was determined to normalize the oxygen consumption rate calculated using Wave software (Agilent). Experiments were performed in triplicates and repeated independently.

Western blot analysis

Total protein extracts were prepared from a synchronized population of L4 larvae. The worms were collected after centrifugation and then mixed with the lysis buffer (PBS-Triton 2%) containing glass beads. They were then denatured using the Precellys 24 machine at 6,000 rpm with incubation for ~5 min twice to cool the sample. The protein extracts are then centrifuged at 15,000 rpm and separated on a NuPAGE 4–12% Bis-Tris gel (Life Technologies; NP0321BOX). The nonspecific sites are then blocked after the incubation for 1 h with TBS-Tween 1 \times (Tris Base NaCl, Tween 20) 5% (w/v) milk. Blots were probed with antibodies against GFP (1:1,000, mouse, 11814460001; Sigma-Aldrich), LGG-1 (1:200; rabbit), tubulin (1:2,000, 078K4763; Sigma-Aldrich), ATP-5 (1:1,000, ab14705; Abcam), and mitochondrially encoded cytochrome c oxidase I (1:2,000, ab14748; Abcam) and revealed using HRP-conjugated antibodies (anti-rabbit, 1:1,000, W401B, and anti-mouse, 1:5,000, W4021; both from Promega) and SuperSignal Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Fisher Scientific; 34579). Signals were revealed on an LAS-3000 photomicroimager (Fuji) and quantified with ImageJ.

Online supplemental material

Fig. S1 (complementary to Fig. 1) characterizes cellular defects after aHS. Fig. S2 (complementary to Fig. 2) illustrates how specific reporters can affect mitochondrial network morphology. Fig. S3 (complementary to Fig. 3) shows that aHS induces autophagy in various tissues. Fig. S4 (complementary to Figs. 4 and 5) shows that blocking autophagy but not mitophagy delays the rebuilding of the mitochondrial network after aHS. Fig. S5 (complementary to Fig. 7) shows that the clustering of autophagosomes at mitochondria is maintained in *drp-1;fzo-1* animals after aHS. Table S1 lists strains used in the study.

Acknowledgments

This paper is dedicated to the memory of our colleague and friend Agnès Delahodde.

For providing reagents, the authors thank Hong Zhang (National Laboratory of Biomacromolecules, Beijing, China), Chonglin Yang (Center for Life Science, Yunnan University, China), Nektarios Tavernarakis (Institute of Molecular Biology and Biotechnology, Heraklion, Greece), Steven Zuryn (The University of Queensland, Brisbane, Australia), Rosa Navarro (Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México), Ming Li (School of Life Sciences, Yunnan University, China), Sylvie Hermann-Ledenmat (I2BC, Gif-sur-Yvette, France), and Raynald Cossard (I2BC, Gif-sur-Yvette, France), and the *Caenorhabditis* Genetic Center, which is funded by the National Institutes of Health, National Center for Research Resources. We are grateful to Legouis laboratory members for helpful discussions.

This work was supported by the Agence Nationale de la Recherche (project EAT; ANR-12-BSV2-018), the Association pour

Chen et al.

DRP-1 regulates autophagy after heat stress

la Recherche sur le Cancer (SFI20111203826), and the Ligue Contre le Cancer (M29506). Y. Chen received a fellowship from the China Scholarship Council, and R. Leboutet received a fellowship from the Fondation pour la Recherche Médicale. The present work has benefited from the core facilities of Imagerie-Gif (<http://www.i2bc.paris-saclay.fr>), a member of Infrastructures en Biologie Santé et Agronomie (<http://www.ibisa.net>), supported by France BioImaging (ANR-10-INBS-04-01) and the Labex Saclay Plant Science (ANR-11-IDEX-0003-02). The monoclonal antibody HSP60 was obtained from the Developmental Studies Hybridoma Bank, created by the Eunice Kennedy Shriver National Institute of Child Health and Human Development of the National Institutes of Health and maintained at the Department of Biology, University of Iowa, Iowa City, IA.

The authors declare no competing financial interests.

Author contributions: Y. Chen: methodology, investigation, validation, formal analysis, visualization. R. Leboutet: methodology, investigation, validation, visualization. C. Largeau: methodology, investigation, validation, formal analysis, visualization. S. Zentout and C. Lefebvre: investigation, validation, formal analysis, visualization. A. Delahodde: conceptualization, supervision, resources. E. Culetto: methodology, investigation, validation, formal analysis, supervision, writing – original draft. R. Legouis: conceptualization, project administration, supervision, funding acquisition, visualization, writing – original draft. All authors: review and editing.

Submitted: 23 September 2019

Revised: 21 December 2020

Accepted: 21 January 2021

References

- Ahier, A., C.-Y. Dai, A. Tweedie, A. Bezawork-Geleta, I. Kirmes, and S. Zuryn. 2018. Affinity purification of cell-specific mitochondria from whole animals resolves patterns of genetic mosaicism. *Nat. Cell Biol.* 20: 352–360. <https://doi.org/10.1038/s41556-017-0023-x>
- Al Rawi, S., S. Louvet-Vallée, A. Djeddi, M. Sachse, E. Culetto, C. Hajjar, L. Boyd, R. Legouis, and V. Galy. 2011. Postfertilization autophagy of sperm organelles prevents paternal mitochondrial DNA transmission. *Science*. 334:1144–1147. <https://doi.org/10.1126/science.1211878>
- Alberti, A., X. Michelet, A. Djeddi, and R. Legouis. 2010. The autophagosomal protein LGG-2 acts synergistically with LGG-1 in dauer formation and longevity in *C. elegans*. *Autophagy*. 6:622–633. <https://doi.org/10.4161/autophagy.6.5.12252>
- Böckler, S., and B. Westermann. 2014. Mitochondrial ER contacts are crucial for mitophagy in yeast. *Dev. Cell*. 28:450–458. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2014.01.012>
- Breckenridge, D.G., B.-H. Kang, D. Kokel, S. Mitani, L.A. Staehelin, and D. Xue. 2008. *Caenorhabditis elegans drp-1* and *fis-2* regulate distinct cell-death execution pathways downstream of *ced-3* and independent of *ced-9*. *Mol. Cell*. 31:586–597. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.07.015>
- Brenner, S. 1974. The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics*. 77:71–94. <https://doi.org/10.1093/genetics/77.1.71>
- Burman, J.L., S. Pickles, C. Wang, S. Sekine, J.N.S. Vargas, Z. Zhang, A.M. Youle, C.L. Nezhich, X. Wu, J.A. Hammer, et al. 2017. Mitochondrial fission facilitates the selective mitophagy of protein aggregates. *J. Cell Biol.* 216:3231–3247. <https://doi.org/10.1083/jcb.201612106>
- Byrne, J.J., M.S. Soh, G. Chandhok, T. Vijayaraghavan, J.-S. Teoh, S. Crawford, A.E. Cobham, N.M.B. Yapa, C.K. Mirth, and B. Neumann. 2019. Disruption of mitochondrial dynamics affects behaviour and lifespan in *Caenorhabditis elegans*. *Cell. Mol. Life Sci.* 76:1967–1985. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03024-5>
- Chen, Y., V. Scarcelli, and R. Legouis. 2017. Approaches for studying autophagy in *Caenorhabditis elegans*. *Cells*. 6:27. <https://doi.org/10.3390/cells6030027>

Chen et al.

DRP-1 regulates autophagy after heat stress

- Cho, H.M., J.R. Ryu, Y. Jo, T.W. Seo, Y.N. Choi, J.H. Kim, J.M. Chung, B. Cho, H.C. Kang, S.-W. Yu, et al. 2019. Drp1-Zip1 interaction regulates mitochondrial quality surveillance system. *Mol. Cell*. 73:364–376.e8. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.11.009>
- Desai, S., Z. Liu, J. Yao, N. Patel, J. Chen, Y. Wu, E.E.-Y. Ahn, O. Fodstad, and M. Tan. 2013. Heat shock factor 1 (HSF1) controls chemoresistance and autophagy through transcriptional regulation of autophagy-related protein 7 (ATG7). *J. Biol. Chem.* 288:9165–9176. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.422071>
- Dokladny, K., M.N. Zuhl, M. Mandell, D. Bhattacharya, S. Schneider, V. Deretic, and P.L. Moseley. 2013. Regulatory coordination between two major intracellular homeostatic systems: heat shock response and autophagy. *J. Biol. Chem.* 288:14959–14972. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.462408>
- Elgass, K.D., E.A. Smith, M.A. LeGros, C.A. Larabell, and M.T. Ryan. 2015. Analysis of ER-mitochondria contacts using correlative fluorescence microscopy and soft X-ray tomography of mammalian cells. *J. Cell Sci.* 128:2795–2804. <https://doi.org/10.1242/jcs.169136>
- Fernández-Cárdenas, L.P., E. Villanueva-Chimal, L.S. Salinas, C. José-Nuñez, M. Tuena de Gómez Puyou, and R.E. Navarro. 2017. *Caenorhabditis elegans* ATPase inhibitor factor 1 (IFI) MAI-2 preserves the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and is important to induce germ cell apoptosis. *PLoS One*. 12:e0181984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181984>
- Friedman, J.R., L.L. Lackner, M. West, J.R. DiBenedetto, J. Nunnari, and G.K. Voeltz. 2011. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*. 334:358–362. <https://doi.org/10.1126/science.1207385>
- Gomes, L.C., G. Di Benedetto, and L. Scorrano. 2011. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat. Cell Biol.* 13:589–598. <https://doi.org/10.1038/ncb2220>
- Hamasaki, M., N. Furuta, A. Matsuda, A. Nezu, A. Yamamoto, N. Fujita, H. Oomori, T. Noda, T. Haraguchi, Y. Hiraoka, et al. 2013. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*. 495:389–393. <https://doi.org/10.1038/nature11910>
- Haynes, C.M., C.J. Fiorese, and Y.-F. Lin. 2013. Evaluating and responding to mitochondrial dysfunction: the mitochondrial unfolded-protein response and beyond. *Trends Cell Biol.* 23:311–318. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2013.02.002>
- Hirsh, D., and R. Vanderslice. 1976. Temperature-sensitive developmental mutants of *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Biol.* 49:220–235. [https://doi.org/10.1016/0012-1606\(76\)90268-2](https://doi.org/10.1016/0012-1606(76)90268-2)
- Jenzer, C., M. Mamil-Ségalen, C. Lefebvre, C. Largeau, A. Glatigny, and R. Legouis. 2014. Human GABARAP can restore autophagosomal biogenesis in a *C. elegans* lgg-1 mutant. *Autophagy*. 10:1868–1872. <https://doi.org/10.4161/autophagy.29745>
- Jenzer, C., E. Simionato, C. Largeau, V. Scarcelli, C. Lefebvre, and R. Legouis. 2019. Autophagy mediates phosphatidylserine exposure and phagosome degradation during apoptosis through specific functions of GABARAP/LGG-1 and LC3/LGG-2. *Autophagy*. 15:228–241. <https://doi.org/10.1080/15548627.2018.1512452>
- Ji, W.K., A.L. Hatch, R.A. Merrill, S. Strack, and H.N. Higgs. 2015. Actin filaments target the oligomeric maturation of the dynamin GTPase Drp1 to mitochondrial fission sites. *eLife*. 4:e11553. <https://doi.org/10.7554/eLife.11553>
- Jia, K., A.C. Hart, and B. Levine. 2007. Autophagy genes protect against disease caused by polyglutamine expansion proteins in *Caenorhabditis elegans*. *Autophagy*. 3:21–25. <https://doi.org/10.4161/autophagy.3528>
- Jovic, K., M.G. Sterken, J. Grilli, R.P.J. Bevers, M. Rodriguez, J.A.G. Riksen, S. Allesina, J.E. Kammenga, and L.B. Snoek. 2017. Temporal dynamics of gene expression in heat-stressed *Caenorhabditis elegans*. *PLoS One*. 12: e0189445. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0189445>
- Kageyama, Y., M. Hoshijima, K. Seo, D. Bedja, P. Sysa-Shah, S.A. Andrabi, W. Chen, A. Höke, V.L. Dawson, T.M. Dawson, et al. 2014. Parkinson-independent mitophagy requires Drp1 and maintains the integrity of mammalian heart and brain. *EMBO J.* 33:2798–2813. <https://doi.org/10.15252/emboj.201488658>
- Kamath, R.S., and J. Ahringer. 2003. Genome-wide RNAi screening in *Caenorhabditis elegans*. *Methods*. 30:313–321. [https://doi.org/10.1016/S1046-2023\(03\)00050-1](https://doi.org/10.1016/S1046-2023(03)00050-1)
- Koopman, M., H. Michels, B.M. Dancy, R. Kamble, L. Mouchiroud, J. Auwerx, E.A.A. Nollen, and R.H. Houtkooper. 2016. A screening-based platform for the assessment of cellular respiration in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Protoc.* 11:1798–1816. <https://doi.org/10.1038/nprot.2016.106>
- Korobova, F., V. Ramabhadran, and H.N. Higgs. 2013. An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science*. 339:464–467. <https://doi.org/10.1126/science.1228360>

