

Ecole Doctorale Des Sciences de la Vie et de la Santé (ED414)

THÈSE

Présentée par **Johan Arnold**

Soutenue publiquement le **1 juin 2015**

Pour obtenir le grade de **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline : **Sciences de la Vie et de la Santé**

Spécialité : **Immunologie**

**Implication de la macroautophagie des lymphocytes dans la
réponse humorale normale et pathologique**

THÈSE dirigée par :

Madame le Professeur Sylviane Muller

Directrice de thèse

CNRS UPR3572, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Immunologie et Chimie Thérapeutique – Strasbourg

Jury :

Monsieur le Professeur Christian Münz

Rapporteur Externe

Viral Immunobiology, University of Zurich, Institute of Experimental Immunology

Monsieur le Professeur Moncef Zouali

Rapporteur Externe

Inserm UMR-S 606, Université Paris Diderot, Centre Viggo Peterson, Hôpital Lariboisière

Monsieur le Professeur Jean-Luc Imler

Rapporteur Interne

CNRS UPR9022, Université de Strasbourg, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire

Remerciements

Je tiens à remercier Messieurs les Professeur Christian Münz et Professeur Moncef Zouali de m'avoir fait l'honneur d'être rapporteurs de cette thèse. Je vous remercie de l'intérêt que vous avez porté à juger mon travail.

Je remercie le Professeur Jean-Luc Imler d'avoir accepté d'être examinateur de ma thèse. Je profite également de ces quelques lignes pour vous remercier de m'avoir intégré à votre équipe lors de mon stage de Master 1 et m'avoir quelque peu « lancé » dans le monde scientifique.

Puis je remercie Madame le Professeur Sylviane Muller, Directrice de l'Unité de Recherche « Immunologie et Chimie Thérapeutiques » et directrice de thèse pour m'avoir permis d'effectuer mon stage de Master 2 et ma thèse au sein de son équipe. Son énergie et son implication ont fortement contribué à l'évolution de mon travail et de ma démarche scientifique tout au long de ces années. Le contexte scientifique de son équipe a été très formateur. Je vous remercie également de m'avoir permis de présenter régulièrement mes résultats dans divers congrès.

J'exprime toute ma gratitude à Frédéric Gros, qui a été mon « mentor » pendant toutes ces années, et pour m'avoir intégré si naturellement et spontanément dans l'équipe, pour son soutien au quotidien et pour toute l'attention qu'il m'a manifestée tout au long de ma thèse. Frédéric, tu m'as transmis, jour après jour, tous les outils théoriques nécessaires à l'accomplissement de mon projet et je te remercie pour ton aide précieuse quant à la réalisation des mes expériences pratiques. Tu m'as également transmis une passion pour l'immunologie et la recherche en générale dès le moment où je t'ai eu comme enseignant d'immunologie en TP. Ta confiance en moi et tes précieux conseils m'ont permis de m'épanouir tant sur le plan scientifique que sur le plan humain. Ta réflexion scientifique, tes conseils avisés et ton efficacité m'ont, sans conteste, permis de réaliser ces travaux. Merci pour la formation que tu m'as apportée et je terminerais sur une touche plus légère : merci de m'avoir donné le goût de la « bonne blague ».

Je tiens également à remercier Monique, Delphine, Astrid et Hayet pour toute l'aide et les conseils que vous m'avez apportés durant toute ma thèse.

Je tiens également à remercier le bureau des chimistes, Julie, Olga, Mélanie, Cécile, Maxime, Laura, Isabella, Adriano, Cinzia, Quyen et Diane... Je remercie Matthieu pour m'avoir fait découvrir les fêtes « foraines » ! Je remercie également toute l'équipe du 153 : « mon » bureau, Bai hu, Fengjuan, en passant par BenJ, avec qui j'aime tant parler Russe et de paternité (bienvenue à la petite Alice !); Maud, qui sait toujours bien placer ses mots ; Nico, qui est d'une grande aide lorsque l'on veut acheter un Mac ; et Carole... Merci pour votre soutien, pour l'ambiance que vous avez apportée au laboratoire, nos fous rires et toutes nos discussions sérieuses, ou non, mais qui font tellement de bien.

Je remercie Isabelle (je te remercie plus que tout de m'avoir présenté ma moitié) et Christian qui m'ont toujours encadré dans les tâches administratives !