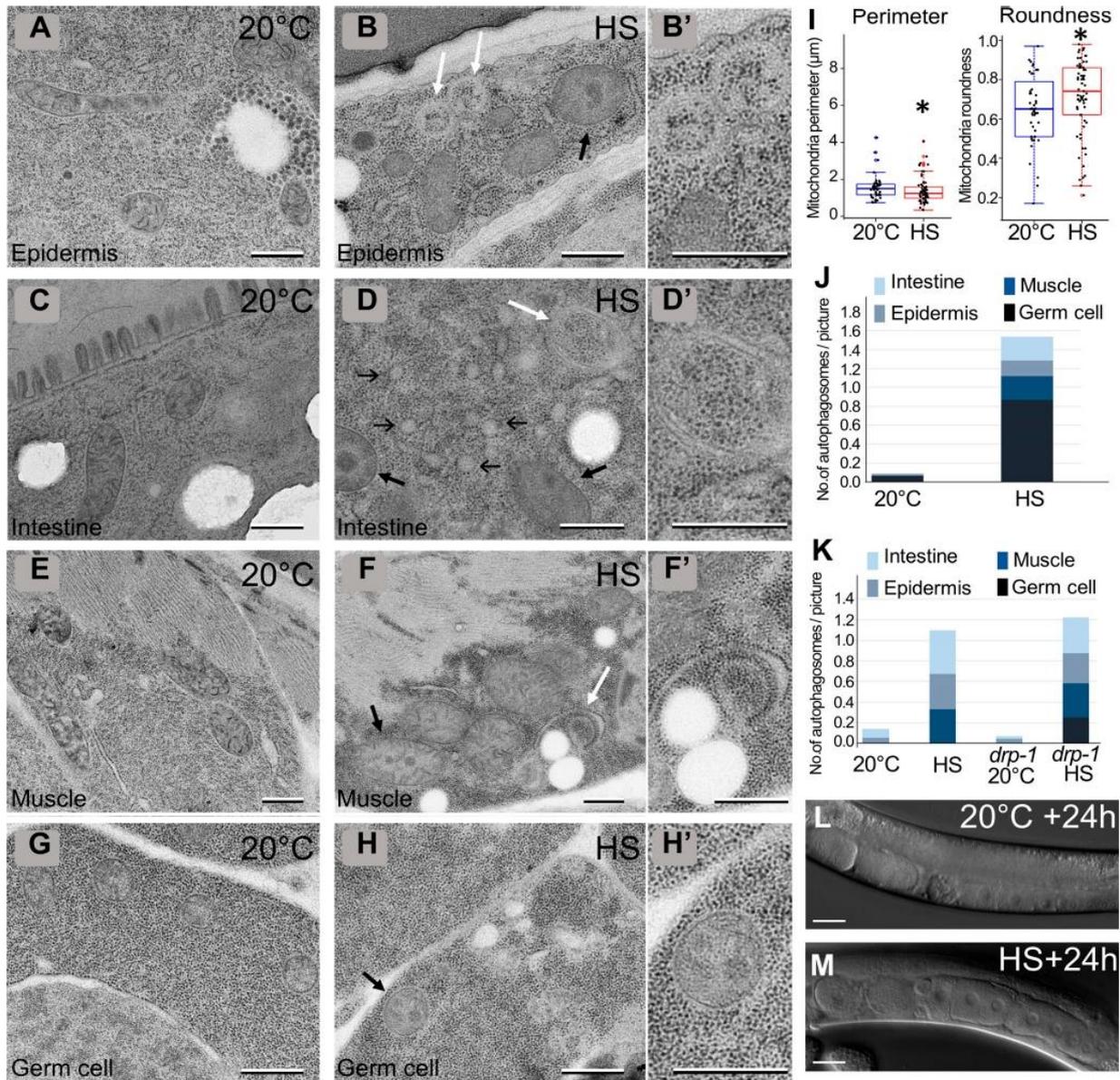
Journal of Cell Biology

<https://doi.org/10.1083/jcb.201909139>

15 of 16

- Kraus, F., and M.T. Ryan. 2017. The constriction and scission machineries involved in mitochondrial fission. *J. Cell Sci.* 130:2953–2960. <https://doi.org/10.1242/jcs.199562>
- Kunsta, C., J.T. Chang, J. Schmalz, and M. Hansen. 2017. Hormetic heat stress and HSF-1 induce autophagy to improve survival and proteostasis in *C. elegans*. *Nat. Commun.* 8:14337. <https://doi.org/10.1038/ncomms14337>
- Labbadia, J., R.M. Briellmann, M.F. Neto, Y.-F. Lin, C.M. Haynes, and R.I. Morimoto. 2017. Mitochondrial stress restores the heat shock response and prevents proteostasis collapse during aging. *Cell Rep.* 21:1481–1494. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.10.038>
- Labrousse, A.M., M.D. Zappaterra, D.A. Rube, and A.M. van der Bliek. 1999. *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Cell.* 4:815–826. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(00\)80391-3](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(00)80391-3)
- Largeau, C., and R. Legouis. 2019. Correlative light and electron microscopy to analyze LC3 proteins in *Caenorhabditis elegans* embryo. *Methods Mol. Biol.* 1880:281–293. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8873-0_18
- Leboutet, R., Y. Chen, R. Legouis, and E. Culetto. 2020. Mitophagy during development and stress in *C. elegans*. *Mech. Ageing Dev.* 189:11266. <https://doi.org/10.1016/j.mad.2020.11266>
- Lee, J., S. Giordano, and J. Zhang. 2012. Autophagy, mitochondria and oxidative stress: cross-talk and redox signalling. *Biochem. J.* 441:523–540. <https://doi.org/10.1042/BJ20111451>
- Lee, J.E., L.M. Westrate, H. Wu, C. Page, and G.K. Voeltz. 2016. Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature.* 540:139–143. <https://doi.org/10.1038/nature20555>
- Lowry, J., J. Yochem, C.-H. Chuang, K. Sugioka, A.A. Connolly, and B. Bowerman. 2015. High-throughput cloning of temperature-sensitive *Caenorhabditis elegans* mutants with adult syncytial germline membrane architecture defects. *G3 (Bethesda)*. 5:2241–2255. <https://doi.org/10.1534/g3.115.021451>
- Luz, A.L., J.P. Rooney, L.L. Kubik, C.P. Gonzalez, D.H. Song, and J.N. Meyer. 2015. Mitochondrial morphology and fundamental parameters of the mitochondrial respiratory chain are altered in *Caenorhabditis elegans* strains deficient in mitochondrial dynamics and homeostasis processes. *PLoS One.* 10:e0130940. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0130940>
- Mamil-Ségalen, M., C. Lefebvre, C. Jenzer, M. Trichet, C. Boulogne, B. Satiat-Jeu-nemaitre, and R. Legouis. 2014. The *C. elegans* LC3 acts downstream of GABARAP to degrade autophagosomes by interacting with the HOPS subunit VPS39. *Dev. Cell.* 28:43–55. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2013.11.022>
- Marchi, S., M. Bonora, S. Patergnani, C. Giorgi, and P. Pinton. 2017. Methods to assess mitochondrial morphology in mammalian cells mounting autophagic or mitophagic responses. *Methods Enzymol.* 588:171–186. <https://doi.org/10.1016/bs.mie.2016.09.080>
- Mendl, N., A. Occhipinti, M. Müller, P. Wild, I. Dikic, and A.S. Reichert. 2011. Mitophagy in yeast is independent of mitochondrial fission and requires the stress response gene WHI2. *J. Cell Sci.* 124:1339–1350. <https://doi.org/10.1242/jcs.076406>
- Momma, K., T. Homma, R. Isaka, S. Sudevan, and A. Higashitani. 2017. Heat-induced calcium leakage causes mitochondrial damage in *Caenorhabditis elegans* body-wall muscles. *Genetics.* 206:1985–1994. <https://doi.org/10.1534/genetics.117.202747>
- Montecinos-Franjola, F., B.L. Bauer, J.A. Mears, and R. Ramachandran. 2020. GFP fluorescence tagging alters dynamin-related protein 1 oligomerization dynamics and creates disassembly-refractory puncta to mediate mitochondrial fission. *Sci. Rep.* 10:14777. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71655-x>
- Murakawa, T., O. Yamaguchi, A. Hashimoto, S. Hikoso, T. Takeda, T. Oka, H. Yasui, H. Ueda, Y. Akazawa, H. Nakayama, et al. 2015. Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nat. Commun.* 6:7527. <https://doi.org/10.1038/ncomms8527>
- Page, A.P., and I.L. Johnstone. 2007. The cuticle (March 19, 2007). *WormBook*, ed. The *C. elegans* Research Community, *WormBook*, <http://www.wormbook.org>. <https://doi.org/10.1895/wormbook.1.138.1>
- Palikaras, K., E. Lionaki, and N. Tavernarakis. 2015. Coordination of mitophagy and mitochondrial biogenesis during ageing in *C. elegans*. *Nature.* 521:525–528. <https://doi.org/10.1038/nature14300>
- Palikaras, K., E. Lionaki, and N. Tavernarakis. 2018. Mechanisms of mitophagy in cellular homeostasis, physiology and pathology. *Nat. Cell Biol.* 20:1013–1022. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0176-2>
- Pickles, S., P. Vigié, and R.J. Youle. 2018. Mitophagy and quality control mechanisms in mitochondrial maintenance. *Curr. Biol.* 28:R170–R185. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2018.01.004>
- Rambold, A.S., B. Kostecky, N. Elia, and J. Lippincott-Schwartz. 2011. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 108:10190–10195. <https://doi.org/10.1073/pnas.1107402108>
- Sato, M., and K. Sato. 2011. Degradation of paternal mitochondria by fertilization-triggered autophagy in *C. elegans* embryos. *Science.* 334:1141–1144. <https://doi.org/10.1126/science.1210333>
- Scholtes, C., S. Bellemin, E. Martin, M. Carre-Pierrat, B. Mollereau, K. Gieseler, and L. Walter. 2018. DRP-1-mediated apoptosis induces muscle degeneration in dystrophin mutants. *Sci. Rep.* 8:7354. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-25727-8>
- Shen, Q., K. Yamano, B.P. Head, S. Kawajiri, J.T.M. Cheung, C. Wang, J.-H. Cho, N. Hattori, R.J. Youle, and A.M. van der Bliek. 2014. Mutations in Fisi disrupt orderly disposal of defective mitochondria. *Mol. Biol. Cell.* 25:145–159. <https://doi.org/10.1091/mbc.e13-09-0525>
- Shpilka, T., and C.M. Haynes. 2018. The mitochondrial UPR: mechanisms, physiological functions and implications in ageing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 19:109–120. <https://doi.org/10.1038/nrm.2017.110>
- Timmons, L., and A. Fire. 1998. Specific interference by ingested dsRNA. *Nature.* 395:854. <https://doi.org/10.1038/27579>
- Twig, G., A. Elorza, A.J.A. Molina, H. Mohamed, J.D. Wikstrom, G. Walzer, L. Stiles, S.E. Haigh, S. Katz, G. Las, et al. 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 27:433–446. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601963>
- Wakabayashi, J., Z. Zhang, N. Wakabayashi, Y. Tamura, M. Fukaya, T.W. Kensler, M. Iijima, and H. Sesaki. 2009. The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J. Cell Biol.* 186:805–816. <https://doi.org/10.1083/jcb.200903065>
- Wang, Y., Y. Zhang, L. Chen, Q. Liang, X.-M. Yin, L. Miao, B.-H. Kang, and D. Xue. 2016. Kinetics and specificity of paternal mitochondrial elimination in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Commun.* 7:12569. <https://doi.org/10.1038/ncomms12569>
- Wu, H., P. Carvalho, and G.K. Voeltz. 2018. Here, there, and everywhere: the importance of ER membrane contact sites. *Science.* 361:eaan5835. <https://doi.org/10.1126/science.aan5835>
- Yamashita, S.-I., X. Jin, K. Furukawa, M. Hamasaki, A. Nezu, H. Otera, T. Saigusa, T. Yoshimori, Y. Sakai, K. Mihara, et al. 2016. Mitochondrial division occurs concurrently with autophagosome formation but independently of Drp1 during mitophagy. *J. Cell Biol.* 215:649–665. <https://doi.org/10.1083/jcb.201605093>
- Youle, R.J., and A.M. van der Bliek. 2012. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science.* 337:1062–1065. <https://doi.org/10.1126/science.1219855>
- Zevian, S.C., and J.L. Yanowitz. 2014. Methodological considerations for heat shock of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Methods.* 68:450–457. <https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2014.04.015>
- Zhao, Y.G., Y. Chen, G. Miao, H. Zhao, W. Qu, D. Li, Z. Wang, N. Liu, L. Li, S. Chen, et al. 2017. The ER-localized transmembrane protein EPG-3/VMP1 regulates SERCA activity to control ER-isolation membrane contacts for autophagosome formation. *Mol. Cell.* 67:974–989.e6. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.005>
- Zhou, Q., H. Li, H. Li, A. Nakagawa, J.L.J. Lin, E.-S. Lee, B.L. Harry, R.R. Skeen-Gaar, Y. Suehiro, D. William, et al. 2016. Mitochondrial endonuclease G mediates breakdown of paternal mitochondria upon fertilization. *Science.* 353:394–399. <https://doi.org/10.1126/science.aaf4777>

Supplemental material



Downloaded from http://rupress.org/jcb/article-pdf/220/4/e201909139/1411672/jcb_201909139.pdf by Cnrs Insb user on 21 March 2021

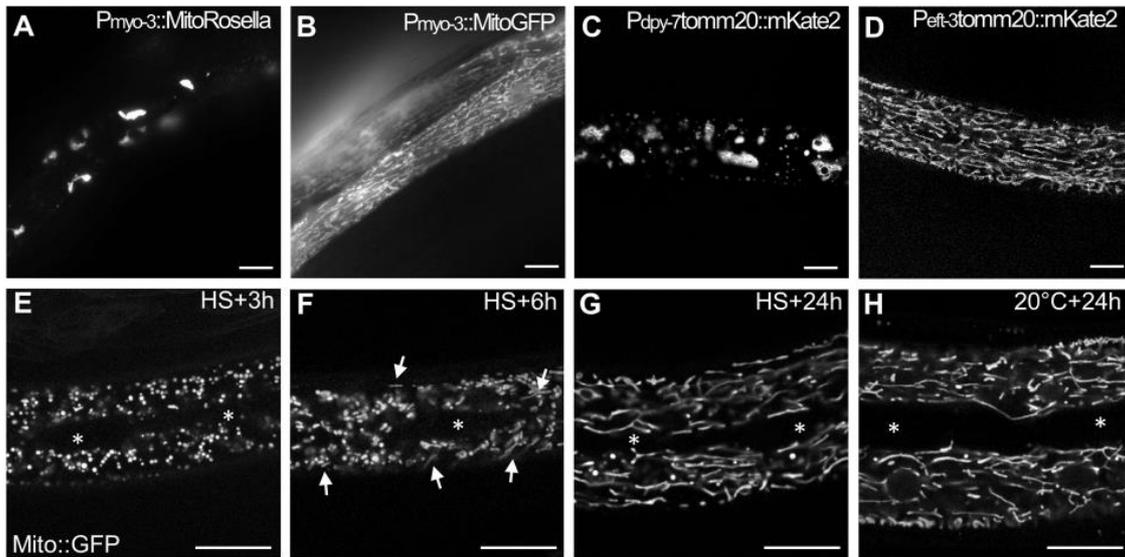


Figure S2. **Specific reporters can affect mitochondrial network morphology (complementary to Fig. 2).** (A–D) Live images of the mitochondria in the body wall muscles of the MitoRosella (A) or MitoGFP (B) and in the epidermis of TOMM-20::mKate2 under the control of an epidermal (C) or ubiquitous promoter (D). Both the type and the level of expression of the fluorescent reporter could affect the mitochondrial network at 20°C. (E–H) Confocal images of Mito::GFP expressed in the epidermis and showing the rebuilding of the mitochondrial network after aHS. The white asterisks show the position of the specialized seam cells of the epidermis that do not express Mito::GFP. White arrows in F point to tubular mitochondria. The scale bars represent 10 μm.

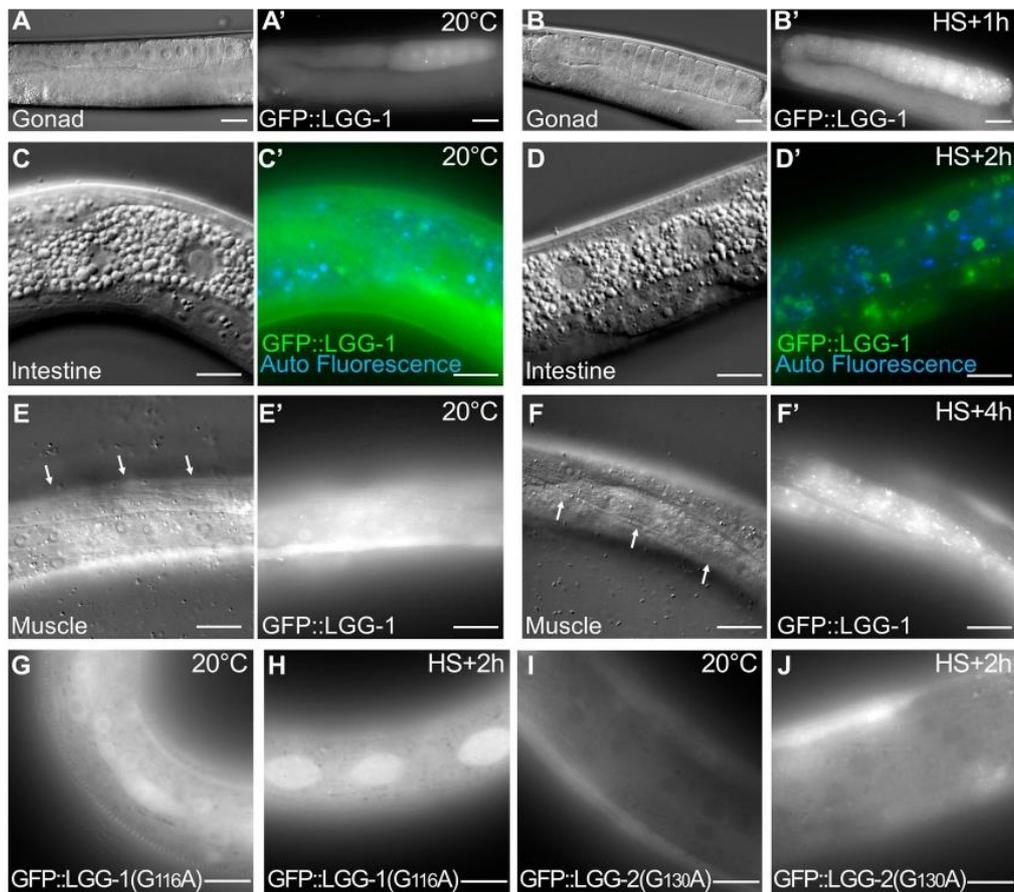


Figure S3. **aHS induces autophagy in various tissues (complementary to Fig. 3).** (A–F) DIC pictures and the corresponding fluorescence images (A'–F') of GFP::LGG-1 in animals at 20°C (A, C, and E) and after aHS (B, D, and F). The increase of LGG-1 puncta is shown in the germ cells (A' and B'), the intestine (C' and D'), and the body wall muscles (white arrows in E and F) of aHS animals. Note that in the intestine, the GFP::LGG-1 stains large vesicular structures. (G–J) Images of the epidermis showing that the nonlipidated GFP::LGG-1(G116A) (G and H) and GFP::LGG-2(G130A) (I and J) do not form puncta after HS (H and J). The scale bars represent 20 μ m (A and B) or 10 μ m (C–J).

Downloaded from http://rupress.org/jcb/article-pdf/220/4/e201909139/1411672/jcb_201909139.pdf by Ctrs Insb user on 21 March 2021

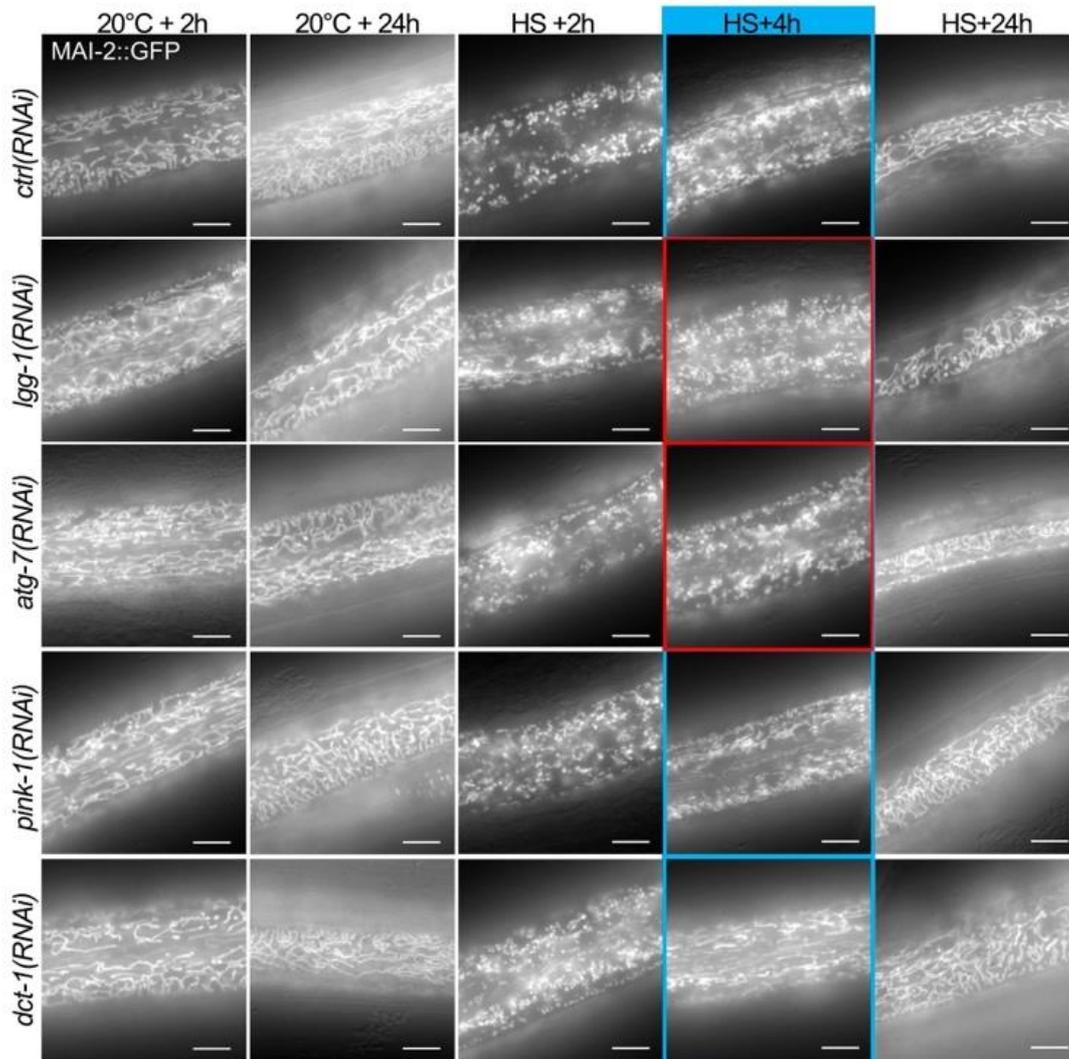


Figure S4. **Blocking autophagy but not mitophagy delays the rebuilding of the mitochondrial network after aHS (complementary to Figs. 4 and 5).** Epifluorescence pictures of MAI-2::GFP illustrating the rebuilding of the mitochondrial network in the epidermis after aHS. At 20°C, the depletion of autophagy or mitophagy genes does not result in a strong modification of the mitochondrial network. In *lgg-1*-, *atg-7*-, *pink-1*-, and *dct-1*-depleted animals, the aHS results in the strong fragmentation of the mitochondria, but after 4 h of recovery, *atg-7(RNAi)* and *lgg-1(RNAi)* animals display a less efficient rebuilding. The blue- and red-framed images show regions of the hypodermis with or without tubular mitochondria, respectively. The scale bars are 10 μm.

Downloaded from http://rupress.org/jcb/article-pdf/220/4/201909139/1411672/jcb_201909139.pdf by Cirs Ineb user on 21 March 2021

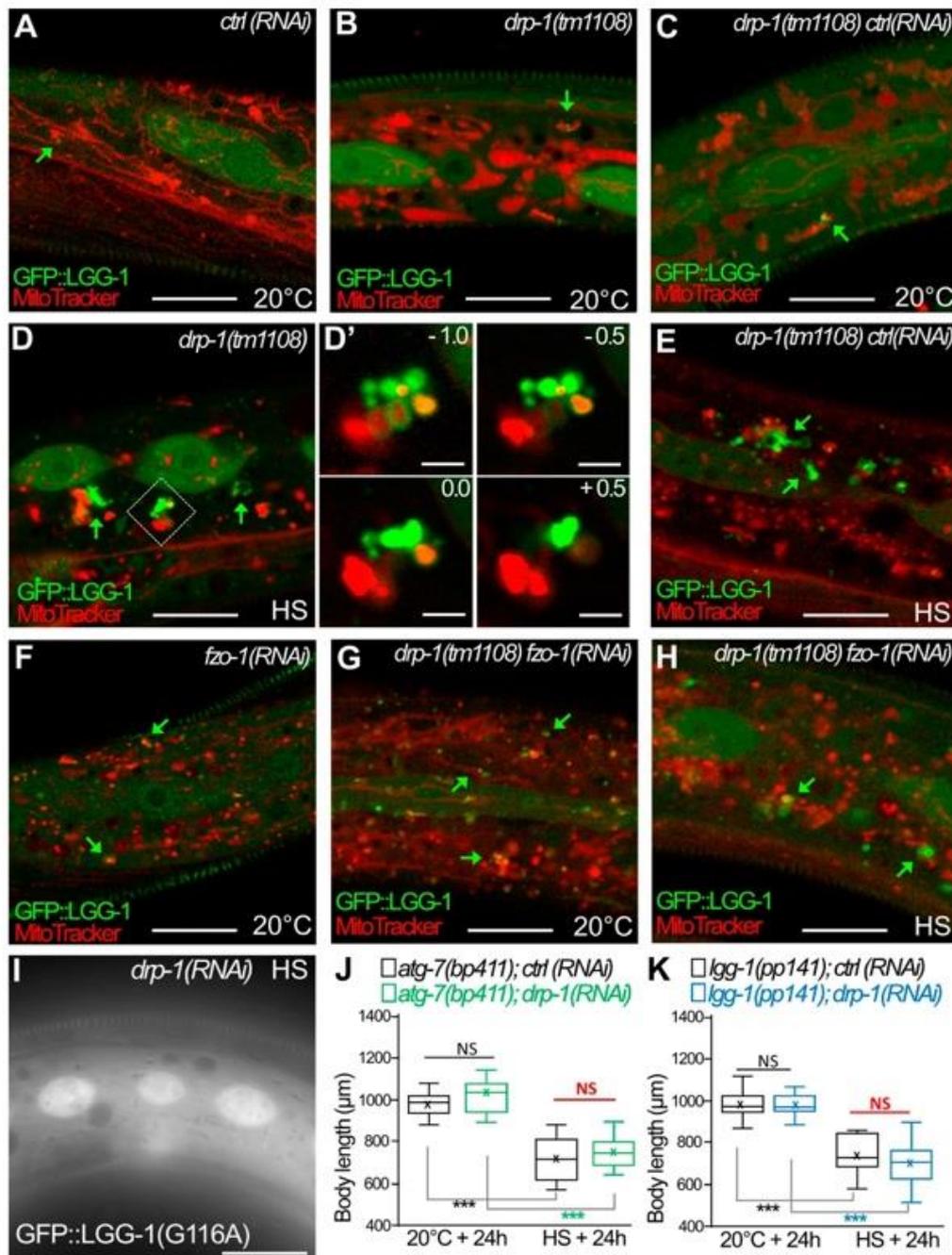


Figure S5. **The clustering of autophagosomes at mitochondria is maintained in *drp-1*;*fzo-1* animals after aHS (complementary to Fig. 7).** (A–H) Confocal images of autophagosomes (GFP::LGG-1; green) and mitochondria (MitoTracker; red) in the epidermis of animals at 20°C (A–C, F, and G) and after aHS (D, E, and H). Green arrows point to autophagosomes in contact with mitochondria. In *drp-1* animals (A–D), the aHS induces an accumulation of autophagic structures intermingled with mitochondria. Insets in D' are 0.5-μm Z-series corresponding to the dotted square in D. The depletion of FZO-1 induces a fragmentation of the mitochondrial network in control animals (F) but partially restores a tubular mitochondrial network in *drp-1(tm1108)* animals (G). In *drp-1(tm1108);fzo-1(RNAi)* animals, upon aHS, the GFP::LGG-1 forms large clusters in contact with mitochondria. (I) The nonlipidated GFP::LGG-1(G116A) does not form puncta or clusters after HS in *drp-1* animals. (J and K) The depletion of DRP-1 does not further increase the developmental delay of autophagy mutants (*atg-7*, *lgg-1*) induced by aHS. Single mutants with *ctrl(RNAi)* or *drp-1(RNAi)* were maintained at 20°C or submitted to aHS and measured after 24-h recovery (boxplots, $n > 30$; ***, $P < 0.0001$, Kruskal-Wallis test). The scale bars represent 10 μm or 2 μm (D').

Downloaded from http://rupress.org/jcb/article-pdf/220/4/201909139/1411672/jcb_201909139.pdf by Cirs Inhb user on 21 March 2021

Discussion

Ce travail de recherche a permis de mieux comprendre les rôles des différentes formes des protéines LGG-1 au cours de l'autophagie et du développement chez *C. elegans*. J'ai pu mettre en évidence que la présence d'une forme non lipidable à la membrane des autophagosomes est suffisante pour maintenir des fonctions autophagiques tout au long du développement. Ces travaux ont également permis de mettre en évidence que la fonction développementale de LGG-1 n'est pas dépendante de sa fonction autophagique chez *C. elegans*.

I. La glycine 116 est essentielle pour la conjugaison de LGG-1 aux membranes des autophagosomes.

Les membres de la famille ATG8 possèdent une glycine C-terminale conservée en position 116 pour LGG-1/GABARAP et 120 pour LGG-2/LC3, importante pour l'ancrage covalent à un substrat. Les protéines précurseur Atg8 sont directement clivées par une protéase Atg4 permettant l'exposition en partie C-terminale de cette glycine pour donner la forme mature cytosolique (forme I). Au cours de l'élongation des phagophores, les ATG8 sont ancrées à la phosphatidyléthanolamine (forme II) par une succession d'enzyme E1, E2, E3. Chez *C. elegans* LGG-1 possède la particularité d'avoir deux glycines C-terminale. Par ailleurs un motif di-glycine est retrouvé chez certaines Ubl telles que FAT10, SUMO-1/2, NEDD8 ou l'ubiquitine. Contrairement à LGG-1, les formes matures cytosoliques de NEDD8 et l'ubiquitine exposent un motif double glycine : Gly75-Gly76 (Pan *et al.*, 2004). En effet, le clivage se fait après la deuxième glycine 76, alors que pour LGG-1 le clivage est effectué entre la glycine 116 et la glycine 117, permettant l'exposition unique de la glycine 116 en partie C-terminale.

1.1 La glycine116 est importante pour le clivage

Chez *C. elegans* la glycine 116 de LGG-1 est importante pour sa conjugaison à la membrane des autophagosomes. La mutation de la glycine 116 en alanine empêche la conjugaison de LGG-1 aux membranes autophagosomales. Par western blot nous avons pu mettre en évidence une accumulation de la forme précurseur suggérant que le clivage est perturbé. En effet, dans un contrôle, la forme précurseur n'est pas détectée car elle est directement clivée. Par ailleurs la mutation seule de la glycine 116 n'empêche pas le clivage total car une forme LGG-1(G116A).I est détectée. **Ces résultats suggèrent que la seconde glycine 117 peut être utilisée pour le clivage.** En effet les mutations des deux glycines 116 et 117 (LGG-1(G116AG117A) empêche le clivage du précurseur en forme cytosolique. Des expériences de spectrométrie de masse

pourront permettre de déterminer quel est le dernier résidu de la forme cytosolique. On peut également imaginer avoir dans le mutant *lgg-1(G116A)* un mélange d'une forme cytosolique se terminant avec une alanine116 et une glycine 117.

1.2 La mutation de la glycine 116 provoque l'accumulation d'une nouvelle forme.

Les expériences par westernblot ont permis d'isoler une bande supplémentaire dans les mutants de la lipudation juste en dessous de la bande correspondant à la forme LGG-1.I. Ces résultats sont inattendus. Même si certaines études mentionnent brièvement la présence de cette bande, nous n'avons pas trouvé d'article scientifique caractérisant cette forme. Plusieurs hypothèses peuvent être émises.

Hypothèse 1 : Une forme adénylée est accumulée dans les mutants de la lipudation.

Une fois clivée, LGG-1 est transférée sur une enzyme de type E1. A partir des données connues des autres Ubl, l'activité de l'E1 se fait en deux étapes. La première est une activation par adénylation du groupe C-terminal COOH de l'Ubl, formant un intermédiaire Ub/Ubl-AMP. La seconde est la formation d'une liaison thioesther entre le SH du site actif et la partie COOH C-terminale de l'Ubl (Wang, Cai and Chen, 2010, p. 2; Lux, Standke and Tan, 2019). Chez *C. elegans*, un mutant pour lequel la glycine C-terminale est mutée en alanine est toujours capable d'interagir avec l'E1 Atg7, mais pas avec l'E2 Atg3 (Zhang *et al.*, 2015). Un intermédiaire LGG-1-AMP pourrait s'accumuler dans les mutants pour lesquels la glycine 116 est mutée en alanine.

Hypothèse 2 : LGG-1 s'ancre à un autre phospholipide : la phosphatidylsérine

Deux études ont pu montrer que la phosphatidylsérine peut être utilisée comme substrat de la lipudation d'Atg8 (Sou *et al.*, 2006; Durgan *et al.*, 2020). On peut imaginer que l'absence de lipudation à la phosphatidylethanolamine provoque une augmentation d'ancrage de LGG-1 à un autre phospholipide. Aucune donnée ne permet aujourd'hui de dire si cette lipudation sur la phosphatidylsérine pourrait utiliser le même système de conjugaison que celui à la phosphatidylethanolamine. Dans notre cas, des expériences de spectrométrie de masse pourraient permettre de déterminer la nature de cette forme accumulée dans les mutants de la conjugaison.

II. La forme LGG-1.I est suffisante pour maintenir les fonctions développementales chez *C. elegans*

2.1 Fonction développementale de LGG-1 indépendante de la fonction autophagique

Nos résultats ont permis de mettre en évidence un rôle développemental de LGG-1 indépendant de sa fonction autophagique. En effet, *lgg-1* est un gène essentiel chez *C. elegans* pour le développement et la fertilité. La déplétion de *lgg-1* provoque des défauts développementaux tardifs au moment de l'organogénèse, corrélés à une forte létalité embryonnaire et larvaire. Par ailleurs, LGG-1 est requise pour l'autophagie tout au long de la vie du ver. Dès la fécondation, pour la dégradation des mitochondries paternelles (allophagie), au cours du développement du ver pour la dégradation des composants des p-granules dans les cellules somatiques, et également pour résister aux conditions de stress et à la longévité. **L'obtention par CRISPR Cas9 d'un nouveau mutant du gène *lgg-1*, pour lequel la protéine LGG-1 est présente mais incapable d'assurer des fonctions autophagiques a permis, pour la première fois, de dé-corréler les fonctions développementales et autophagiques de LGG-1.** En effet, le mutant *lgg-1(G116AG117*)* est viable et ne présente pas de défauts développementaux. Ce mutant est un nouvel outil biologique permettant au laboratoire d'étudier des processus autophagiques plus tardifs en s'affranchissant des problèmes développementaux embryonnaires et larvaires.

2.2 La forme lipidée de LGG-1 est dispensable pour le maintien des fonctions développementales chez *C. elegans*

La mutation de la glycine 116 et/ou de la glycine 117 en partie C-terminale a permis de créer des contextes permettant d'exprimer uniquement la forme précurseur P (*lgg-1(G116AG117A)*), la forme mature cytosolique LGG-1.I (*lgg-1G116AG117**) ou les deux (*lgg-1(G116A)*). Les mutants empêchant la lipidation de LGG-1 aux membranes et exprimant au moins la forme LGG-1.I sont viables et ne présentent pas de défauts de développements, contrairement aux mutants perte de fonctions de LGG-1. **Ces résultats sont nouveaux et surprenants et permettent pour la première fois non seulement d'étudier à l'échelle de l'animal les fonctions de LGG-1 non reliées à son ancrage, mais également de mettre en évidence**

un rôle suffisant de la forme cytosolique mature dans des fonctions indépendantes de l'autophagie.

Le mutant exprimant uniquement la forme précurseur LGG-1.P non clivable présente une forte létalité embryonnaire, corrélée à un défaut développemental similaire au mutant nul. Ces résultats permettent de mettre en évidence que la forme précurseur seule n'est pas suffisante pour maintenir les fonctions développementales de LGG-1. Ces données sont notamment cohérentes avec une étude chinoise indiquant que le double mutant null *atg4.1, atg4.2*, incapable de cliver la forme précurseur en forme LGG.I, est léthal à l'état homozygote (D. Wu *et al.*, 2012). Pour confirmer l'ensemble de ces résultats il pourrait être intéressant d'utiliser des approches génétiques permettant la création d'une souche de vers comportant un transgène exprimant uniquement la forme LGG-1.I non lipidable, et de la croiser avec un mutant *lgg-1(G116AG117A)* ou *lgg-1(tm3489)* pour voir si la fonction développementale peut être sauvée. D'autres approches génétiques par croisements entre le double mutant *atg4.1 atg4.2* (ou ARNI) et les mutants *lgg-1(G116A)* et *lgg-1(G116AG117*)* pourraient être envisagées et fournir des arguments supplémentaires.

2.3 Quel rôle de LGG-1 dans le développement ?

Plusieurs études ont démontré que les protéines de la famille Atg8 ont des fonctions non liées à leur rôle de biogenèse des autophagosomes et de recrutement spécifique de cargo à dégrader. A l'origine, Atg8 et ses homologues étaient connus pour leurs rôles dans le trafic membranaire intracellulaire (Shpilka *et al.*, 2011). Une étude récente chez la drosophile a démontré un rôle d'Atg8a dans le développement des larves indépendant de la lipidation d'Atg8 et de l'autophagie (Jipa *et al.*, 2020). Chez *C. elegans* la perte de fonction de *lgg-1* provoque notamment des malformations embryonnaires. Il serait intéressant de comprendre quels sont les rôles tardifs de LGG-1 au cours de l'embryogenèse. Chez *C. elegans* la fonction développementale des protéines cytosoliques matures LGG-1(G116AG117*) et LGG-1(G116A) non lipidables n'est pas perturbée contrairement à un mutant nul. L'utilisation d'outil GFP::LGG-1(G116A) et GFP::LGG-2(G120A) permet de mettre en évidence la présence d'un signal diffus dans plusieurs tissus et notamment dans les stades embryonnaires, suggérant la présence des formes cytosoliques au cours du développement (Wang, Cai and Chen, 2010; Manil-Ségalen *et al.*, 2014). Une double approche protéomique (double hybride et spectrométrie de masse) a préalablement permis d'identifier des interacteurs de LGG-1. Parmi les candidats, certains sont

des acteurs de la polarité cellulaire et du maintien du réseau du cytosquelette. A titre d'exemple, le candidat protéique VAB-10 est retrouvé localisé dans les cellules au niveau de la jonction entre épiderme et muscle. L'inactivation par RNAI conduit à un défaut développemental embryonnaire tardif (Rapport de stage V. Scarcelli). Il serait intéressant de savoir si cette interaction est maintenue *in vivo* et également dans les différents contextes mutant *lgg-1*.

2.4 La fonction développementale de LGG-1.I n'est pas compensée par LGG-2

Alors que le mutant perte de fonction *lgg-2* ne présente pas de défaut morphologique ni de létalité, le gène *lgg-1* est un gène essentiel et le mutant nul *lgg-1* présente une forte létalité embryonnaire (81%). Par ailleurs les doubles mutants *lgg-1*, *lgg-2* présentent un phénotype augmenté plus sévère avec 100% de létalité. De plus, le rôle physiologique de LGG-1 et LGG-2 au cours de la longévité et dans la formation de larves dauer démontre un effet plus fort de la double déplétion par rapport à la simple *lgg-1(tm3489)*. Ces résultats mettent en évidence une fonction partiellement redondante de LGG-1 et LGG-2 au cours du développement. De manière surprenante le double mutant *lgg-1(G116A) ; lgg-2(tm5755)* et *lgg-1(G116AG117*) ; lgg-2(tm5755)* ne phénocopie pas la perte de fonctions du double mutant nul et est similaire à un contrôle. **Ces résultats permettent de mettre en évidence un rôle spécifique et suffisant de la forme mature LGG-1.I au cours de certains processus développementaux.** Des analyses complémentaires pourraient être effectuées afin d'exclure des phénotypes plus subtils, avec l'utilisation de marqueurs des cellules épithéliales par exemple

III. La forme LGG-1.II est dispensable pour les fonctions autophagiques chez *C. elegans*

Les protéines Atg8 ont de multiples fonctions au cours du flux autophagique mais les mécanismes précis restent à déterminer. La conjugaison des protéines de type ATG8 est essentielle pour de nombreuses formes d'autophagie, néanmoins certaines études émergentes mettent en évidence que la biogénèse des autophagosomes n'est pas strictement dépendante des Atg8 ou du mécanisme de conjugaison (Nishida et al., 2009; Nguyen et al., 2016; Tsuboyama et al., 2016; Vaites et al., 2018; Ohnstad et al., 2020).

3.1 La forme LGG-1(G116A) cytosolique mature est suffisante pour maintenir un flux autophagique

Nos données mettent en évidence pour la première fois une fonction d'une forme cytosolique de LGG-1, suffisante pour maintenir un flux autophagique complet, de l'initiation du flux à la dégradation du cargo. **Un des points fort de notre étude est que cette fonction de LGG-1.I n'est pas restreinte à un seul processus autophagique. Le rôle d'une forme cytosolique mature LGG-1.I non lipidable est maintenu dans plusieurs processus d'autophagie sélective (allophagie, et agréphagie), et également au cours de l'autophagie aléatoire massive.**

3.1.1 Rôle d'une forme LGG-1.I dans l'induction de l'autophagie

Chez les mammifères, les protéines de type GABARAP interagissent avec le complexe d'initiation (ULK1, ATG13, FIP200) et permettent l'activation de la sérine thréonine kinase ULK1 (Alemu *et al.*, 2012; Joachim *et al.*, 2015; Poillet-Perez *et al.*, 2017). Cette interaction est dépendante du domaine LIR. Par ailleurs, la surexpression de GABARAPL1-G116A ou GABARAPL1 conduit à une augmentation de l'activation de ULK1, suggérant une fonction indépendante de la forme conjuguée (Poillet-Perez *et al.*, 2017). De plus le domaine LIR de ULK1 est requis pour la phosphorylation d'ATG13 (effecteur de Ulk1). Chez *C. elegans* LGG-1 interagit directement avec UNC-51 (ULK1) et EPG-1 (atg-13), au contraire de LGG-2 (Wu *et al.*, 2015). Nous avons pu mettre en évidence que les premières étapes du flux autophagique ne semblaient pas être altérées chez le mutant *lgg-1(G116A)*, grâce aux marqueurs précoces Atg18::GFP, contrairement à un mutant perte de fonction de *lgg-1*, ou présentant une autophagie non fonctionnelle comme le mutant *lgg-1(G116AG117*)*. Chez les mammifères, des techniques d'immunoprécipitation ont pu mettre en évidence que GABARAP G116A interagit avec ULK1 au niveau des membranes autophagosomales naissantes positives pour DFCP1 (Joachim *et al.*, 2015). Par ailleurs une étude chez la levure a pu montrer que le PAS est un condensat liquide de protéines Atg. Des expériences *in vitro* montrent que le complexe Atg1 subit une séparation de phase pour former des gouttelettes de liquide. Ces gouttelettes peuvent être attachées aux membranes via des interactions protéine-protéine spécifiques (Yamaguchi *et al.*, 2018). A partir de la bibliographie nous pouvons émettre l'hypothèse que LGG-1(G116A) est capable d'interagir avec UNC-51 au niveau de l'omégasome pour permettre les premières étapes du flux.