Je tiens également à remercier tous les membres de l'équipe du Pr Thierry Martin pour leur aide apportée sur le plan clinique, mais également scientifique au sens large. Je remercie Jean-Louis, Pauline, Anne-Sophie, Anne-Marie, Anne, Delphine, Dana, Sophie, Mickaël, Vincent et François pour leur soutien et bonne humeur.

J'adresse une pensée toute particulière à Marion Decossas qui m'a transmis ses connaissances et m'a guidé dans la découverte de la microscopie électronique. Elle m'a communiqué sa passion et son savoir « macroscopique » et a ainsi contribué à mon « ouverture » sur des techniques nouvelles.

Je souhaite faire une spéciale dédicace à Jean-Daniel Fauny alias « Doc » pour m'avoir enseigné,

guidé et aidé dans mes expériences de microscopie photonique et traitement d'image. Tu as toujours été d'un grand conseil tout au long de ma thèse. Je n'oublierai pas les McDo tard dans la nuit durant les manips de LIVE !

Je n'oublie pas les deux paires de compères de : l'IGBMC : Marc et Pascal ; et de l'IBMP : Jérôme et Matthieu.

Je tiens également à remercier toute l'équipe pédagogique de l'EU « Technique biologique » avec laquelle j'ai pu faire mes premiers pas d'enseignant, en particulier Joseph et Pascaline avec qui j'ai eu le plaisir de faire les TPs.

Je tiens à remercier tous les gens de la bibliothèque (la bibliothèque, petit endroit coquet où j'ai commencé mon Master 2 et où j'ai terminé en écrivant ma thèse, dans l'aquarium !) qui ont vu ce manuscrit s'épaissir. Je remercie également tous mes stagiaires. J'en profite pour remercier tout particulièrement Florent, devenu grand ! Je te remercie d'avoir été là à la fin de ma thèse.

Je tiens également à remercier Jean-Louis, Pauline, Hélène D., Fanny, Chris, Vincent, Hélène DJ., pour leurs conseils et leur aide tout au long de ma thèse.

Je remercie également les gens du deuxième étage, Stan, Myriam, Carine... avec une place particulière pour Adrien, avec qui, une seule poignée de main suffit pour se comprendre !

Je tiens également à remercier tous mes amis !

Je remercie mon équipe de foot qui a été un exutoire au cours de ma thèse. Je pense notamment à mon président, mon entraîneur et plus particulièrement mon entraîneur gardien, Guy, ainsi que tous mes potes : Cyril, Yves, David, Moco, Thomas, Franck, Dili, Kévin, Juju, Oléko et les autres ! Je remercie également Fred et Salim pour les nombreux repas... sushis ! Je remercie également les belles rencontres, tout le groupe de « Plaine » qui m'apporte joie et bonne humeur, des amis chers et proches sur qui l'on peut compter. Je serais maintenant plus tranquille pour me « posey » un peu, un « duck face » et c'est parti pour une soirée « OKLM » !

Je remercie Sophie et François pour leur bonne humeur et les rendez-vous sportifs !

Puis je remercie tout particulièrement Carole. Tu as réussi à me supporter durant 5 ans comme voisin de bureau. Ton optimisme permanent m'a aidé à ne jamais baisser les bras. Je te remercie pour toute l'aide que tu m'as apportée (je me souviens des longues journées de révision de Master1). Je te souhaite plein de bonheur pour ton post-Doc, on compte bien venir te voir ! (Oui, d'accord, je l'avoue, peut-être que tu vas me manquer... !). Dans le même paragraphe, je tiens à remercier Diane ! Ta bonne humeur constante, ton écoute et ton sens de l'humour (tu n'es plus novice !) a rendu mes journées au labo des plus agréables ! Ce que je retiens le plus, c'est qu'on aura fait un beau duo tous les deux ! Je te souhaite bon courage pour la fin de la thèse, bonne chance pour la suite et surtout beaucoup de bonheur. Sachez toutes les deux que notre équipe du dimanche soir va encore vivre de belles aventures... En tous cas, je l'espère !

Je remercie également Olivier pour les franches rigolades.

Je tiens à remercier Patricia et Daniel pour leur soutien. Je remercie également Laurianne et Albin pour leur encouragement et leur bonne humeur.