3.1.2 Rôle de LGG-1 dans la reconnaissance de cargo : modèle de biogénèse des autophagosomes induits par les cargos

Comprendre comment les protéines de type Atg8 peuvent induire la formation d'autophagosomes au bon endroit, sans être ancrées à la membrane des autophagosomes reste un défi majeur. Chez la levure, le PAS définit l'emplacement de formation des autophagosomes. Chez les mammifères les autophagosomes sont générés en de multiples sites dans le cytoplasme. Il est possible que le cargo puisse être recruté sur des membranes d'isolation préexistantes. Néanmoins certaines études ont pu déterminer que la présence de cargos induit la formation de membranes d'isolation. En effet, une étude australienne a pu démontrer que l'initiation de l'autophagie est dépendante des récepteurs autophagiques. Pour initier la mitophagie, PINK1 phosphoryle l'ubiquitine pour activer l'E3 ligase PARKIN, permettant la construction de chaînes d'ubiquitines sur les protéines de la membrane externe des mitochondries, dans les cellules de mammifères. Après traitement à l'oligomycine et à l'antimycine (OA) les récepteurs autophagiques OPTN et NDP52 localisent au niveau des mitochondries. Par ailleurs les mutants NDP52 et OPTN empêchent le recrutement de GFP-LC3 et diminuent le nombre de GFP-DFCP1 et WIPI1 au niveau de la mitochondrie, indiquant que les récepteurs autophagiques sont importants pour le recrutement de la machinerie autophagique. De plus le double mutant NDP52/OPTN inhibe la dégradation des mitochondries. De manière surprenante GFP-LC3B dans un mutant ATG5 (où LC3 n'est pas ancrée à la PE), est retrouvée au niveau des mitochondries après trois heures de traitement OA, mais pas sous forme de points, suggérant que LC3 est capable de localiser au niveau des mitochondries indépendamment de son ancrage aux autophagosomes (Lazarou *et al.*, 2015). Ces données permettent d'imaginer comment, dans notre système, LGG-1(G116A) pourrait permettre d'induire la formation de membranes au bon endroit. En effet, nous pouvons imaginer un modèle selon lequel LGG-1 (G116A) pourrait dans un premier temps reconnaître les cargos à dégrader via son domaine LIR et dans un second temps permettre le recrutement de la machinerie autophagique. Dans notre système, les expériences d'immuno-fluorescence n'ont pas permis de visualiser la présence de LGG-1(G116A) au niveau des cargos. Cela est peut-être dû à la faible quantité de protéines présentes. Des expériences d'induction du flux autophagique pourraient être effectuées afin de permettre d'augmenter la quantité de LGG-1(G116A).

3.1.3 Rôle de LGG-1.I dans la maturation des autophagosomes et fusions avec les lysosomes

Des protéines de la famille GABARAP sont impliquées dans des étapes tardives du flux et notamment dans le recrutement des facteurs de fusion au niveau des autophagosomes. A titre d'exemple GABARAP et GABARAPL1 permettent le recrutement des protéines PLEKHM1. Cette protéine adaptatrice interagit avec la GTPase Rab7, le complexe HOPS et présente un domaine LIR permettant d'interagir avec Atg8. Le domaine LIR de PLEKHM1 est requis pour permettre la dégradation des agrégats protéiques par autophagie (McEwan, 2017).

Par ailleurs les protéines GABARAP recrutent PI4KII α , une kinase permettant de générer du phosphatidylinositol 4-phosphate (PI4P). La déplétion de GABARAP ou PI4KII provoque un blocage de la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (Huan Wang *et al.*, 2015).

Chez *C. elegans* LGG-2, mais pas LGG-1, interagit directement avec le complexe HOPS, permettant la régulation de la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (Manil-Ségalen *et al.*, 2014). En effet, au cours du processus d'alophaie, la déplétion de LGG-2 n'empêche pas la dégradation des constituants paternels mais provoque un retard de dégradation des autophagosomes (Manil-Ségalen *et al.*, 2014). Une hypothèse est que la protéine LGG-1 pourrait compenser la perte de LGG-2. En effet, une étude chinoise a démontré que LGG-1 possédait à la fois une activité dans le rapprochement de membranes, mais également dans la fusion membranaire (Wu *et al.*, 2015). Notre hypothèse est que les étapes tardives du flux sont compensée par LGG-2. Par ailleurs, au cours du processus d'alophaie, nos résultats montrent que la dégradation des mitochondries paternelles semble légèrement retardée dans un mutant *lgg-1(G1116)*. Pour tester cette hypothèse, des expériences d'immunofluorescence utilisant des marqueurs des lysosomes pourraient être effectuées. De plus, la construction de protéines de fusion LGG-2 couplant en tandem la GFP et la mCherry pourrait permettre de mettre en évidence à quel niveau du flux se situerait le retard. En effet, la GFP étant sensible au pH, cette protéine de fusion permet de différencier les autophagosomes des autolysosomes.

3.1.4 Rôle fonctionnel dans l'autophagie d'une forme cytosolique

Nos données suggèrent que le mutant *lgg-1(G116A)* exprime une forme précurseur qui peut être clivée après la glycine 117, permettant la formation d'une forme cytosolique mature proche de la forme endogène. Le mutant *lgg-1(G116G116*)* permet la formation d'une unique forme cytosolique sans glycine terminale. La différence de fonctionnalités entre un mutant *lgg-1(G116A)* et *lgg-1(G116AG117*)* au cours de l'autophagie soulève plusieurs hypothèses.

Hypothèse : Importance du clivage pour maintenir une fonction

Plusieurs études ont pu montrer un rôle important dans l'autophagie des protéases Atg4, à la fois dans le clivage du précurseur et également dans la délipidation des Atg8 de la membrane externe des autophagosomes pour permettre son recyclage. Chez la levure, Atg4 joue un rôle important dans l'expansion efficace des membrane d'isolation en permettant la dé-conjugaison d'Atg8 aux membranes (Hirata, Ohya and Suzuki, 2017). Chez les mammifères, la surexpression d'ATG4B empêche la formation de LC3-PE, en permettant la délipidation plus rapidement que la conjugaison (Fujita *et al.*, 2008). Chez *C. elegans*, les protéases ATG-4.1 et ATG-4.2 sont impliquées à la fois dans le clivage du précurseur LGG-1 et également dans la délipidation de LGG-1 des membranes autophagosomales. Cette étape de dé-conjugaison est essentielle pour permettre la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (F. Wu *et al.*, 2012). Même si ATG-4.1 est préférentiellement choisi pour le clivage de LGG-1, ATG-4.2 présente un rôle redondant dans cette étape. Néanmoins, ATG-4.2 possède une fonction spécifique de délipidation (Hill and Colón-Ramos, 2019). Un mutant *atg4.1* présente une accumulation de la forme précurseur mais n'empêche pas la lipidation de LGG-1, contrairement à un mutant *LGG-1(G116A)*. Pour répondre à cette hypothèse Il serait intéressant dans notre étude de savoir si l'expression d'une forme non lipidée *LGG-1(G116A)* pourrait permettre de sauver la fonction d'un double mutant *atg4.1; atg4.2*.

Hypothèse : Présence d'une glycine C-terminale

La différence majeure entre le mutant *lgg-1(G116A)* et *lgg-1(G116AG117*)* pourrait être la présence d'une glycine C-terminale. Même si on ne peut pas totalement exclure que la présence d'une très faible quantité *LGG-1(G116A)* puisse se lipider, nous n'avons pas réussi à détecter la présence de points en immunofluorescence, ni dans des conditions d'accumulation des autophagosomes, ni d'une forme *LGG-1.II* en western blot. Des expériences de spectrométrie

de masse nous permettrons de vérifier quel est le dernier résidu présent de la forme LGG-1(G116A). Une étude caractérisant les structures cristallographique d'Atg4B et LC3 a permis de mettre en évidence que les acides aminés Phe119 et Gly120 d'LC3 interagissent de manière forte avec ATG4B alors que les deux acides aminés présents juste après Thr121 et Ala122 d'LC3 ont une interaction plus faible avec cette enzyme. HsAtg4 a donc une haute affinité avec les résidus 119 et 120, dits de clivage, mais beaucoup moins avec la fin de la partie C-terminale. De manière très intéressante, les DUB et ULP, ont une conformation fixe et bloquée en « position ouverte » contrairement à HsAtg4B qui peut prendre une conformation ouverte ou fermée en couvrant le site actif. Lorsque LC3 est liée à HsAtg4B, l'acide aminé Phe119 de LC3 pousse la boucle de régulation, permettant l'ouverture d'un petit espace pour accueillir le résidu glycine 120 de LC3 qui permet le clivage (Satoo *et al.*, 2009). D'après la bibliographie, nous pouvons imaginer que les acides aminés 115, 116 et ou 117 sont importants pour permettre à LGG-1 d'interagir avec Atg4. Par ailleurs de manière intéressante la surexpression d'un mutant inactif Atg4B forme un complexe stable avec LC3 provoquant la séquestration du cytosol. Ces données nous permettent d'imaginer que la présence d'une glycine en position C-terminale peut être important pour l'interaction avec les protéines Atg4, et le recrutement de la machinerie autophagique.

3.2 Rôle compensatoire de LGG-2

Avec la présence de deux uniques homologues des familles LC3 et GABARAP, le nématode *C. elegans* représente un bon modèle pour l'étude des fonctions spécifiques de chaque famille. Dans le but de déterminer si LGG-2 pouvait compenser la fonction de LGG-1(G116A), nous avons obtenu le double mutant *lgg-1(G116A);lgg-2(tm5755)*. Ce double mutant présente une diminution importante des fonctions autophagiques dans plusieurs processus tels que la résistance à une carence nutritionnelle, la longévité, ou la dégradation des composants des spermatozoïdes. **Ces résultats suggèrent un rôle compensatoire de LGG-2 dans ces différents processus autophagiques.** Néanmoins, malgré une diminution importante, certaines fonctions autophagiques semblent conservées par rapport à un mutant pour lequel l'autophagie est déficiente (*lgg-1(G116AG117*); lgg-2(tm5755)*). **Ces résultats suggèrent qu'une fonction de LGG-1(G116A) est maintenue en absence de LGG-2.** En effet, même si elle est retardée, nous avons pu observer une dégradation des mitochondries paternelles en absence totale de LGG-2 et sans lipitation de LGG-1(G116A). Ces résultats sont très surprenants et bousculent de nombreux paradigmes.

Hypothèse : Formation d'autophagosomes non positifs pour LGG-1 et pour LGG-2

La lipitation des protéines Atg8 est considérée comme essentielle pour maintenir un flux autophagique. Néanmoins, une étude a pu mettre en évidence une autophagie non canonique en absence d'Atg-5 et Atg-7, déclenchée par un stress cellulaire *in vitro*, impliquée dans la différenciation des érythrocytes *in vivo*, et dépendante de ULK1 (Nishida *et al.*, 2009).

Des expériences de microscopie électronique sur les doubles mutants *lgg-1(G116A);lgg-2(tm5755)* permettraient de mettre en évidence si des autophagosomes non positifs pour LGG-1 et LGG-2 seraient capable de médier un flux autophagique chez *C. elegans*.

L'existence de ce type d'autophagie non canonique laisse une question en suspens : quand et comment l'autophagie indépendante de la lipitation des Atg8 pourrait se produire dans des conditions physiologiques ? L'autophagie non canonique est-elle utilisée comme un mécanisme de secours ? De plus l'idée que des autophagosomes non positifs puissent médier la dégradation de cargos conduit à remettre en question l'utilisation d'Atg8 comme marqueur universel des autophagosomes.

IV. Formation de différentes populations d'autophagosomes

Des travaux préalables de l'équipe de Renaud Legouis ont permis de détecter par des expériences d'immunofluorescences l'existence de trois populations différentes d'autophagosomes (Manil-Ségalen *et al.*, 2014). Une positive pour LGG-1, une positive pour LGG-2 et une positive à la fois pour LGG-1 et LGG-2. Dans le but de comprendre les fonctions de ces différentes populations d'autophagosomes et comment les populations peuvent se former nous avons obtenu par CRISPR-Cas9 des protéines de fusion GFP::LGG-1 et mCherry::LGG-2. L'obtention de ces nouveaux marqueurs fluorescents nous permet de suivre *in vivo* pour la première fois le profil d'expression des différentes populations d'autophagosomes. Les données obtenues avec cette lignée sont encore préliminaires et l'étude de la dynamique de formation par vidéo microscopie des autophagosomes fait l'objet d'un projet actuel du laboratoire mené par une étudiante de master Amélie Elouin.

Hypothèse 1: Recrutement successif de LGG-1 et LGG-2 aux membranes des autophagosomes

Des expériences de suivi des comportements des différentes populations d'autophagosomes dans le temps permettra de déterminer si les populations positives pour GFP::LGG-1 et mCherry::LGG-2 (population jaune) sont la conséquence d'un recrutement successif de LGG-1 puis LGG-2 (ou inversement). L'identification d'un recrutement successif de LGG-1 et LGG-2 aux autophagosomes permettrait de déterminer une spécificité de fonction. Il serait également intéressant de mettre en évidence si le comportement identifié est généralisable dans tous les tissus du ver et dans des stades différents et également dans des conditions d'autophagie physiologique ou induite. Ces données permettraient d'établir une cartographie des populations d'autophagosomes afin d'en comprendre leurs spécificités de fonctions.

Hypothèse 2: Les différentes populations d'autophagosomes ciblent des cargos distincts

Les protéines Atg8 en plus de leurs rôles dans la biogénèse des autophagosomes sont impliquées dans le recrutement sélectif des substrats à dégrader. Une étude chez *C.elegans* met en évidence que les protéines LGG-1 et LGG-2 interagissent de manière différente avec des substrats ou autres interacteurs. A titre d'exemple la protéine EPG-2 interagit plus fortement avec LGG-1 qu'avec LGG-2, à contrario SEPA-1 interagirait plus fortement avec LGG-2 qu'avec LGG-1, (Wu *et al.*, 2015). Des expériences de protéomique dans notre laboratoire par

des approches de double hybride et de spectrométrie de masse a permis d'identifier un certain nombre d'interacteurs de LGG-1 et LGG-2. VPS-39 est identifié comme un interacteur de LGG-2 et non de LGG-1, (Manil-Ségalen *et al.*, 2014). Ces résultats suggèrent des spécificités d'interaction de LGG-1 et LGG-2 avec des substrats et des protéines autophagiques. Il serait intéressant de déterminer par microscopie si une population d'autophagosomes colocaliserait spécifiquement avec un substrat plutôt qu'une autre. Des approches multi-couleur avec des marqueurs des différents organites telles que des protéines résidentes du RE ou des mitochondries peuvent être utilisées. Par ailleurs, des approches de microscopie à expansion et de microscopie électronique corrélative pourraient être envisagées afin de déterminer le contenu des autophagosomes de chaque population.

V. LGG-1 est-elle une Ubl comme les autres ?

Les Ubl sont retrouvées impliquées dans la régulation de nombreux processus cellulaires divers tels que la régulation du cycle cellulaire, l'apoptose, la réparation de l'ADN, la dégradation des protéines, l'autophagie etc (Da Costa and Schmidt, 2020; Wirth *et al.*, 2020)). Ces protéines sont retrouvées impliquées dans des maladies neurodégénératives et certains cancers (Chen *et al.*, 2021). Cette pléiotropie rend difficile la caractérisation moléculaire de ces types de protéines. En effet, on peut se demander si les fonctions d'une Ubl dans un processus sont généralisables à un autre processus cellulaire.

LGG-1, une conseillère d'orientation ?

Le mécanisme commun d'ancrage covalent des Ubl et la présence de domaines d'interaction protéique (GIM/LIR/ SIM/ Ub) font de ces protéines des acteurs clés de communication permettant de changer ou moduler le devenir de certains substrats. De manière physiologique, les protéines Atg8 sont capables d'interagir avec des substrats pour assurer par exemple la maturation des protéines Ape1(voie Cvt), ou encore l'activation du complexe Ulk, et le recrutement d'autres acteurs. Tout comme l'ubiquitine, les Ubl peuvent permettre d'influencer le devenir de leur substrat en fonction du contexte cellulaire. Par ailleurs, au vu de leur similarité structurelle il peut être envisagé un certain degré de redondance entre les différentes Ubl. En effet, certains substrats peuvent cibler plusieurs Ubl différentes (Oved *et al.*, 2006; Kirkin and Dikic, 2007).

LGG-1, un protecteur du stress ?

Plusieurs études mettent en évidence un rôle majeur de certaines Ubl dans les mécanismes de résistance à différents types de stress. A titre d'exemple la protéine SUMO est particulièrement importante chez les plantes pour la résistance à différents stress (choc thermique, gel, sécheresse). En effet, une forte augmentation de protéines SUMO conjuguées est détectée seulement quelques minutes après l'induction du stress thermique (37°C), ce qui en fait une réponse au stress rapide. Par ailleurs cette conjugaison est réversible et permet, quelques heures après le stress, de garder un « pool » de protéines disponible (Kurepa *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2013). Par ailleurs des mutants de la sumoylation présentent une hypersensibilité à la chaleur, au froid, aux faibles taux de phosphate et d'azote, et aux agents pathogènes. Urm1 joue un rôle dans la réponse au stress oxydatif chez différents eucaryotes tels que *S.cerevisiae*, *D. melanogaster* et *H.sapiens* (Goehring, Rivers and Sprague, 2003).

L'urmylation est induite par l'augmentation de ROS, certaines des cibles sont des protéines de réponse au stress oxydatif, telles que la peroxiredoxine 2 Ahp1 (Zhang and Chen, 2021). De plus, SUMO, NEDD8, ISG15, FAT 19 et UFM1 sont retrouvées importantes dans la régulation de la réponse suivant différents dommages de l'ADN (Da Costa and Schmidt, 2020). Par ailleurs certaines Ubl, telles que ISG15 et FAT10, sont également impliquées dans la réponse immunitaire ou la dégradation de pathogènes. Chez *C. elegans*, l'exposition à un stress thermique aigu ou nutritionnel provoque l'augmentation rapide de protéines Atg8 ancrées à la membrane, permettant d'induire l'autophagie. Les Ubl peuvent être en quelque sorte des senseurs spécifiques de différents stress, permettant le recrutement d'acteurs adéquats pour maintenir l'homéostasie cellulaire.

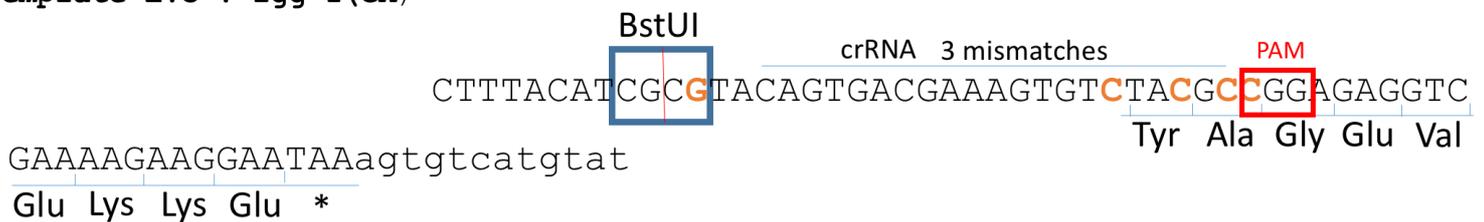
Annexes

ANNEXE 1 – Obtention de mutation ponctuelles par l'ingénierie CRISPR-CAS9 au locus *lgg-1* par création de matrices de réparation spécifiques.

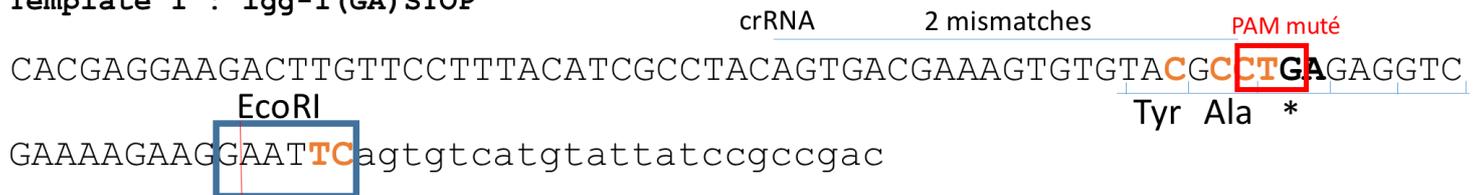
wt sequence



Template E.C : *lgg-1*(GA)



Template 1 : *lgg-1*(GA) STOP

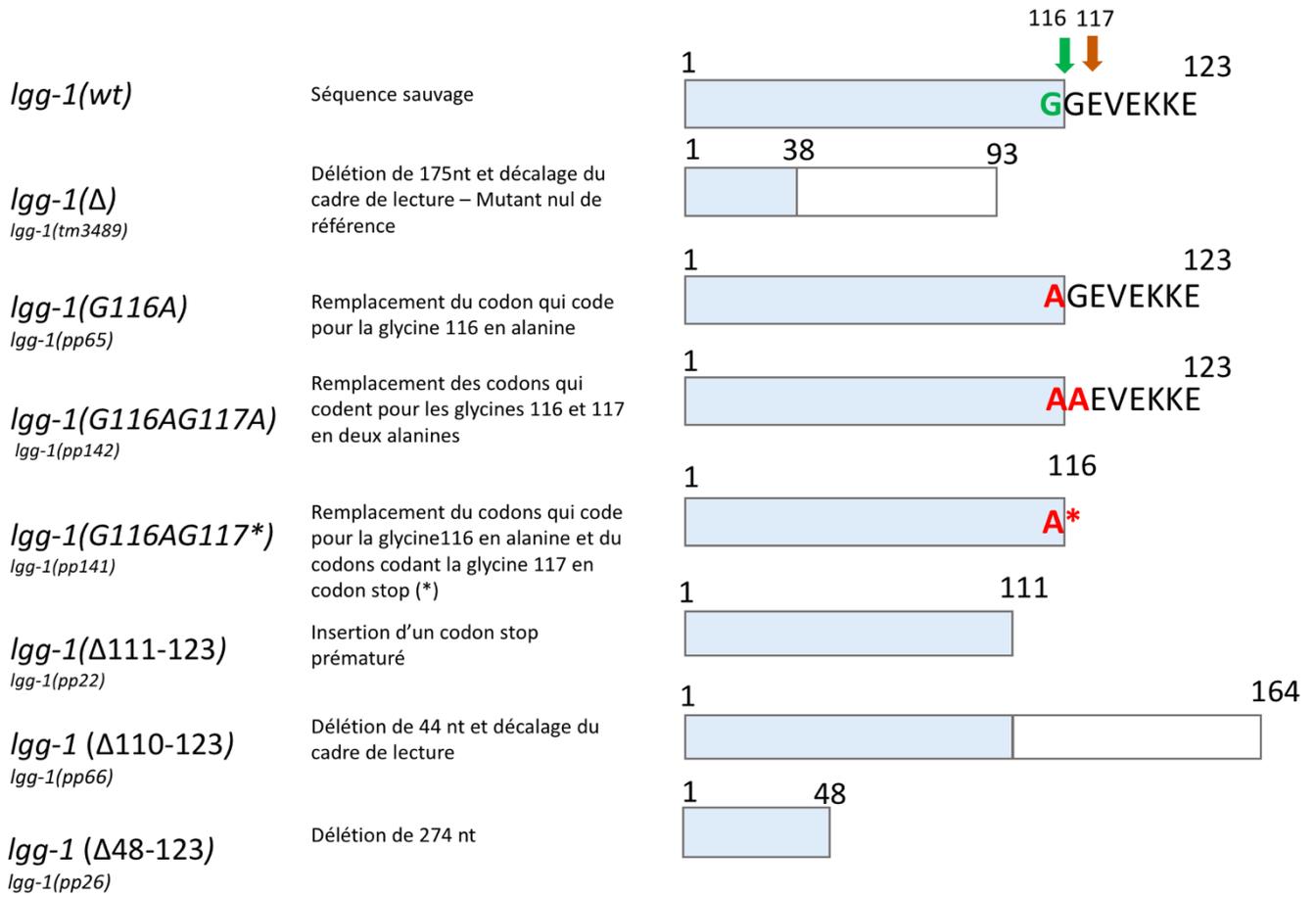


Template 1 : *lgg-1*(GAGA)



Annexe 1. Répertoire des matrices de réparations d'ADN utilisées pour l'obtention des mutants *lgg-1*(G116A); *lgg-1*(G116AG117*), *lgg-1*(G116AG117A). Des insertions silencieuses ont été insérées permettant de créer des sites de restrictions enzymatiques. Le PAM ainsi que l'emplacement d'hybridation du crRNA sont indiqués.

ANNEXE 2 – Schémas des différents mutants *lgg-1* séquencés



Annexe 2. Schémas des mutants obtenus par CRISPR-Cas9. Les rectangles bleus représentent la séquence similaire à la séquence sauvage. Les rectangles blancs représentent la séquence suite à un décalage de phase de lecture. Le numéro d'allèle est mentionné. Les mutations ponctuelles obtenues sont indiquées en rouge.

Bibliographie

- Abada, A. and Elazar, Z. (2014) 'Getting ready for building: signaling and autophagosome biogenesis', *EMBO reports*, 15(8), pp. 839–852. doi: 10.15252/embr.201439076.
- Abidi, N. and Xirodimas, D. P. (2015) 'Regulation of cancer-related pathways by protein NEDDylation and strategies for the use of NEDD8 inhibitors in the clinic', *Endocrine-Related Cancer*, 22(1), pp. T55-70. doi: 10.1530/ERC-14-0315.
- Alberti, A. *et al.* (2010) 'The autophagosomal protein LGG-2 acts synergistically with LGG-1 in dauer formation and longevity in *C. elegans*', *Autophagy*, 6(5), pp. 622–633. doi: 10.4161/auto.6.5.12252.
- Alemu, E. A. *et al.* (2012) 'ATG8 Family Proteins Act as Scaffolds for Assembly of the ULK Complex: SEQUENCE REQUIREMENTS FOR LC3-INTERACTING REGION (LIR) MOTIFS', *Journal of Biological Chemistry*, 287(47), pp. 39275–39290. doi: 10.1074/jbc.M112.378109.
- Ammon, T. *et al.* (2014) 'The conserved ubiquitin-like protein Hub1 plays a critical role in splicing in human cells', *Journal of Molecular Cell Biology*, 6(4), pp. 312–323. doi: 10.1093/jmcb/mju026.
- Ardley, H. C. and Robinson, P. A. (2005) 'E3 ubiquitin ligases', *Essays in Biochemistry*, 41, pp. 15–30. doi: 10.1042/EB0410015.
- Ashford, T. P. and Porter, K. R. (1962) 'CYTOPLASMIC COMPONENTS IN HEPATIC CELL LYSOSOMES', *Journal of Cell Biology*, 12(1), pp. 198–202. doi: 10.1083/jcb.12.1.198.
- Axe, E. L. *et al.* (2008) 'Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum', *The Journal of Cell Biology*, 182(4), pp. 685–701. doi: 10.1083/jcb.200803137.
- Baeken, M. W. *et al.* (2020) 'Novel Insights into the Cellular Localization and Regulation of the Autophagosomal Proteins LC3A, LC3B and LC3C', *Cells*, 9(10). doi: 10.3390/cells9102315.
- Bailly, A. P. *et al.* (2019) 'The Balance between Mono- and NEDD8-Chains Controlled by NEDP1 upon DNA Damage Is a Regulatory Module of the HSP70 ATPase Activity', *Cell Reports*, 29(1), pp. 212-224.e8. doi: 10.1016/j.celrep.2019.08.070.
- Balderhaar, H. J. kleine and Ungermann, C. (2013) 'CORVET and HOPS tethering complexes - coordinators of endosome and lysosome fusion', *Journal of Cell Science*, 126(Pt 6), pp. 1307–1316. doi: 10.1242/jcs.107805.
- Bandau, S. *et al.* (2012) 'UBXN7 docks on neddylated cullin complexes using its UIM motif and causes HIF1 α accumulation', *BMC biology*, 10, p. 36. doi: 10.1186/1741-7007-10-36.
- Barz, S. *et al.* (2020) 'Atg1 kinase regulates autophagosome-vacuole fusion by controlling SNARE bundling', *EMBO Reports*, 21(12). doi: 10.15252/embr.202051869.
- Bayer, P. *et al.* (1998) 'Structure determination of the small ubiquitin-related modifier SUMO-1', *Journal of Molecular Biology*, 280(2), pp. 275–286. doi: 10.1006/jmbi.1998.1839.
- B'chir, W. *et al.* (2013) 'The eIF2 α /ATF4 pathway is essential for stress-induced autophagy

- gene expression', *Nucleic Acids Research*, 41(16), pp. 7683–7699. doi: 10.1093/nar/gkt563.
- Behrends, C. *et al.* (2010) 'Network organization of the human autophagy system', *Nature*, 466(7302), pp. 68–76. doi: 10.1038/nature09204.
- Betin, V. M. S. and Lane, J. D. (2009) 'Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing and triggers mitochondrial targeting and apoptosis', *Journal of Cell Science*, 122(Pt 14), pp. 2554–2566. doi: 10.1242/jcs.046250.
- Bhujabal, Z. *et al.* (2017) 'FKBP8 recruits LC3A to mediate Parkin-independent mitophagy', *EMBO Reports*, 18(6), pp. 947–961. doi: 10.15252/embr.201643147.
- Birgisdottir, Á. B., Lamark, T. and Johansen, T. (2013) 'The LIR motif - crucial for selective autophagy', *Journal of Cell Science*, 126(Pt 15), pp. 3237–3247. doi: 10.1242/jcs.126128.
- Bjørkøy, G. *et al.* (2005) 'p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death', *The Journal of Cell Biology*, 171(4), pp. 603–614. doi: 10.1083/jcb.200507002.
- Boya, P., Reggiori, F. and Codogno, P. (2013) 'Emerging regulation and functions of autophagy', *Nature Cell Biology*, 15(7), pp. 713–720. doi: 10.1038/ncb2788.
- Bozic, M. *et al.* (2020) 'A conserved ATG2-GABARAP family interaction is critical for phagophore formation', *EMBO reports*, 21(3), p. e48412. doi: 10.15252/embr.201948412.
- Buchberger, A. (2002) 'From UBA to UBX: new words in the ubiquitin vocabulary', *Trends in Cell Biology*, 12(5), pp. 216–221. doi: 10.1016/s0962-8924(02)02269-9.
- Cajee, U.-F., Hull, R. and Ntwasa, M. (2012) 'Modification by Ubiquitin-Like Proteins: Significance in Apoptosis and Autophagy Pathways', *International Journal of Molecular Sciences*, 13(9), pp. 11804–11831. doi: 10.3390/ijms130911804.
- Cappadocia, L. and Lima, C. D. (2018) 'Ubiquitin-like Protein Conjugation: Structures, Chemistry, and Mechanism', *Chemical Reviews*, 118(3), pp. 889–918. doi: 10.1021/acs.chemrev.6b00737.
- Chang, P.-C. *et al.* (2013) 'The chromatin modification by SUMO-2/3 but not SUMO-1 prevents the epigenetic activation of key immune-related genes during Kaposi's sarcoma associated herpesvirus reactivation', *BMC genomics*, 14, p. 824. doi: 10.1186/1471-2164-14-824.
- Chen, R.-H., Chen, Y.-H. and Huang, T.-Y. (2019) 'Ubiquitin-mediated regulation of autophagy', *Journal of Biomedical Science*, 26(1), p. 80. doi: 10.1186/s12929-019-0569-y.
- Chen, X. *et al.* (2021) 'The function of SUMOylation and its crucial roles in the development of neurological diseases', *The FASEB Journal*, 35(4), p. e21510. doi: <https://doi.org/10.1096/fj.202002702R>.
- Chen, Y., Scarcelli, V. and Legouis, R. (2017) 'Approaches for Studying Autophagy in *Caenorhabditis elegans*', *Cells*, 6(3). doi: 10.3390/cells6030027.

- Chen, Z.-W. and Olsen, R. W. (2007) 'GABAA receptor associated proteins: a key factor regulating GABAA receptor function', *Journal of Neurochemistry*, 100(2), pp. 279–294. doi: 10.1111/j.1471-4159.2006.04206.x.
- Cherra, S. J. *et al.* (2010) 'Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation', *The Journal of Cell Biology*, 190(4), pp. 533–539. doi: 10.1083/jcb.201002108.
- Chino, H. *et al.* (2019) 'Intrinsically Disordered Protein TEX264 Mediates ER-phagy', *Molecular Cell*, 74(5), pp. 909–921.e6. doi: 10.1016/j.molcel.2019.03.033.
- Clark, S. L. (1957) 'CELLULAR DIFFERENTIATION IN THE KIDNEYS OF NEWBORN MICE STUDIED WITH THE ELECTRON MICROSCOPE', *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 3(3), pp. 349–362.
- Cox, B., Briscoe, J. and Ulloa, F. (2010) 'SUMOylation by Pias1 regulates the activity of the Hedgehog dependent Gli transcription factors', *PloS One*, 5(8), p. e11996. doi: 10.1371/journal.pone.0011996.
- Coyle, J. E. *et al.* (2002) 'Structure of GABARAP in two conformations: implications for GABA(A) receptor localization and tubulin binding', *Neuron*, 33(1), pp. 63–74. doi: 10.1016/s0896-6273(01)00558-x.
- Cuervo, A. M. and Wong, E. (2014) 'Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging', *Cell Research*, 24(1), pp. 92–104. doi: 10.1038/cr.2013.153.
- Da Costa, I. C. and Schmidt, C. K. (2020) 'Ubiquitin-like proteins in the DNA damage response: the next generation', *Essays in Biochemistry*. Edited by Q. Wu, 64(5), pp. 737–752. doi: 10.1042/EBC20190095.
- Danielsen, J. R. *et al.* (2012) 'DNA damage-inducible SUMOylation of HERC2 promotes RNF8 binding via a novel SUMO-binding Zinc finger', *The Journal of Cell Biology*, 197(2), pp. 179–187. doi: 10.1083/jcb.201106152.
- Delgado, T. C. *et al.* (2018) 'Neddylaton, a novel paradigm in liver cancer', *Translational Gastroenterology and Hepatology*, 3, p. 37. doi: 10.21037/tgh.2018.06.05.
- Dickinson, D. J. and Goldstein, B. (2016) 'CRISPR-Based Methods for *Caenorhabditis elegans* Genome Engineering', *Genetics*, 202(3), pp. 885–901. doi: 10.1534/genetics.115.182162.
- Dikic, I., Wakatsuki, S. and Walters, K. J. (2009) 'Ubiquitin-binding domains — from structures to functions', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(10), pp. 659–671. doi: 10.1038/nrm2767.
- Dohmen, R. J. and Varshavsky, A. (2005) 'Heat-inducible degron and the making of conditional mutants', *Methods in Enzymology*, 399, pp. 799–822. doi: 10.1016/S0076-6879(05)99052-6.
- Dooley, H. C. *et al.* (2014) 'WIPI2 links LC3 conjugation with PI3P, autophagosome formation, and pathogen clearance by recruiting Atg12-5-16L1', *Molecular Cell*, 55(2), pp. 238–252. doi: 10.1016/j.molcel.2014.05.021.

Durgan, J. *et al.* (2020) *Non-canonical autophagy drives alternative ATG8 conjugation to phosphatidylserine*. preprint. *Cell Biology*. doi: 10.1101/2020.05.14.096115.

de Duve, C. *et al.* (1955) 'Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue', *Biochemical Journal*, 60(4), pp. 604–617.

Enchev, R. I., Schulman, B. A. and Peter, M. (2015) 'Protein neddylation: beyond cullin-RING ligases', *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 16(1), pp. 30–44. doi: 10.1038/nrm3919.

Engedal, N. and Seglen, P. O. (2016) 'Autophagy of cytoplasmic bulk cargo does not require LC3', *Autophagy*, 12(2), pp. 439–441. doi: 10.1080/15548627.2015.1076606.

Fader, C. M. and Colombo, M. I. (2009) 'Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners', *Cell Death and Differentiation*, 16(1), pp. 70–78. doi: 10.1038/cdd.2008.168.

Finley, D., Bartel, B. and Varshavsky, A. (1989) 'The tails of ubiquitin precursors are ribosomal proteins whose fusion to ubiquitin facilitates ribosome biogenesis', *Nature*, 338(6214), pp. 394–401. doi: 10.1038/338394a0.

Florey, O. *et al.* (2011) 'Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes', *Nature Cell Biology*, 13(11), pp. 1335–1343. doi: 10.1038/ncb2363.

Flotho, A. and Melchior, F. (2013) 'Sumoylation: a regulatory protein modification in health and disease', *Annual Review of Biochemistry*, 82, pp. 357–385. doi: 10.1146/annurev-biochem-061909-093311.

Fracchiolla, D., Zens, B. and Martens, S. (2017) 'Chapter Twenty-Two - In Vitro Reconstitution of Atg8 Conjugation and Deconjugation', in Galluzzi, L., Bravo-San Pedro, J. M., and Kroemer, G. (eds) *Methods in Enzymology*. Academic Press (Molecular Characterization of Autophagic Responses, Part A), pp. 377–390. doi: 10.1016/bs.mie.2016.09.066.

Fujita, N. *et al.* (2008) 'An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues and causes defects in autophagosome closure', *Molecular Biology of the Cell*, 19(11), pp. 4651–4659. doi: 10.1091/mbc.e08-03-0312.

Fumagalli, F. *et al.* (2016) 'Translocon component Sec62 acts in endoplasmic reticulum turnover during stress recovery', *Nature Cell Biology*, 18(11), pp. 1173–1184. doi: 10.1038/ncb3423.

Galluzzi, L. and Green, D. R. (2019) 'Autophagy-Independent Functions of the Autophagy Machinery', *Cell*, 177(7), pp. 1682–1699. doi: 10.1016/j.cell.2019.05.026.

Ganley, I. G. *et al.* (2011) 'DISTINCT AUTOPHAGOSOMAL-LYSOSOMAL FUSION MECHANISM REVEALED BY THAPSIGARGIN-INDUCED AUTOPHAGY ARREST', *Molecular cell*, 42(6), pp. 731–743. doi: 10.1016/j.molcel.2011.04.024.