Je tiens à remercier ma mamie, toute ma famille et plus particulièrement mes parents qui me soutiennent depuis toujours. Merci de m'avoir fait confiance, d'avoir toujours accepté mes choix et de m'avoir encouragé dans ce que j'ai entrepris. Je vous remercie d'avoir toujours essayé de

comprendre ce que je faisais réellement au « labo » et merci pour votre soutien au quotidien et pour votre présence, tout simplement. Je remercie également mon frère et Joëlle que j'ai plaisir de retrouver à la maison, sur un vélo ou dans des runnings extrêmes. Je pense également aux bons moments passés, sur les chantiers (par ex : à Unville), rares... certes, mais bons ! Ou tout simplement lors de nos week-ends escapades ! C'est toujours un grand bonheur de partager des moments en famille ! Vous avez participé activement à la réussite de ma thèse.

Idem à ma biologiste préférée, Léa, d'être présente dans ma vie. Grâce à toi j'ai pu éviter la honte d'avoir écrit un manuscrit de thèse bourré de fautes d'orthographe. Merci pour tout le temps que tu as pris pour lire et relire les nombreuses pages qu'il contient. Merci pour tout ce que tu m'apportes, merci de m'avoir suivi dans mes projets, soutenu durant cette fin de thèse et de continuer à le faire.

TABLE DES MATIÈRES

ABRÉVIATIONS

LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

INTRODUCTION

1	LA MACROAUTOPHAGIE ET SA MACHINERIE MOLECULAIRE	3
1.1	LES VOIES CATABOLIQUES DE LA CELLULE	3
1.1.1	DECOUVERTE DES VOIES LYSOSOMALES ET PEROXYSOMALES	3
1.1.2	LE CHOIX ENTRE PROTEASOME ET AUTOPHAGIE POUR LA PROTEOLYSE	6
1.1.3	LE LYSOSOME : ACTEUR DE L'HETEROPHAGIE ET DE L'AUTOPHAGIE	7
1.1.4	LES TROIS FORMES D'AUTOPHAGIE	8
1.1.4.1	L'autophagie assistée par les chaperonnes	8
1.1.4.2	La microautophagie	9
1.1.4.3	La macroautophagie	10
1.2	LA MACHINERIE AUTOPHAGIQUE	11
1.2.1	APG, DECOUVERTE DE LA PREMIERE PROTEINE IMPLIQUEE DANS L'AUTOPHAGIE	11
1.2.2	LES PHASES DE FORMATION DE L'AUTOPHAGOSOME	13
1.2.2.1	L'initiation	13
1.2.2.2	Régulation de l'initiation de l'autophagie	18
1.2.2.3	Nucléation, recrutement de la membrane autophagique et formation du phagophore	22
1.2.2.4	Elongation, deux systèmes de conjugaison liés à l'ubiquitine.	26
1.2.2.5	La maturation	29
1.2.2.6	Quantification du phénomène autophagique	35
1.2.2.7	Autophagie non canonique	37
2	FONCTIONS DE L'AUTOPHAGIE DANS L'HOMEOSTASIE CELLULAIRE	40
2.1	DEGRADATION DES AGREGATS PROTEIQUES PAR L'AUTOPHAGIE	40
2.1.1	NATURE ET ORGANISATION DES AGREGATS PROTEIQUES	40
2.1.2	L'AGGREPHAGIE	42

2.2	L'ORGANELLOPHAGIE	45
2.2.1	LA MITOPHAGIE	46
2.2.2	LA PEXOPHAGIE	48
2.2.3	LA LIPOPHAGIE	49
2.2.4	LA NUCLEOPHAGIE	50
2.2.5	LA LYSOPHAGIE	51
2.2.6	LA RETICULOPHAGIE	51
2.2.7	LA RIBOPHAGIE	52
2.3	LES AUTRES FONCTIONS DES PROTEINES ATGS	52
2.3.1	ROLE NON-AUTOPHAGIQUE DE LA PROTEINE LC3	52
2.3.1.1	Interaction de la protéine LC3 avec les GTPases	52
2.3.1.2	La forme LC3 non lipidée intervient dans la réplication virale	53
2.3.1.3	La forme non lipidée d'Atg8 régule la fusion de la vacuole chez la levure	53
2.3.2	LES FONCTIONS NON-AUTOPHAGIQUES D'ATG5 ET DU COMPLEXE ATG5-ATG12	54
2.3.3	ROLE DES PROTEINES ATGS DANS LES MECANISMES DE SECRETION	55
2.3.4	LES PROTEINES ATGS ET LA REGULATION DE L'APOPTOSE	57
2.3.5	CONTROLE DE LA TRANSCRIPTION DE GENES	58
3	L'AUTOPHAGIE ET L'IMMUNITE	59
3.1	AUTOPHAGIE, IMMUNITE INNEE ET INFLAMMATION	59
3.1.1	AUTOPHAGIE ET ELIMINATION DES MICROORGANISMES	59
3.1.1.1	La xénophagie	59
3.1.1.2	La xénophagie et les SLRs	61
3.1.1.3	L'autophagie et la phagocytose	61
3.1.1.4	L'autophagie et la reconnaissance via les PRRs	62
3.1.2	RELATION ENTRE INFLAMMATION ET AUTOPHAGIE	67
3.1.2.1	L'autophagie et l'inflammation liée aux mitochondries	68
3.1.2.2	L'autophagie et l'inflammasome	69
3.1.2.3	Cytokines et régulation de l'autophagie	71
3.1.3	L'AUTOPHAGIE ET L'INFLAMMATION CHRONIQUE	72
3.1.3.1	Maladie de Crohn	72
3.1.3.2	Le rôle de l'autophagie dans l'inflammation associée au syndrome métabolique	75
3.2	AUTOPHAGIE ET PRESENTATION ANTIGENIQUE	78
3.2.1	L'AUTOPHAGIE ET LA PRESENTATION PAR LE CMH I	78
3.2.2	LA PRESENTATION ANTIGENIQUE PAR LES MOLECULES DU CMH II	80

3.3	AUTOPHAGIE ET IMMUNITE ADAPTATIVE	84
3.3.1	L'AUTOPHAGIE ET LA DIFFERENCIATION DES PRECURSEURS LYMPHOCYTAIRES	84
3.3.2	L'AUTOPHAGIE ET LA BIOLOGIE DES LYMPHOCYTES T	85
3.3.2.1	L'autophagie dans le développement des thymocytes	85
3.3.2.2	L'autophagie et l'homéostasie des cellules T	86
3.3.3	LES LYMPHOCYTES B ET L'AUTOPHAGIE	90
3.4	L'AUTOPHAGIE ET L'AUTO-IMMUNITE	94
3.4.1	DEREGULATION DE L'AUTOPHAGIE DANS LES CELLULES NON-HEMATOPOÏETIQUES	94
3.4.2	AUTOPHAGIE, AUTO-IMMUNITE ET IMMUNITE INNEE	95
3.4.3	AUTOPHAGIE ET TOLERANCE IMMUNITAIRE	96
3.4.4	AUTOPHAGIE DES LYMPHOCYTES ET AUTO-IMMUNITE	96
3.4.5	AUTOPHAGIE, AUTO-IMMUNITE ET PRESENTATION ANTIGENIQUE	97
3.5	L'AUTOPHAGIE ET LE LED	98

RÉSULTATS

1	PUBLICATION 1	103
1.1	AVANT-PROPOS	103
1.2	MACROAUTOPHAGY IS DEREGULATED IN MURINE AND HUMAN LUPUS T LYMPHOCYTES	105
1.3	COMMENTAIRES	122
2	PUBLICATION 2	125
2.1	AVANT-PROPOS	125
2.2	AUTOPHAGY IS DISPENSABLE FOR B CELL DEVELOPMENT BUT ESSENTIAL FOR HUMORAL AUTOIMMUNE RESPONSES	127
2.3	COMMENTAIRES	151
3	PUBLICATION 3	153
3.1	AVANT-PROPOS	153
3.2	ATG5 IS REQUIRED FOR THE RELOCALIZATION OF LYSOSOMES AFTER B CELL RECEPTOR ENGAGEMENT AND FOR THE SUBSEQUENT PRESENTATION OF IMMOBILIZED ANTIGENS	154
3.3	COMMENTAIRES	176

CONCLUSIONS ET DISCUSSION

1	HISTORIQUE DE MA THESE	181
2	CONCLUSION ET DISCUSSION GENERALE	186

ANNEXE

1	PUBLICATION 4	195
1.1	AVANT-PROPOS	195
1.2	AUTOPHAGY IN CHRONIC INFLAMMATION	196

BIBLIOGRAPHIE

ABRÉVIATIONS

A

ADN : Acide DéoxyriboNucléique
Ag : Antigène
AMBRA1 : Activating Molecule in Beclin1-Related Autophagy
AMPK : Adenosine Monophosphate Protein Kinase
ARN : Acide RiboNucléique m : messenger
 sb : simple
brin
ATF4 : Activating Transcription Factor 4
ATG : AuTophagy-related Gene
ATP : Adénosine TriPhosphate