Gemayel, R. *et al.* (2017) 'Variable repeats in the eukaryotic polyubiquitin gene *ubi4* modulate

- proteostasis and stress survival', *Nature Communications*, 8. doi: 10.1038/s41467-017-00533-4.
- Goehring, A. S., Rivers, D. M. and Sprague, G. F. (2003) 'Attachment of the Ubiquitin-Related Protein Urm1p to the Antioxidant Protein Ahp1p', *Eukaryotic Cell*, 2(5), pp. 930–936. doi: 10.1128/EC.2.5.930-936.2003.
- Grabbe, C. and Dikic, I. (2009) 'Functional Roles of Ubiquitin-Like Domain (ULD) and Ubiquitin-Binding Domain (UBD) Containing Proteins', *Chemical Reviews*, 109(4), pp. 1481–1494. doi: 10.1021/cr800413p.
- Green, F. *et al.* (2002) 'Association of human transferrin receptor with GABARAP', *FEBS letters*, 518(1–3), pp. 101–106. doi: 10.1016/s0014-5793(02)02655-8.
- Grumati, P. *et al.* (2017) 'Full length RTN3 regulates turnover of tubular endoplasmic reticulum via selective autophagy', *eLife*, 6. doi: 10.7554/eLife.25555.
- Grunwald, D. S. *et al.* (2020) 'GABARAPs and LC3s have opposite roles in regulating ULK1 for autophagy induction', *Autophagy*, 16(4), pp. 600–614. doi: 10.1080/15548627.2019.1632620.
- Gu, Y. *et al.* (2019) 'Mammalian Atg8 proteins regulate lysosome and autolysosome biogenesis through SNAREs', *The EMBO journal*, 38(22), p. e101994. doi: 10.15252/embj.2019101994.
- Guiboileau, A. and Masclaux-Daubresse, C. (2012) 'L'autophagie chez les plantes : mécanismes, régulations et fonctions', *Comptes Rendus Biologies*, 335(6), pp. 375–388. doi: 10.1016/j.crv.2012.04.004.
- Gutierrez, M. G. (2004) 'Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells', *Journal of Cell Science*, 117(13), pp. 2687–2697. doi: 10.1242/jcs.01114.
- Gwinn, D. M. *et al.* (2008) 'AMPK phosphorylation of raptor mediates a metabolic checkpoint', *Molecular Cell*, 30(2), pp. 214–226. doi: 10.1016/j.molcel.2008.03.003.
- Hailey, D. W. *et al.* (2010) 'Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation', *Cell*, 141(4), pp. 656–667. doi: 10.1016/j.cell.2010.04.009.
- Hamasaki, M. *et al.* (2013) 'Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites', *Nature*, 495(7441), pp. 389–393. doi: 10.1038/nature11910.
- Hammerling, B. C. *et al.* (2017) 'A Rab5 endosomal pathway mediates Parkin-dependent mitochondrial clearance', *Nature Communications*, 8, p. 14050. doi: 10.1038/ncomms14050.
- Hanada, T. *et al.* (2007) 'The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy', *The Journal of Biological Chemistry*, 282(52), pp. 37298–37302. doi: 10.1074/jbc.C700195200.
- Hanna, R. A. *et al.* (2012) 'Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(23), pp. 19094–19104. doi: 10.1074/jbc.M111.322933.

- Hansen, M. *et al.* (2008) ‘A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans*’, *PLoS genetics*, 4(2), p. e24. doi: 10.1371/journal.pgen.0040024.
- Hara, T. *et al.* (2008) ‘FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells’, *The Journal of Cell Biology*, 181(3), pp. 497–510. doi: 10.1083/jcb.200712064.
- Hendriks, I. A. *et al.* (2014) ‘Uncovering global SUMOylation signaling networks in a site-specific manner’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 21(10), pp. 927–936. doi: 10.1038/nsmb.2890.
- Hendriks, I. A. and Vertegaal, A. C. O. (2016) ‘Label-Free Identification and Quantification of SUMO Target Proteins’, *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 1475, pp. 171–193. doi: 10.1007/978-1-4939-6358-4_13.
- Hennell James, R. *et al.* (2017) ‘Functional reconstruction of a eukaryotic-like E1/E2/(RING) E3 ubiquitylation cascade from an uncultured archaeon’, *Nature Communications*, 8(1), p. 1120. doi: 10.1038/s41467-017-01162-7.
- Herhaus, L. *et al.* (2020) ‘TBK1-mediated phosphorylation of LC3C and GABARAP-L2 controls autophagosome shedding by ATG4 protease’, *EMBO reports*, 21(1), p. e48317. doi: 10.15252/embr.201948317.
- Hershko, A. and Ciechanover, A. (1998) ‘THE UBIQUITIN SYSTEM’, p. 56.
- Hershko, A., Ciechanover, A. and Rose, I. A. (1979) ‘Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 76(7), pp. 3107–3110. doi: 10.1073/pnas.76.7.3107.
- Hicke, L., Schubert, H. L. and Hill, C. P. (2005) ‘Ubiquitin-binding domains’, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 6(8), pp. 610–621. doi: 10.1038/nrm1701.
- Hickey, C. M., Wilson, N. R. and Hochstrasser, M. (2012) ‘Function and regulation of SUMO proteases’, *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 13(12), pp. 755–766. doi: 10.1038/nrm3478.
- Hill, S. E. *et al.* (2019) ‘Maturation and Clearance of Autophagosomes in Neurons Depends on a Specific Cysteine Protease Isoform, ATG-4.2’, *Developmental Cell*, 49(2), pp. 251–266.e8. doi: 10.1016/j.devcel.2019.02.013.
- Hill, S. E. and Colón-Ramos, D. A. (2019) ‘A specific ATG-4 isoform is required for autophagic maturation and clearance in *C. elegans* neurons’, *Autophagy*, 15(10), pp. 1840–1842. doi: 10.1080/15548627.2019.1632123.
- Hirata, E., Ohya, Y. and Suzuki, K. (2017) ‘Atg4 plays an important role in efficient expansion of autophagic isolation membranes by cleaving lipidated Atg8 in *Saccharomyces cerevisiae*’, *PLoS One*, 12(7), p. e0181047. doi: 10.1371/journal.pone.0181047.

- Hochstrasser, M. (1996) 'Ubiquitin-dependent protein degradation', *Annual Review of Genetics*, 30, pp. 405–439. doi: 10.1146/annurev.genet.30.1.405.
- Huang, R. *et al.* (2015) 'Deacetylation of Nuclear LC3 Drives Autophagy Initiation under Starvation', *Molecular Cell*, 57(3), pp. 456–466. doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.013.
- Humbard, M. A. *et al.* (2010) 'Ubiquitin-like small archaeal modifier proteins (SAMPs) in *Haloferax volcanii*', *Nature*, 463(7277), pp. 54–60. doi: 10.1038/nature08659.
- Husnjak, K. and Dikic, I. (2012) 'Ubiquitin-binding proteins: decoders of ubiquitin-mediated cellular functions', *Annual Review of Biochemistry*, 81, pp. 291–322. doi: 10.1146/annurev-biochem-051810-094654.
- Hyttinen, J. M. T. *et al.* (2013) 'Maturation of autophagosomes and endosomes: a key role for Rab7', *Biochimica Et Biophysica Acta*, 1833(3), pp. 503–510. doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.11.018.
- Hyttinen, J. M. T. *et al.* (2014) 'Clearance of misfolded and aggregated proteins by aggrephagy and implications for aggregation diseases', *Ageing Research Reviews*, 18, pp. 16–28. doi: 10.1016/j.arr.2014.07.002.
- Ichimura, Y. *et al.* (2000) 'A ubiquitin-like system mediates protein lipidation', *Nature*, 408(6811), pp. 488–492. doi: 10.1038/35044114.
- Ichimura, Y. *et al.* (2004) 'In vivo and in vitro reconstitution of Atg8 conjugation essential for autophagy', *The Journal of Biological Chemistry*, 279(39), pp. 40584–40592. doi: 10.1074/jbc.M405860200.
- Ichimura, Y. *et al.* (2008) 'Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy', *The Journal of Biological Chemistry*, 283(33), pp. 22847–22857. doi: 10.1074/jbc.M802182200.
- Ikeda, F., Crosetto, N. and Dikic, I. (2010) 'What determines the specificity and outcomes of ubiquitin signaling?', *Cell*, 143(5), pp. 677–681. doi: 10.1016/j.cell.2010.10.026.
- Itakura, E. and Mizushima, N. (2010) 'Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins', *Autophagy*, 6(6), pp. 764–776. doi: 10.4161/auto.6.6.12709.
- Jacomin, A.-C. *et al.* (2020) 'Regulation of Expression of Autophagy Genes by Atg8a-Interacting Partners Sequoia, YL-1, and Sir2 in *Drosophila*', *Cell Reports*, 31(8), p. 107695. doi: 10.1016/j.celrep.2020.107695.
- Jacquin, E. *et al.* (2017) 'Pharmacological modulators of autophagy activate a parallel noncanonical pathway driving unconventional LC3 lipidation', *Autophagy*, 13(5), pp. 854–867. doi: 10.1080/15548627.2017.1287653.
- Jäger, S. *et al.* (2004) 'Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles', *Journal of Cell Science*, 117(Pt 20), pp. 4837–4848. doi: 10.1242/jcs.01370.

- Jatana, N. *et al.* (2020) ‘Human LC3 and GABARAP subfamily members achieve functional specificity via specific structural modulations’, *Autophagy*, 16(2), pp. 239–255. doi: 10.1080/15548627.2019.1606636.
- Jentsch, S. and Pyrowolakis, G. (2000) ‘Ubiquitin and its kin: how close are the family ties?’, *Trends in Cell Biology*, 10(8), pp. 335–342. doi: 10.1016/S0962-8924(00)01785-2.
- Jipa, A. *et al.* (2020) ‘Analysis of Drosophila Atg8 proteins reveals multiple lipidation-independent roles’, *Autophagy*, pp. 1–11. doi: 10.1080/15548627.2020.1856494.
- Joachim, J. *et al.* (2015) ‘Activation of ULK Kinase and Autophagy by GABARAP Trafficking from the Centrosome Is Regulated by WAC and GM130’, *Molecular Cell*, 60(6), pp. 899–913. doi: 10.1016/j.molcel.2015.11.018.
- Joachim, J. *et al.* (2017) ‘Centriolar Satellites Control GABARAP Ubiquitination and GABARAP-Mediated Autophagy’, *Current Biology*, 27(14), pp. 2123–2136.e7. doi: 10.1016/j.cub.2017.06.021.
- Jordens, I. *et al.* (2001) ‘The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors’, *Current biology: CB*, 11(21), pp. 1680–1685. doi: 10.1016/s0960-9822(01)00531-0.
- Jung, C. H. *et al.* (2009) ‘ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery’, *Molecular Biology of the Cell*, 20(7), pp. 1992–2003. doi: 10.1091/mbc.e08-12-1249.
- Kabeya, Y. *et al.* (2004) ‘LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation’, *Journal of Cell Science*, 117(Pt 13), pp. 2805–2812. doi: 10.1242/jcs.01131.
- Kamitani, T. *et al.* (2001) ‘Targeting of NEDD8 and its conjugates for proteasomal degradation by NUB1’, *The Journal of Biological Chemistry*, 276(49), pp. 46655–46660. doi: 10.1074/jbc.M108636200.
- Kang, Y.-A. *et al.* (2012) ‘Autophagy driven by a master regulator of hematopoiesis’, *Molecular and Cellular Biology*, 32(1), pp. 226–239. doi: 10.1128/MCB.06166-11.
- Kawakami, T. *et al.* (2001) ‘NEDD8 recruits E2-ubiquitin to SCF E3 ligase’, *The EMBO journal*, 20(15), pp. 4003–4012. doi: 10.1093/emboj/20.15.4003.
- Kaye, F. J. *et al.* (2000) ‘A family of ubiquitin-like proteins binds the ATPase domain of Hsp70-like Stch’, *FEBS letters*, 467(2–3), pp. 348–355. doi: 10.1016/s0014-5793(00)01135-2.
- Kellner, R. *et al.* (2017) ‘ATG8 Expansion: A Driver of Selective Autophagy Diversification?’, *Trends in Plant Science*, 22(3), pp. 204–214. doi: 10.1016/j.tplants.2016.11.015.
- Keuss, M. J. *et al.* (2019) ‘Unanchored tri-NEDD8 inhibits PARP-1 to protect from oxidative stress-induced cell death’, *The EMBO Journal*, 38(6), p. e100024. doi: 10.15252/embj.2018100024.

- Khaminets, A., Behl, C. and Dikic, I. (2016) 'Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy', *Trends in Cell Biology*, 26(1), pp. 6–16. doi: 10.1016/j.tcb.2015.08.010.
- Kirisako, T. *et al.* (1999) 'Formation Process of Autophagosome Is Traced with Apg8/Aut7p in Yeast', *The Journal of Cell Biology*, 147(2), pp. 435–446. doi: 10.1083/jcb.147.2.435.
- Kirisako, T. *et al.* (2000) 'The Reversible Modification Regulates the Membrane-Binding State of Apg8/Aut7 Essential for Autophagy and the Cytoplasm to Vacuole Targeting Pathway', *Journal of Cell Biology*, 151(2), pp. 263–276. doi: 10.1083/jcb.151.2.263.
- Kirkin, V. *et al.* (2009) 'A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates', *Molecular Cell*, 33(4), pp. 505–516. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.020.
- Kirkin, V. (2020) 'History of the Selective Autophagy Research: How Did It Begin and Where Does It Stand Today?', *Journal of Molecular Biology*, 432(1), pp. 3–27. doi: 10.1016/j.jmb.2019.05.010.
- Kirkin, V. and Dikic, I. (2007) 'Role of ubiquitin- and Ubl-binding proteins in cell signaling', *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2), pp. 199–205. doi: 10.1016/j.ceb.2007.02.002.
- Kirsh, O. *et al.* (2002) 'The SUMO E3 ligase RanBP2 promotes modification of the HDAC4 deacetylase', *The EMBO journal*, 21(11), pp. 2682–2691. doi: 10.1093/emboj/21.11.2682.
- Kissova, I. *et al.* (2007) 'Selective and non-selective autophagic degradation of mitochondria in yeast', *Autophagy*, 3(4), pp. 329–336. doi: 10.4161/auto.4034.
- Kito, K., Yeh, E. T. H. and Kamitani, T. (2001) 'NUB1, a NEDD8-interacting Protein, Is Induced by Interferon and Down-regulates the NEDD8 Expression', *Journal of Biological Chemistry*, 276(23), pp. 20603–20609. doi: 10.1074/jbc.M100920200.
- Klionsky, D. J. and Ohsumi, Y. (1999) 'Vacuolar import of proteins and organelles from the cytoplasm', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 15, pp. 1–32. doi: 10.1146/annurev.cellbio.15.1.1.
- Knorr, R. L. *et al.* (2014) 'Membrane morphology is actively transformed by covalent binding of the protein Atg8 to PE-lipids', *PloS One*, 9(12), p. e115357. doi: 10.1371/journal.pone.0115357.
- Kojima, T. *et al.* (2015) 'Role of the Atg9a gene in intrauterine growth and survival of fetal mice', *Reproductive Biology*, 15(3), pp. 131–138. doi: 10.1016/j.repbio.2015.05.001.
- Komatsu, M. *et al.* (2007) 'Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice', *Cell*, 131(6), pp. 1149–1163. doi: 10.1016/j.cell.2007.10.035.
- Koukourakis, M. I. *et al.* (2015) 'Autophagosome Proteins LC3A, LC3B and LC3C Have Distinct Subcellular Distribution Kinetics and Expression in Cancer Cell Lines', *PloS One*, 10(9), p. e0137675. doi: 10.1371/journal.pone.0137675.

- Kraft, C. *et al.* (2012) 'Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy: Regulation of Atg1 kinase function', *The EMBO Journal*, 31(18), pp. 3691–3703. doi: 10.1038/emboj.2012.225.
- Ktistakis, N. T. (2017) 'In praise of M. Anselmier who first used the term "autophagie" in 1859', *Autophagy*, 13(12), pp. 2015–2017. doi: 10.1080/15548627.2017.1367473.
- Kumar, S. *et al.* (2020) 'Mammalian Atg8-family proteins are upstream regulators of the lysosomal system by controlling MTOR and TFEB', *Autophagy*, 16(12), pp. 2305–2306. doi: 10.1080/15548627.2020.1837423.
- Kurepa, J. *et al.* (2003) 'The small ubiquitin-like modifier (SUMO) protein modification system in Arabidopsis. Accumulation of SUMO1 and -2 conjugates is increased by stress', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(9), pp. 6862–6872. doi: 10.1074/jbc.M209694200.
- Kwon, Y. T. and Ciechanover, A. (2017) 'The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy', *Trends in Biochemical Sciences*, 42(11), pp. 873–886. doi: 10.1016/j.tibs.2017.09.002.
- Lamark, T. *et al.* (2003) 'Interaction codes within the family of mammalian Phox and Bem1p domain-containing proteins', *The Journal of Biological Chemistry*, 278(36), pp. 34568–34581. doi: 10.1074/jbc.M303221200.
- Larsen, C. N. and Wang, H. (2002) 'The Ubiquitin Superfamily: Members, Features, and Phylogenies', *Journal of Proteome Research*, 1(5), pp. 411–419. doi: 10.1021/pr025522n.
- Lazarou, M. *et al.* (2015) 'The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy', *Nature*, 524(7565), pp. 309–314. doi: 10.1038/nature14893.
- Le Grand, J. N. *et al.* (2011) 'GABARAPL1 (GEC1): original or copycat?', *Autophagy*, 7(10), pp. 1098–1107. doi: 10.4161/auto.7.10.15904.
- Leboutet, R. *et al.* (2020) 'Mitophagy during development and stress in *C. elegans*', *Mechanisms of Ageing and Development*, 189, p. 111266. doi: 10.1016/j.mad.2020.111266.
- Lee, I. H. *et al.* (2008) 'A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(9), pp. 3374–3379. doi: 10.1073/pnas.0712145105.
- Lee, I. H. and Finkel, T. (2009) 'Regulation of autophagy by the p300 acetyltransferase', *The Journal of Biological Chemistry*, 284(10), pp. 6322–6328. doi: 10.1074/jbc.M807135200.
- Lee, Y.-K. and Lee, J.-A. (2016) 'Role of the mammalian ATG8/LC3 family in autophagy: differential and compensatory roles in the spatiotemporal regulation of autophagy', *BMB Reports*, 49(8), pp. 424–430. doi: 10.5483/BMBRep.2016.49.8.081.
- Leil, T. A. *et al.* (2004) 'GABAA receptor-associated protein traffics GABAA receptors to the plasma membrane in neurons', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 24(50), pp. 11429–11438. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3355-04.2004.