B

BCR : B Cell Receptor
BNIP : BCl-2 : adenovirus E1B 19 kDa protein-Interacting Protein
BVC : Brucella-Containing-Vacuole

C

C57BL/6 : C57 Black 6
CIIM : Compartiment du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II
C57BL/6 : Lignée murine
CARD : Caspase Activation and Recruitment Domain
CD : Cluster of differentiation, Complement receptor 2
CDS : Cytosolic DNA Sensors
CG : Centre Germinatif
CHO : Cellules Ovariennes de Hamster chinois
CHOP : C/EBP Homologous Protein
CLP : Précurseur Lymphoïde Commun
CMA : Autophagie Médiée par les Chaperonnes
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigènes
cTEC : Cellule Epithéliale Thymique du cortex
CVT : Cytoplasm Vacuole Targeting

D

DAMP : Danger Associated Molecular Pattern
DC : Cellule Dendritique
DFCP1 : Double FYVE Domain-Containing Protein 1
DISC : Death Inducing Signaling Complex
Dnchc1 : Dynein heavy chain 1 gene

DRAM : Damage Regulated Autophagy Modulator
DSS : Dextran Sulfate de Sodium
E64D : Cysteine protease inhibitor

E

EAE : Encéphalopathie Autoimmune Expérimentale
EBV : Virus Epstein Barr
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinase
ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport

F

FADD : Fas Associated protein with Dead Domain
Fc : Fragment constant
FFA : Free Fatty Acids
FIP : Focal adhesion protein family Interacting Protein of 200 kDa
FoxO1 : Forkhead box protein O1
Foxp3 : Forkhead box protein 3

G

GABARAP : γ -Amino-ButyricAcid Receptor-Associated Protein
GAS : *Streptococcus* de groupe A
GATES : Golgi-Associated ATPases Enhancer
GFP : Green Fluorescent Protein
GsAV : Vacuole contenant une bactérie de type GAS
GTP : Guanosine TriPhosphate
GWAS : Genome Wide Association Study

H

HDAC : Histone DéACétylase
HEK293 : Human Embryonic Kidney 293 cells
HFD : High Fat Diet
HLA : Human Leukocyte Antigen
HMGB1 : High-Mobility Group Protein Box 1
HSC : Cellule Souche Hématopoïétique
HSP : Heat-Shock Protein
HSV : Virus de l'Herpes Simplex

I

IAPP : PolyPeptide de l'Amyloïde des Ilots
IFN-I : InterFéroN de type I

IKK : IκB Kinase
IL : Interleukine
IP3 : Inositol 1,4,5-triphosphate
IPS1 : Interferon B promoter stimulator 1
IRF : Interferon Regulatory Factor
IRGM : Immunity-related GTPase family M protein

J

JNK : Jun N-terminal Kinase

L

LAMP : Protéine Membranaire Associée au Lysosome
LAP : LC3-Associated Protein
LB : Lymphocyte B
LC3 : microtubule-associated protein Light Chain 3
LDL : Low density Lipoprotein
LED : Lupus Erythémateux Disséminé
LIMP : Protéine Membranaire Intégrale du Lysosome
LPS : LipoPolySaccharide
LT : Lymphocyte T

M

MAM : Membrane du RE associée aux Mitochondries
MAMP : Microbial Associated Molecular Pattern
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
Mb1 : Gène codant pour l'Igα du BCR
MDA5 : Melanoma Differentiation Associated Protein 5
MDP : MurylDiPeptide
MEF : Fibroblastes embryonnaires murins
Mfns : Mitofusine
MHV : Virus Hépatique Murin
mLST8 : mammalian lethal with sec-13 protein 8
MRL^{*lpr/lpr*} : Murphy Roths Large
mTEC : Cellule Epithéliale Thymique de la médulla
MTOC : Centre Organisateur des MicroTubules
mTOR : mammalian Target of Rapamycin
MVB : Corps Multivésiculaires

N

NET : Neutrophile Extracellular Trap
NK : Natural Killer
NLR : NOD Like Receptors

NOD : Nucleotide Oligomerization Domain receptors

NRB1 : Neighbour of BRCA gene 1

NZB : New Zealand Black

NZW : New Zealand White

NZB/W : New Zealand Black and White

P

PAS : Structure Pré-Autophagosomale
PBMC : Cellules mononucléées du sang périphérique
PC : Plasmocyte
pDC : Cellule Dendritique plasmacytoïde
PDK : Pyruvate Deshydrogenase Kinase
PE : Phosphatidylethanolamine
PERK : Eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3
PI3P : PhosphatidyInositol 3 Phosphate
PI3K : PhosphatidyInositol 3 kinase de type III
PR : Polyarthrite Rhumatoïde
PRR : Pattern-Recognition Receptor
PYHIN : Pyrin, HIN domain containing family members