- Li, Y. *et al.* (2020) ‘Decoding three distinct states of the Syntaxin17 SNARE motif in mediating autophagosome-lysosome fusion’, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 117(35), pp. 21391–21402. doi: 10.1073/pnas.2006997117.
- Liang, R.-Y. *et al.* (2014) ‘Rad23 interaction with the proteasome is regulated by phosphorylation of its ubiquitin-like (UbL) domain’, *Journal of Molecular Biology*, 426(24), pp. 4049–4060. doi: 10.1016/j.jmb.2014.10.004.
- Liu, L. *et al.* (2012) ‘Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells’, *Nature Cell Biology*, 14(2), pp. 177–185. doi: 10.1038/ncb2422.
- Lu, Q. *et al.* (2011) ‘The WD40 repeat PtdIns(3)P-binding protein EPG-6 regulates progression of omegasomes to autophagosomes’, *Developmental Cell*, 21(2), pp. 343–357. doi: 10.1016/j.devcel.2011.06.024.
- Lu, W.-H. *et al.* (2014) ‘Autophagy functions on EMT in gastrulation of avian embryo’, *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 13(17), pp. 2752–2764. doi: 10.4161/15384101.2015.945850.
- Lux, M. C., Standke, L. C. and Tan, D. S. (2019) ‘Targeting adenylate-forming enzymes with designed sulfonyl adenosine inhibitors’, *The Journal of antibiotics*, 72(6), pp. 325–349. doi: 10.1038/s41429-019-0171-2.
- Lynch-Day, M. A. and Klionsky, D. J. (2010) ‘The Cvt pathway as a model for selective autophagy’, *FEBS letters*, 584(7), pp. 1359–1366. doi: 10.1016/j.febslet.2010.02.013.
- Lystad, A. H. *et al.* (2014) ‘Structural determinants in GABARAP required for the selective binding and recruitment of ALFY to LC3B-positive structures’, *EMBO reports*, 15(5), pp. 557–565. doi: 10.1002/embr.201338003.
- Madsen, L. *et al.* (2007) ‘Ubiquitin domain proteins in disease’, *BMC Biochemistry*, 8(Suppl 1), p. S1. doi: 10.1186/1471-2091-8-S1-S1.
- Majeski, A. E. and Dice, J. F. (2004) ‘Mechanisms of chaperone-mediated autophagy’, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), pp. 2435–2444. doi: 10.1016/j.biocel.2004.02.013.
- Mammucari, C. *et al.* (2007) ‘FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo’, *Cell Metabolism*, 6(6), pp. 458–471. doi: 10.1016/j.cmet.2007.11.001.
- Manil-Ségalen, M. *et al.* (2014) ‘The *C. elegans* LC3 Acts Downstream of GABARAP to Degrade Autophagosomes by Interacting with the HOPS Subunit VPS39’, *Developmental Cell*, 28(1), pp. 43–55. doi: 10.1016/j.devcel.2013.11.022.
- Mari, M. and Reggiori, F. (2010) ‘Atg9 reservoirs, a new organelle of the yeast endomembrane system?’, *Autophagy*, 6(8), pp. 1221–1223. doi: 10.1083/jcb.200912089.
- Massey, A., Kiffin, R. and Cuervo, A. M. (2004) ‘Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy’, *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36(12), pp. 2420–2434. doi: 10.1016/j.biocel.2004.04.010.

- Matic, I. *et al.* (2008) ‘Phosphorylation of SUMO-1 occurs in vivo and is conserved through evolution’, *Journal of Proteome Research*, 7(9), pp. 4050–4057. doi: 10.1021/pr800368m.
- Matoba, K. *et al.* (2020) ‘Atg9 is a lipid scramblase that mediates autophagosomal membrane expansion’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 27(12), pp. 1185–1193. doi: 10.1038/s41594-020-00518-w.
- McEwan, D. G. *et al.* (2015) ‘PLEKHM1 regulates autophagosome-lysosome fusion through HOPS complex and LC3/GABARAP proteins’, *Molecular Cell*, 57(1), pp. 39–54. doi: 10.1016/j.molcel.2014.11.006.
- McEwan, D. G. (2017) ‘Host-pathogen interactions and subversion of autophagy’, *Essays in Biochemistry*, 61(6), pp. 687–697. doi: 10.1042/EBC20170058.
- Melendez, A. *et al.* (2003) ‘Autophagy Genes Are Essential for Dauer Development and Life-Span Extension in *C. elegans*’, 301, p. 6.
- Meléndez, A. and Levine, B. (2009) ‘Autophagy in *C. elegans*’, *WormBook: The Online Review of C. Elegans Biology*, pp. 1–26. doi: 10.1895/wormbook.1.147.1.
- Mercer, C. A., Kaliappan, A. and Dennis, P. B. (2009) ‘A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy’, *Autophagy*, 5(5), pp. 649–662. doi: 10.4161/auto.5.5.8249.
- Miller, M. J. *et al.* (2013) ‘Quantitative proteomics reveals factors regulating RNA biology as dynamic targets of stress-induced SUMOylation in Arabidopsis’, *Molecular & cellular proteomics: MCP*, 12(2), pp. 449–463. doi: 10.1074/mcp.M112.025056.
- Mizushima, N. (2007) ‘Autophagy: process and function’, *Genes & Development*, 21(22), pp. 2861–2873. doi: 10.1101/gad.1599207.
- Mochida, K. *et al.* (2015) ‘Receptor-mediated selective autophagy degrades the endoplasmic reticulum and the nucleus’, *Nature*, 522(7556), pp. 359–362. doi: 10.1038/nature14506.
- Molino, D. *et al.* (2017) ‘ER-driven membrane contact sites: Evolutionary conserved machineries for stress response and autophagy regulation?’, *Communicative & Integrative Biology*, 10(5–6), p. e1401699. doi: 10.1080/19420889.2017.1401699.
- Moreau, K. *et al.* (2011) ‘Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion’, *Cell*, 146(2), pp. 303–317. doi: 10.1016/j.cell.2011.06.023.
- Morishita, H. and Mizushima, N. (2019) ‘Diverse Cellular Roles of Autophagy’, *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 35, pp. 453–475. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100818-125300.
- Mukherjee, A. *et al.* (2016) ‘Selective endosomal microautophagy is starvation-inducible in *Drosophila*’, *Autophagy*, 12(11), pp. 1984–1999. doi: 10.1080/15548627.2016.1208887.
- Mullock, B. M. *et al.* (1998) ‘Fusion of lysosomes with late endosomes produces a hybrid

organelle of intermediate density and is NSF dependent', *The Journal of Cell Biology*, 140(3), pp. 591–601. doi: 10.1083/jcb.140.3.591.

Nair, U. *et al.* (2012) 'A role for Atg8-PE deconjugation in autophagosome biogenesis', *Autophagy*, 8(5), pp. 780–793. doi: 10.4161/autophagy.19385.

Nair, U. and Klionsky, D. J. (2011) 'Autophagosome biogenesis requires SNAREs', *Autophagy*, 7(12), pp. 1570–1572. doi: 10.4161/autophagy.7.12.18001.

Nakatogawa, H., Ishii, J., *et al.* (2012) 'Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis', *Autophagy*, 8(2), pp. 177–186. doi: 10.4161/autophagy.8.2.18373.

Nakatogawa, H., Ohbayashi, S., *et al.* (2012) 'The autophagy-related protein kinase Atg1 interacts with the ubiquitin-like protein Atg8 via the Atg8 family interacting motif to facilitate autophagosome formation', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(34), pp. 28503–28507. doi: 10.1074/jbc.C112.387514.

Nakatogawa, H., Ichimura, Y. and Ohsumi, Y. (2007) 'Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion', *Cell*, 130(1), pp. 165–178. doi: 10.1016/j.cell.2007.05.021.

Neyret-Kahn, H. *et al.* (2013) 'Sumoylation at chromatin governs coordinated repression of a transcriptional program essential for cell growth and proliferation', *Genome Research*, 23(10), pp. 1563–1579. doi: 10.1101/gr.154872.113.

Nguyen, T. N. *et al.* (2016) 'Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome-lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation', *The Journal of Cell Biology*, 215(6), pp. 857–874. doi: 10.1083/jcb.201607039.

Nguyen, T. N., Padman, B. S. and Lazarou, M. (2016) 'Deciphering the Molecular Signals of PINK1/Parkin Mitophagy', *Trends in Cell Biology*, 26(10), pp. 733–744. doi: 10.1016/j.tcb.2016.05.008.

Nishida, Y. *et al.* (2009) 'Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy', *Nature*, 461(7264), pp. 654–658. doi: 10.1038/nature08455.

Niskanen, E. A. *et al.* (2015) 'Global SUMOylation on active chromatin is an acute heat stress response restricting transcription', *Genome Biology*, 16, p. 153. doi: 10.1186/s13059-015-0717-y.

Noda, N. N. *et al.* (2008) 'Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy: Structural basis of target recognition by Atg8', *Genes to Cells*, 13(12), pp. 1211–1218. doi: 10.1111/j.1365-2443.2008.01238.x.

Noda, N. N. and Fujioka, Y. (2015) 'Atg1 family kinases in autophagy initiation', *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 72(16), pp. 3083–3096. doi: 10.1007/s00018-015-1917-z.

Noda, T. *et al.* (1995) 'Novel system for monitoring autophagy in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 210(1), pp. 126–132. doi:

10.1006/bbrc.1995.1636.

Novak, I. *et al.* (2010) 'Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance', *EMBO reports*, 11(1), pp. 45–51. doi: 10.1038/embor.2009.256.

Novikoff, A. B., Beaufay, H. and de Duve, C. (1956) 'ELECTRON MICROSCOPY OF LYSOSOME-RICH FRACTIONS FROM RAT LIVER', *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, 2(4), pp. 179–184.

Nunoura, T. *et al.* (2011) 'Insights into the evolution of Archaea and eukaryotic protein modifier systems revealed by the genome of a novel archaeal group', *Nucleic Acids Research*, 39(8), pp. 3204–3223. doi: 10.1093/nar/gkq1228.

Ogura, K. *et al.* (1994) 'Caenorhabditis elegans unc-51 gene required for axonal elongation encodes a novel serine/threonine kinase', *Genes & Development*, 8(20), pp. 2389–2400. doi: 10.1101/gad.8.20.2389.

Ohki, Y. *et al.* (2009) 'The mechanism of poly-NEDD8 chain formation in vitro', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 381(3), pp. 443–447. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.02.090.

Ohnstad, A. E. *et al.* (2020) 'Receptor-mediated clustering of FIP200 bypasses the role of LC3 lipidation in autophagy', *The EMBO journal*, 39(24), p. e104948. doi: 10.15252/emboj.2020104948.

Oku, M. *et al.* (2017) 'Evidence for ESCRT- and clathrin-dependent microautophagy', *The Journal of Cell Biology*, 216(10), pp. 3263–3274. doi: 10.1083/jcb.201611029.

Otsu, K., Murakawa, T. and Yamaguchi, O. (2015) 'BCL2L13 is a mammalian homolog of the yeast mitophagy receptor Atg32', *Autophagy*, 11(10), pp. 1932–1933. doi: 10.1080/15548627.2015.1084459.

Oved, S. *et al.* (2006) 'Conjugation to Nedd8 instigates ubiquitylation and down-regulation of activated receptor tyrosine kinases', *The Journal of Biological Chemistry*, 281(31), pp. 21640–21651. doi: 10.1074/jbc.M513034200.

Ozkaynak, E. *et al.* (1987) 'The yeast ubiquitin genes: a family of natural gene fusions', *The EMBO journal*, 6(5), pp. 1429–1439.

Paix, A. *et al.* (2015) 'High Efficiency, Homology-Directed Genome Editing in Caenorhabditis elegans Using CRISPR-Cas9 Ribonucleoprotein Complexes', *Genetics*, 201(1), pp. 47–54. doi: 10.1534/genetics.115.179382.

Palmisano, N. J. and Meléndez, A. (2019) 'Autophagy in C. elegans development', *Developmental Biology*, 447(1), pp. 103–125. doi: 10.1016/j.ydbio.2018.04.009.

Pan, Z.-Q. *et al.* (2004) 'Nedd8 on cullin: building an expressway to protein destruction', *Oncogene*, 23(11), pp. 1985–1997. doi: 10.1038/sj.onc.1207414.

Pankiv, S. *et al.* (2007) 'p62/SQSTM1 Binds Directly to Atg8/LC3 to Facilitate Degradation of Ubiquitinated Protein Aggregates by Autophagy', *Journal of Biological Chemistry*, 282(33),

pp. 24131–24145. doi: 10.1074/jbc.M702824200.

Pankiv, S. *et al.* (2010) ‘FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport’, *The Journal of Cell Biology*, 188(2), pp. 253–269. doi: 10.1083/jcb.200907015.

Papinski, D. and Kraft, C. (2014) ‘Atg1 kinase organizes autophagosome formation by phosphorylating Atg9’, *Autophagy*, 10(7), pp. 1338–1340. doi: 10.4161/auto.28971.

Paz, Y., Elazar, Z. and Fass, D. (2000) ‘Structure of GATE-16, membrane transport modulator and mammalian ortholog of autophagocytosis factor Aut7p’, *The Journal of Biological Chemistry*, 275(33), pp. 25445–25450. doi: 10.1074/jbc.C000307200.

Pellerin, I. *et al.* (1993) ‘Identification and characterization of an early estrogen-regulated RNA in cultured guinea-pig endometrial cells’, *Molecular and Cellular Endocrinology*, 90(2), pp. R17–21. doi: 10.1016/0303-7207(93)90161-c.

Pelzer, C. and Groettrup, M. (2010) ‘FAT10 : Activated by UBA6 and Functioning in Protein Degradation’, *Sub-Cellular Biochemistry*, 54, pp. 238–246. doi: 10.1007/978-1-4419-6676-6_19.

Poillet-Perez, L. *et al.* (2017) ‘GABARAPL1 tumor suppressive function is independent of its conjugation to autophagosomes in MCF-7 breast cancer cells’, *Oncotarget*, 8(34). doi: 10.18632/oncotarget.19639.

Politi, Y. *et al.* (2014) ‘Paternal mitochondrial destruction after fertilization is mediated by a common endocytic and autophagic pathway in Drosophila’, *Developmental Cell*, 29(3), pp. 305–320. doi: 10.1016/j.devcel.2014.04.005.

Polson, H. E. J. *et al.* (2010) ‘Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation’, *Autophagy*, 6(4), pp. 506–522. doi: 10.4161/auto.6.4.11863.

Psakhye, I. and Jentsch, S. (2012) ‘Protein Group Modification and Synergy in the SUMO Pathway as Exemplified in DNA Repair’, *Cell*, 151(4), pp. 807–820. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.021.

Rajsbaum, R. and García-Sastre, A. (2014) ‘Unanchored ubiquitin in virus uncoating’, *Science*, 346(6208), pp. 427–428. doi: 10.1126/science.1261509.

Raman, N., Nayak, A. and Muller, S. (2013) ‘The SUMO system: a master organizer of nuclear protein assemblies’, *Chromosoma*, 122(6), pp. 475–485. doi: 10.1007/s00412-013-0429-6.

Randles, L. and Walters, K. J. (2012) ‘Ubiquitin and its binding domains’, *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, 17, pp. 2140–2157. doi: 10.2741/4042.

Redman, K. L. and Rechsteiner, M. (1989) ‘Identification of the long ubiquitin extension as ribosomal protein S27a’, *Nature*, 338(6214), pp. 438–440. doi: 10.1038/338438a0.

Ronau, J. A., Beckmann, J. F. and Hochstrasser, M. (2016) ‘Substrate specificity of the ubiquitin and Ubl proteases’, *Cell Research*, 26(4), pp. 441–456. doi: 10.1038/cr.2016.38.

- Sagiv, Y. *et al.* (2000) ‘GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF and the Golgi v-SNARE GOS-28’, *The EMBO journal*, 19(7), pp. 1494–1504. doi: 10.1093/emboj/19.7.1494.
- Sahu, R. *et al.* (2011) ‘MICROAUTOPHAGY OF CYTOSOLIC PROTEINS BY LATE ENDOSOMES’, *Developmental cell*, 20(1), pp. 131–139. doi: 10.1016/j.devcel.2010.12.003.
- Sakata, E. *et al.* (2007) ‘Direct interactions between NEDD8 and ubiquitin E2 conjugating enzymes upregulate cullin-based E3 ligase activity’, *Nature Structural & Molecular Biology*, 14(2), pp. 167–168. doi: 10.1038/nsmb1191.
- Sánchez-Wandelmer, J. *et al.* (2017) ‘Atg4 proteolytic activity can be inhibited by Atg1 phosphorylation’, *Nature Communications*, 8(1), p. 295. doi: 10.1038/s41467-017-00302-3.
- Sarikas, A., Hartmann, T. and Pan, Z.-Q. (2011) ‘The cullin protein family’, *Genome Biology*, 12(4), p. 220. doi: 10.1186/gb-2011-12-4-220.
- Sato, M. *et al.* (2018) ‘The autophagy receptor ALLO-1 and the IKKE-1 kinase control clearance of paternal mitochondria in *Caenorhabditis elegans*’, *Nature Cell Biology*, 20(1), pp. 81–91. doi: 10.1038/s41556-017-0008-9.
- Satoo, K. *et al.* (2009) ‘The structure of Atg4B–LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing and delipidation during autophagy’, *The EMBO Journal*, 28(9), pp. 1341–1350. doi: 10.1038/emboj.2009.80.
- Sawa-Makarska, J. *et al.* (2020) ‘Reconstitution of autophagosome nucleation defines Atg9 vesicles as seeds for membrane formation’, *Science*, 369(6508). doi: 10.1126/science.aaz7714.
- Schaaf, M. B. E. *et al.* (2016) ‘LC3/GABARAP family proteins: autophagy-(un)related functions’, *The FASEB Journal*, 30(12), pp. 3961–3978. doi: 10.1096/fj.201600698R.
- Schauber, C. *et al.* (1998) ‘Rad23 links DNA repair to the ubiquitin/proteasome pathway’, *Nature*, 391(6668), pp. 715–718. doi: 10.1038/35661.
- Scherz-Shouval, R. *et al.* (2003) ‘The COOH terminus of GATE-16, an intra-Golgi transport modulator, is cleaved by the human cysteine protease HsApg4A’, *The Journal of Biological Chemistry*, 278(16), pp. 14053–14058. doi: 10.1074/jbc.M212108200.
- Schmidtke, G. *et al.* (2006) ‘The UBA Domains of NUB1L Are Required for Binding but Not for Accelerated Degradation of the Ubiquitin-like Modifier FAT10’, *Journal of Biological Chemistry*, 281(29), pp. 20045–20054. doi: 10.1074/jbc.M603063200.
- Schuberth, C. and Buchberger, A. (2008) ‘UBX domain proteins: major regulators of the AAA ATPase Cdc48/p97’, *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 65(15), pp. 2360–2371. doi: 10.1007/s00018-008-8072-8.
- Schulman, B. A. and Harper, J. W. (2009) ‘Ubiquitin-like protein activation by E1 enzymes: the apex for downstream signalling pathways’, *Nature reviews. Molecular cell biology*, 10(5), pp. 319–331. doi: 10.1038/nrm2673.

- Schwartz, D. C. and Hochstrasser, M. (2003) 'A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO and related modifiers', *Trends in Biochemical Sciences*, 28(6), pp. 321–328. doi: 10.1016/S0968-0004(03)00113-0.
- Shpilka, T. *et al.* (2011) 'Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family', *Genome Biology*, 12(7), p. 226. doi: 10.1186/gb-2011-12-7-226.
- Smith, M. D. *et al.* (2018) 'CCPG1 Is a Non-canonical Autophagy Cargo Receptor Essential for ER-Phagy and Pancreatic ER Proteostasis', *Developmental Cell*, 44(2), pp. 217–232.e11. doi: 10.1016/j.devcel.2017.11.024.
- Sou, Y. *et al.* (2006) 'Phosphatidylserine in addition to phosphatidylethanolamine is an in vitro target of the mammalian Atg8 modifiers, LC3, GABARAP, and GATE-16', *The Journal of Biological Chemistry*, 281(6), pp. 3017–3024. doi: 10.1074/jbc.M505888200.
- Sou, Y. *et al.* (2008) 'The Atg8 conjugation system is indispensable for proper development of autophagic isolation membranes in mice', *Molecular Biology of the Cell*, 19(11), pp. 4762–4775. doi: 10.1091/mbc.e08-03-0309.
- Spang, A. *et al.* (2015) 'Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes', *Nature*, 521(7551), pp. 173–179. doi: 10.1038/nature14447.
- Stehmeier, P. and Muller, S. (2009) 'Phospho-regulated SUMO interaction modules connect the SUMO system to CK2 signaling', *Molecular Cell*, 33(3), pp. 400–409. doi: 10.1016/j.molcel.2009.01.013.
- Streich, F. C. and Lima, C. D. (2014) 'Structural and functional insights to ubiquitin-like protein conjugation', *Annual Review of Biophysics*, 43, pp. 357–379. doi: 10.1146/annurev-biophys-051013-022958.
- Sugawara, K. *et al.* (2004) 'The crystal structure of microtubule-associated protein light chain 3, a mammalian homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Atg8', *Genes to Cells: Devoted to Molecular & Cellular Mechanisms*, 9(7), pp. 611–618. doi: 10.1111/j.1356-9597.2004.00750.x.
- Sumimoto, H., Kamakura, S. and Ito, T. (2007) 'Structure and function of the PB1 domain, a protein interaction module conserved in animals, fungi, amoebas, and plants', *Science's STKE: signal transduction knowledge environment*, 2007(401), p. re6. doi: 10.1126/stke.4012007re6.
- Suzuki, K. *et al.* (2001) 'The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation', *The EMBO journal*, 20(21), pp. 5971–5981. doi: 10.1093/emboj/20.21.5971.
- Suzuki, K. *et al.* (2010) 'Selective transport of alpha-mannosidase by autophagic pathways: identification of a novel receptor, Atg34p', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(39), pp. 30019–30025. doi: 10.1074/jbc.M110.143511.
- Suzuki, K. *et al.* (2014) 'Proteomic profiling of autophagosome cargo in *Saccharomyces cerevisiae*', *PloS One*, 9(3), p. e91651. doi: 10.1371/journal.pone.0091651.

- Swatek, K. N. and Komander, D. (2016) 'Ubiquitin modifications', *Cell Research*, 26(4), pp. 399–422. doi: 10.1038/cr.2016.39.
- Tanaka, T. *et al.* (2003) 'Regulation of the NEDD8 Conjugation System by a Splicing Variant, NUB1L', *Journal of Biological Chemistry*, 278(35), pp. 32905–32913. doi: 10.1074/jbc.M212057200.
- Tanji, K., Tanaka, T. and Kamitani, T. (2005) 'Interaction of NUB1 with the proteasome subunit S5a', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(1), pp. 116–120. doi: 10.1016/j.bbrc.2005.09.014.
- Tatham, M. H. *et al.* (2001) 'Polymeric chains of SUMO-2 and SUMO-3 are conjugated to protein substrates by SAE1/SAE2 and Ubc9', *The Journal of Biological Chemistry*, 276(38), pp. 35368–35374. doi: 10.1074/jbc.M104214200.
- Terasawa, H. *et al.* (2001) 'Structure and ligand recognition of the PB1 domain: a novel protein module binding to the PC motif', *The EMBO journal*, 20(15), pp. 3947–3956. doi: 10.1093/emboj/20.15.3947.
- Thurston, T. L. M. *et al.* (2009) 'The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria', *Nature Immunology*, 10(11), pp. 1215–1221. doi: 10.1038/ni.1800.
- Tian, Y. *et al.* (2010) 'C. elegans screen identifies autophagy genes specific to multicellular organisms', *Cell*, 141(6), pp. 1042–1055. doi: 10.1016/j.cell.2010.04.034.
- Tooze, J. *et al.* (1990) 'In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome', *The Journal of Cell Biology*, 111(2), pp. 329–345. doi: 10.1083/jcb.111.2.329.
- Tóth, M. L. *et al.* (2007) 'Influence of autophagy genes on ion-channel-dependent neuronal degeneration in *Caenorhabditis elegans*', *Journal of Cell Science*, 120(Pt 6), pp. 1134–1141. doi: 10.1242/jcs.03401.
- Tsuboyama, K. *et al.* (2016) 'The ATG conjugation systems are important for degradation of the inner autophagosomal membrane', *Science*, 354(6315), pp. 1036–1041. doi: 10.1126/science.aaf6136.
- Tsukada, M. and Ohsumi, Y. (1993) 'Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*', *FEBS letters*, 333(1–2), pp. 169–174. doi: 10.1016/0014-5793(93)80398-e.
- Tumbarello, D. A. *et al.* (2015) 'The Autophagy Receptor TAX1BP1 and the Molecular Motor Myosin VI Are Required for Clearance of *Salmonella Typhimurium* by Autophagy', *PLoS pathogens*, 11(10), p. e1005174. doi: 10.1371/journal.ppat.1005174.
- Tuttle, D. L. and Dunn, W. A. (1995) 'Divergent modes of autophagy in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*', *Journal of Cell Science*, 108 (Pt 1), pp. 25–35.
- Tuttle, D. L., Lewin, A. S. and Dunn, W. A. (1993) 'Selective autophagy of peroxisomes in

methylotrophic yeasts', *European Journal of Cell Biology*, 60(2), pp. 283–290.

Uemura, T. *et al.* (2014) 'A cluster of thin tubular structures mediates transformation of the endoplasmic reticulum to autophagic isolation membrane', *Molecular and Cellular Biology*, 34(9), pp. 1695–1706. doi: 10.1128/MCB.01327-13.

Uytterhoeven, V. *et al.* (2015) 'Hsc70-4 Deforms Membranes to Promote Synaptic Protein Turnover by Endosomal Microautophagy', *Neuron*, 88(4), pp. 735–748. doi: 10.1016/j.neuron.2015.10.012.

Vaites, L. P. *et al.* (2018) 'Systematic Analysis of Human Cells Lacking ATG8 Proteins Uncovers Roles for GABARAPs and the CCZ1/MON1 Regulator C18orf8/RMC1 in Macroautophagic and Selective Autophagic Flux', *Molecular and Cellular Biology*, 38(1). doi: 10.1128/MCB.00392-17.

van der Veen, A. G. and Ploegh, H. L. (2012) 'Ubiquitin-like proteins', *Annual Review of Biochemistry*, 81, pp. 323–357. doi: 10.1146/annurev-biochem-093010-153308.

Veenhuis, M. *et al.* (1983) 'Degradation and turnover of peroxisomes in the yeast *Hansenula polymorpha* induced by selective inactivation of peroxisomal enzymes', *Archives of Microbiology*, 134(3), pp. 193–203. doi: 10.1007/bf00407757.

Velikkakath, A. K. G. *et al.* (2012) 'Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets', *Molecular Biology of the Cell*, 23(5), pp. 896–909. doi: 10.1091/mbc.E11-09-0785.

Vertegaal, A. C. O. (2010) 'SUMO chains: polymeric signals', *Biochemical Society Transactions*, 38(Pt 1), pp. 46–49. doi: 10.1042/BST0380046.

Walters, K. J. *et al.* (2002) 'Structural studies of the interaction between ubiquitin family proteins and proteasome subunit S5a', *Biochemistry*, 41(6), pp. 1767–1777. doi: 10.1021/bi011892y.

Wang, H. *et al.* (1999) 'GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors and the cytoskeleton', *Nature*, 397(6714), pp. 69–72. doi: 10.1038/16264.

Wang, Hanzhi *et al.* (2015) 'GABARAPs regulate PI4P-dependent autophagosome:lysosome fusion', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 112(22), pp. 7015–7020. doi: 10.1073/pnas.1507263112.

Wang, Huan *et al.* (2015) 'Induction of autophagy through the activating transcription factor 4 (ATF4)-dependent amino acid response pathway in maternal skeletal muscle may function as the molecular memory in response to gestational protein restriction to alert offspring to maternal nutrition', *The British Journal of Nutrition*, 114(4), pp. 519–532. doi: 10.1017/S0007114515002172.

Wang, J., Cai, S. and Chen, Y. (2010) 'Mechanism of E1-E2 interaction for the inhibition of Ubl adenylation', *The Journal of Biological Chemistry*, 285(43), pp. 33457–33462. doi: 10.1074/jbc.M110.135582.

- Wang, L. *et al.* (2014) ‘Inhibition of p53 deSUMOylation exacerbates puromycin aminonucleoside-induced apoptosis in podocytes’, *International Journal of Molecular Sciences*, 15(11), pp. 21314–21330. doi: 10.3390/ijms151121314.
- Wang, Y. *et al.* (2016) ‘Kinetics and specificity of paternal mitochondrial elimination in *Caenorhabditis elegans*’, *Nature Communications*, 7, p. 12569. doi: 10.1038/ncomms12569.
- Watanabe, Y. *et al.* (2010) ‘Selective transport of alpha-mannosidase by autophagic pathways: structural basis for cargo recognition by Atg19 and Atg34’, *The Journal of Biological Chemistry*, 285(39), pp. 30026–30033. doi: 10.1074/jbc.M110.143545.
- Watkins, J. F. *et al.* (1993) ‘The *Saccharomyces cerevisiae* DNA repair gene RAD23 encodes a nuclear protein containing a ubiquitin-like domain required for biological function’, *Molecular and Cellular Biology*, 13(12), pp. 7757–7765. doi: 10.1128/mcb.13.12.7757.
- Wei, Y. *et al.* (2017) ‘Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor’, *Cell*, 168(1–2), pp. 224–238.e10. doi: 10.1016/j.cell.2016.11.042.
- Wei, Y. *et al.* (2018) ‘Origin of the Autophagosome Membrane in Mammals’, *BioMed Research International*, 2018, p. 1012789. doi: 10.1155/2018/1012789.
- Weidberg, H. *et al.* (2010) ‘LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis’, *The EMBO Journal*, 29(11), pp. 1792–1802. doi: 10.1038/emboj.2010.74.
- Welchman, R. L., Gordon, C. and Mayer, R. J. (2005) ‘Ubiquitin and ubiquitin-like proteins as multifunctional signals’, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6(8), pp. 599–609. doi: 10.1038/nrm1700.
- Wesch, N., Kirkin, V. and Rogov, V. V. (2020) ‘Atg8-Family Proteins-Structural Features and Molecular Interactions in Autophagy and Beyond’, *Cells*, 9(9). doi: 10.3390/cells9092008.
- Wijdeven, R. H. *et al.* (2016) ‘Cholesterol and ORP1L-mediated ER contact sites control autophagosome transport and fusion with the endocytic pathway’, *Nature Communications*, 7(1), p. 11808. doi: 10.1038/ncomms11808.
- Wild, P. *et al.* (2011) ‘Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts *Salmonella* growth’, *Science (New York, N.Y.)*, 333(6039), pp. 228–233. doi: 10.1126/science.1205405.
- Wilkinson, C. R. *et al.* (2001) ‘Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains’, *Nature Cell Biology*, 3(10), pp. 939–943. doi: 10.1038/ncb1001-939.
- Wilkinson, D. S. *et al.* (2015) ‘Phosphorylation of LC3 by the Hippo kinases STK3/STK4 is essential for autophagy’, *Molecular cell*, 57(1), pp. 55–68. doi: 10.1016/j.molcel.2014.11.019.
- Wilkinson, S. (2020) ‘Emerging Principles of Selective ER Autophagy’, *Journal of Molecular Biology*, 432(1), pp. 185–205. doi: 10.1016/j.jmb.2019.05.012.
- Wirth, M. *et al.* (2020) ‘Ubiquitination and Ubiquitin-Like Modifications in Multiple Myeloma:

Biology and Therapy', *Cancers*, 12(12). doi: 10.3390/cancers12123764.

Wu, D. *et al.* (2012) 'Intestinal cell kinase (ICK) promotes activation of mTOR complex 1 (mTORC1) through phosphorylation of Raptor Thr-908', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(15), pp. 12510–12519. doi: 10.1074/jbc.M111.302117.

Wu, F. *et al.* (2012) 'Differential Function of the Two Atg4 Homologues in the Aggrephagy Pathway in *Caenorhabditis elegans*', *The Journal of Biological Chemistry*, 287(35), pp. 29457–29467. doi: 10.1074/jbc.M112.365676.

Wu, F. *et al.* (2015) 'Structural Basis of the Differential Function of the Two *C. elegans* Atg8 Homologs, LGG-1 and LGG-2, in Autophagy', *Molecular Cell*, 60(6), pp. 914–929. doi: 10.1016/j.molcel.2015.11.019.

Xia, Z.-P. *et al.* (2009) 'Direct activation of protein kinases by unanchored polyubiquitin chains', *Nature*, 461(7260), pp. 114–119. doi: 10.1038/nature08247.

Xie, Z., Nair, U. and Klionsky, D. J. (2008) 'Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation', *Molecular Biology of the Cell*, 19(8), pp. 3290–3298. doi: 10.1091/mbc.e07-12-1292.

Xu, J. *et al.* (2006) 'Solution structure of Urm1 and its implications for the origin of protein modifiers', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(31), pp. 11625–11630. doi: 10.1073/pnas.0604876103.

Yamaguchi, M. *et al.* (2018) 'Atg7 Activates an Autophagy-Essential Ubiquitin-like Protein Atg8 through Multi-Step Recognition', *Journal of Molecular Biology*, 430(3), pp. 249–257. doi: 10.1016/j.jmb.2017.12.002.

Yamamoto, H. *et al.* (2012) 'Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation', *The Journal of Cell Biology*, 198(2), pp. 219–233. doi: 10.1083/jcb.201202061.

Yamano, K. *et al.* (2014) 'Mitochondrial Rab GAPs govern autophagosome biogenesis during mitophagy', *eLife*, 3, p. e01612. doi: 10.7554/eLife.01612.

Yang, S.-H. and Sharrocks, A. D. (2004) 'SUMO promotes HDAC-mediated transcriptional repression', *Molecular Cell*, 13(4), pp. 611–617. doi: 10.1016/s1097-2765(04)00060-7.

Yang, Z. and Klionsky, D. J. (2010) 'Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation', *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), pp. 124–131. doi: 10.1016/j.ceb.2009.11.014.

Yokota, S. *et al.* (1993) 'Formation of autophagosomes during degradation of excess peroxisomes induced by di-(2-ethylhexyl)phthalate treatment. II. Immunocytochemical analysis of early and late autophagosomes', *European Journal of Cell Biology*, 62(2), pp. 372–383.

Zatloukal, K. *et al.* (2002) 'p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases', *The American Journal of Pathology*, 160(1), pp. 255–263. doi:

10.1016/S0002-9440(10)64369-6.

Zhang, D. *et al.* (2015) 'Follicle-stimulating hormone promotes age-related endometrial atrophy through cross-talk with transforming growth factor beta signal transduction pathway', *Aging Cell*, 14(2), pp. 284–287. doi: 10.1111/accel.12278.

Zhang, M. *et al.* (2017) 'UBX domain-containing proteins are involved in lipid homeostasis and stress responses in *Pichia pastoris*', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 90, pp. 136–144. doi: 10.1016/j.biocel.2017.08.006.

Zhang, X. and Chen, X.-L. (2021) 'The emerging roles of ubiquitin-like protein Urm1 in eukaryotes', *Cellular Signalling*, 81, p. 109946. doi: 10.1016/j.cellsig.2021.109946.

Zhang, Y. *et al.* (2009) 'SEPA-1 mediates the specific recognition and degradation of P granule components by autophagy in *C. elegans*', *Cell*, 136(2), pp. 308–321. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.022.

Zhao, C. *et al.* (2004) 'The UbcH8 ubiquitin E2 enzyme is also the E2 enzyme for ISG15, an IFN-alpha/beta-induced ubiquitin-like protein', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(20), pp. 7578–7582. doi: 10.1073/pnas.0402528101.

Zheng, N. and Shabek, N. (2017) 'Ubiquitin Ligases: Structure, Function, and Regulation', *Annual Review of Biochemistry*, 86, pp. 129–157. doi: 10.1146/annurev-biochem-060815-014922.

Zheng, Y. T. *et al.* (2009) 'The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway', *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, 183(9), pp. 5909–5916. doi: 10.4049/jimmunol.0900441.

Zhou, J. *et al.* (2018) 'iUUCD 2.0: an update with rich annotations for ubiquitin and ubiquitin-like conjugations', *Nucleic Acids Research*, 46(D1), pp. D447–D453. doi: 10.1093/nar/gkx1041.

Titre : Etude des fonctions des protéines « ubiquitin-like » GABARAP/LGG-1 via l'ingénierie *CRISPR-Cas9* au cours de l'autophagie et du développement chez *Caenorhabditis elegans*

Mots clés : Autophagie, Atg8, GABARAP, LC3, ubiquitin-like, *Caenorhabditis elegans*

Résumé : La macroautophagie est un processus de dégradation important pour le maintien de l'homéostasie cellulaire permettant le recyclage des composants cytoplasmiques par des vésicules à double membranes : les autophagosomes. La protéine « ubiquitin-like » Atg8 possède des rôles multiples au cours de ce processus. Ce mécanisme est conservé dans le règne eucaryote. Chez les mammifères six homologues d'atg8 existent (LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAPL1, et GABARAPL2) et ont des rôles multiples au cours de ce processus dans l'initiation, la reconnaissance du cargo, la fermeture des autophagosomes et la fusion avec le compartiment lytique. Ces protéines existent sous plusieurs formes, le précurseur (forme P) est clivé en une protéine cytosolique (forme I), qui, via un système de conjugaison à un lipide, est localisée à la membrane (forme II). Notre recherche se concentre sur LGG-1, l'homologue de la famille GABARAP, essentielle à la viabilité et au développement du nématode *Caenorhabditis elegans*.

Afin de déterminer les différents rôles de GABARAP/LGG-1, nous avons généré des mutants par CRISPR/CAS9 permettant d'exprimer soit uniquement le précurseur soit la forme mature cytosolique, soit les deux. J'ai pu montrer que la glycine116 de LGG-1 est essentielle pour le clivage du précurseur et la localisation de LGG-1 aux membranes des autophagosomes. Nos résultats montrent qu'une forme non lipidable de LGG-1 est suffisante pour maintenir à la fois l'autophagie sélective au cours du développement (mitophagie et agréphagie) et l'autophagie globale physiologique au cours du vieillissement, ou induite suite à un stress nutritionnel. Nos résultats suggèrent que la fonction majeure de la forme clivée mature interviendrait dans des étapes précoces d'induction du processus.

Title : Study of ubiquitin-like proteins GABARAP/LGG-1 functions by CRISPR-Cas9 engineering during autophagy and development in *Caenorhabditis elegans*

Keywords Autophagy, Atg8, GABARAP, LC3, ubiquitin-like, *Caenorhabditis elegans*

Abstract: Autophagy is an important recycling process for the maintenance of cell homeostasis, allowing the recycling of cytoplasmic components. This mechanism is conserved among eukaryotes. In mammals, six homologs of atg8 exist (LC3A, LC3B, LC3C, GABARAP, GABARAPL1, GABARAPL2) and have multiple roles during this process, in the initiation, the recognition of cargo, the closure of autophagosomes and the fusion with the lytic compartment. These proteins exist in several forms, the precursor (form P) is cleaved into a cytosolic protein (form I) which, via a lipid conjugation system, is localized to the membrane (form II). Our research focuses on LGG-1, the homologue of the GABARAP family, essential for the viability and the development of the nematode *Caenorhabditis elegans*.

In order to determine the different roles of GABARAP/LGG-1, we generated mutants by CRISPR/CAS9, allowing expression of only the precursor, only the mature cytosolic form, or both. We were able to show that glycine116 of LGG-1 is essential for an efficient precursor cleavage and the localization of LGG-1 to autophagosome membranes. Our results show that a non-lipidable form of LGG-1 is sufficient to maintain both selective autophagy during the development (mitophagy and aggregation), and the physiological global autophagy during aging, or induced following a nutritional stress. Our results suggest that the major function of the mature cleaved form is involved in the early induction stages of the process.