R

RAW264.7 : Lignée cellulaire de macrophages murins
RC : Récepteur aux compléments
RE : Réticulum Endoplasmique
RIG-1 : Retinoic acid-Inducible Gene 1
RIPK2 : Sérine-Thréonine Kinase 2
RLR : RIG-1 like receptors
ROS : Reactive Oxygen Species

S

SI : Système Immunitaire
SLR : Sequestosome 1/p62-Like Receptors
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
SQSTM1 : Sequestosome 1
SRAS : Syndrome Respiratoire Aigu Sévère
STX17 : Syntaxine 17

T

TIID : Diabète de Type II
TAK1 : TGF-β-activated Kinase
TEC : Cellule Epithéliale Thymique
TLR : Toll Like Receptor
TEM : Microscopie électronique à transmission
Th : Lymphocyte T helper
TNF : Tumor Necrosis Factor

Treg : Lymphocyte T régulateur

U

UBA : Ubiquitin Associated

ULK : Unc-51-Like Kinase

UVRAG : UV resistance associated gene

V

VPS : Vacuolar Protein Sorting

VSV : Virus de la Stomatite Vésiculaire

W

WASP : Wiskott-Aldrich Syndrome Protein

X

Xbp1 : X-box binding protein 1

TABLE DES FIGURES ET TABLEAUX

Figures

Figure 1 : Les étapes de la formation d'un autophagosome	11
Figure 2 : Formation du phagophore	15
Figure 3 : Rôle du complexe Beclin1-VPS34-VPS15-UVRAG au cours des différentes étapes de l'autophagie	16
Figure 4 : Rôle des protéines p53 et Bcl2 dans l'autophagie	18
Figure 5 : Régulation de l'autophagie par l'AMPK	20
Figure 6 : Senseurs énergétiques et régulation de l'autophagie	21
Figure 7 : Origines des membranes de l'autophagosome	23
Figure 8 : Elongation du phagophore	27
Figure 9 : Maturation du phagophore	31
Figure 10 : Rôle du cytoquelette dans la dynamique de l'autophagie.....	35
Figure 11 : Autophagie sélective.....	45
Figure 12 : Elimination des microorganismes par la machinerie autophagique : la LAP et la xénophagie	60
Figure 13 : Modulation du signal pro-inflammatoire par l'autophagie	66
Figure 14 : Autophagie et inflammasome.....	71
Figure 15 : Apprêtement et présentation de l'antigène sur les molécules du CMH de classe II	81
Figure 16 : Implication de l'autophagie dans le système immunitaire	87
Figure 17 : Présentation de l'antigène par les LB sur les molécules du CMH de classe II.....	92
Figure 18 : Implication prouvées et potentielles de l'autophagie dans les maladies auto-immune	95

Tableaux

Tableau 1 : Rôles non-autophagiques des protéines ATG	54
Tableau 2 : Modèles de souris déficientes pour l'autophagie spécifiquement dans les cellules du système immunitaire	84

INTRODUCTION

Avant-propos

Le système immunitaire (SI) a pour rôle le maintien de l'intégrité de l'organisme. Cette intégrité peut être menacée par des agents infectieux, par une transformation tumorale ou par des lésions mécaniques. Le SI est classiquement divisé en deux compartiments : l'immunité innée et l'immunité adaptative. L'immunité innée est la réponse mise en place immédiatement en cas d'infection ou de lésion, elle est la première ligne de défense de l'organisme contre tout pathogène invasif. Elle est rapide, spécifique à un large spectre de stimuli, et ne génère pas de réponse mémoire. Lors de cette réponse immunitaire, il y a également intervention des composantes solubles de l'immunité innée. Ces molécules solubles sont, par exemple, les protéines de la phase aigüe sécrétées en grande majorité par le foie ; les protéines du complément, ainsi que les chemokines et les cytokines pro-inflammatoires. Une grande variété de cellules est recrutée dans le cadre de cette réponse, telles que les granulocytes (neutrophiles, basophiles, éosinophiles), les cellules NK (« Natural Killer »), les mastocytes et les phagocytes pouvant présenter l'antigène (cellules dendritiques (DC) et macrophages). Cette réponse est basée sur la reconnaissance de motifs moléculaires conservés chez les microorganismes ou de signaux de stress codés par le génome du soi. Le processus de reconnaissance des microorganismes et des signaux de danger endogènes (DAMPs, « danger-associated molecular patterns ») est réalisé par des récepteurs spécifiques appelés « pattern-recognition receptors » (PRRs) qui reconnaissent une grande variété de structures de microorganismes, bien que limitée, initialement connue sous le nom de « pathogen-associated molecular patterns » (PAMPs) (Janeway, 1989) et maintenant appelé plus généralement « microbial-associated molecular patterns » (MAMPs). Les PRRs sont présents à la fois sur les cellules immunitaires et non immunitaires. L'activation des PRRs contrôle le relargage d'un répertoire très diversifié de facteurs de défense de l'hôte contre les pathogènes. Au contraire, l'immunité adaptative apparue chez les premiers vertébrés, permet potentiellement la reconnaissance de tout motif antigénique quelle que soit sa provenance ou sa structure. En effet, les récepteurs de l'immunité adaptative, le récepteur des lymphocytes B (BCR) et T (TCR) sont générés par des mécanismes aléatoires de recombinaison génétique leur conférant une grande diversité de structure et donc de reconnaissance de motifs antigéniques.

L'émergence du SI adaptatif conduit ainsi à un risque inhérent d'auto-immunité, maîtrisé au niveau de l'organisme par des mécanismes dits de tolérance. La tolérance centrale a lieu au niveau de la moelle osseuse pour les lymphocytes B (LBs) et du thymus pour les lymphocytes T (LTs). Dans ces organes, les lymphocytes acquièrent leur récepteur variable à l'antigène. La tolérance centrale a pour but d'éliminer ou de réduire l'activité des lymphocytes exprimant un BCR ou un TCR auto-réactif. La

tolérance périphérique a quant à elle lieu dans les organes lymphoïdes secondaires comme la rate, les ganglions et dans les autres tissus. La reconnaissance de l'antigène par les LBs se fait directement via le BCR. Les LTs sont, quant à eux, activés dans un cadre plus particulier. Le TCR ne peut que reconnaître un peptide antigénique présenté par des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH). La reconnaissance de peptide sur les molécules du CMH II par les LTs CD4+ les active et permet leur différenciation en lymphocytes T « helper » (Th). Cela permet d'orienter la réponse adaptative d'une part vers un versant humorale de par l'engagement d'un dialogue entre les LTs et les LBs. Les lymphocytes Th peuvent d'autre part favoriser dans d'autres circonstances l'activation d'une réponse cellulaire activant les macrophages et les LTs CD8+. La reconnaissance de peptides présentés sur les molécules du CMH I des DC par les LTs CD8+ permet leur activation et leur différenciation en LTs cytotoxiques. Outre sa spécificité de reconnaissance et donc de réponse, l'immunité adaptative est également remarquable pour sa faculté à générer une réponse mémoire. Dans le cas d'une seconde exposition à un même antigène, une réponse mémoire permet une intervention plus rapide et plus efficace des acteurs de l'immunité.

La balance entre la mort et la survie des cellules immunitaires est capitale pour le bon fonctionnement du SI. La régulation de l'apoptose, par exemple, est connue depuis de nombreuses années comme centrale pour la tolérance périphérique. Depuis quelques années, l'autophagie, un mécanisme important dans la régulation de la survie cellulaire, a été identifié comme facteur crucial de l'immunité. Son activité régule à la fois l'immunité innée et adaptative.

L'autophagie est un processus cellulaire initialement décrit chez la levure, favorisant la survie des cellules en condition de stress énergétique, comme par exemple l'appauvrissement du milieu en acides aminés. Ce mécanisme catabolique permet la dégradation par une cellule de ses propres constituants (agrégats protéiques, organites) dans les lysosomes aboutissant à une production rapide d'ATP (adénosine triphosphate) et d'acides aminés. Il existe trois formes principales d'autophagie, à savoir la microautophagie, l'autophagie assistée par des protéines chaperonnes (CMA) et la macroautophagie. Les deux premières permettent la translocation directe de composants cytoplasmiques vers le lysosome. La macroautophagie sera majoritairement évoquée dans la suite de ce manuscrit. Appelée plus simplement « autophagie », elle permet la séquestration de portions de cytoplasme ou d'organelles dans des vésicules à double membrane fusionnant à terme avec les lysosomes. La formation de ces vésicules appelées « autophagosomes » est possible grâce à un ensemble de gènes appelés « autophagy-related genes » (atgs) codant chez les mammifères pour une série de protéines ATGs, orthologues des protéines découvertes chez la levure.

1 La macroautophagie et sa machinerie moléculaire

1.1 Les voies cataboliques de la cellule

1.1.1 Découverte des voies lysosomales et peroxysomales

C'est à la fin des années 1940 que l'explosion des connaissances en biologie cellulaire fut permise par l'isolement des premières lignées cellulaires, dont une encore utilisée de nos jours, la cellule HeLa. La mise au point d'une lignée stable dans le temps et la composition du milieu où elle doit être cultivée a été développée à l'époque par Harry Eagle. Les livres des années 1950, décrivaient encore la cellule animale en tant qu'un « noyau entouré d'une membrane séparée par « quelque chose » encore appelé protoplasme ». Cette « substance gélatineuse » est décrite comme contenant les mitochondries et d'autres types d'inclusions. A cette époque, plusieurs groupes de chercheurs s'intéressent en détail à ces compartiments. Ils utiliseront alors des techniques qui vont révolutionner le monde de la biologie cellulaire. Ces techniques émergentes sont la microscopie électronique (qui connaîtra son apogée dans la deuxième moitié du XX^{ème} siècle) et le fractionnement par centrifugation à haute vitesse. C'est à partir de ce moment que les découvertes des différentes structures contenues dans le protoplasme, de leur activité et de leur fonctionnement commencèrent à émerger.

L'un des grands architectes de cette révolution est Christian De Duve. Après avoir grandi en Belgique, il se passionne pour un thème bien particulier, la découverte du mécanisme d'action de l'insuline. Il développe un intérêt particulier pour le glucose-6-phosphate, impliqué dans le système d'hexokinase des hépatocytes, mécanisme antagoniste de l'action de l'insuline. Il est confronté à son premier problème qui est d'isoler cette phosphatase. Par chance, une équipe dirigée par Albert Claude qui travaille à l'Institut de recherche médicale du Rockefeller Institute à New York, maîtrise la technique de fractionnement par centrifugation à haute vitesse. Ils travaillèrent ensemble sur la séparation des différents composants contenus dans une cellule : le noyau, les mitochondries, le compartiment microsomal (contenant de petites granules) et le cytosol. C. De Duve réalise alors que le glucose-6-phosphate est présent à 95% dans la fraction contenant le compartiment microsomal. Il en tire alors deux conclusions : d'une part, que les membres d'une même population de particules ont une composition biochimique homogène et que d'autre part, chaque enzyme a une localisation subcellulaire unique. Par la suite, d'autres enzymes l'intriguent, comme notamment les phosphatases acides qui ne sont pas enrichies de la même manière dans les différentes fractions. Il émet l'hypothèse que ces enzymes seraient séquestrées derrière une membrane. Ceci pourrait

expliquer pourquoi l'on ne trouve pas ces enzymes en excès dans les différents compartiments. Pour démontrer cette hypothèse, il utilise différents détergents et autres agents hypotoniques afin d'extraire le contenu de ces différentes petites granules. Il revoit sa technique de centrifugation afin de mieux séparer les différentes fractions. Cette nouvelle technique permet de séparer la fraction contenant les mitochondries en deux sous-fractions bien distinctes : une première, obtenue grâce à une vitesse lente de centrifugation, la fraction « sombre », contenant peu de phosphatases acides, et une deuxième, la fraction « claire », obtenue grâce à une vitesse élevée de centrifugation contenant un taux élevé de phosphatases acides. C'est à partir de ce moment, que C. De Duve et ses collaborateurs vont faire une avancée rapide dans l'identification et la caractérisation de ces différentes enzymes dont le contenu est séparé du reste de la cellule par des membranes. Ce sont ces compartiments qu'il nommera le *lysosome*. Il dénomma ainsi ce compartiment, car ce mélange d'enzymes n'avait pour lui qu'une seule fonction, la dégradation de macromolécules. Le mot lysosome vient du grec, *soma*, qui veut dire particule, corpuscule, et *lytique* qui est la digestion. Il regrette même un peu cette dénomination selon ses dires : « Cette dénomination fut une erreur fondamentale, parce que vous savez bien que Fleming, découvreur de la pénicilline, avait aussi découvert une enzyme qu'il a appelé *lysozyme* parce qu'elle lyse des bactéries. Encore aujourd'hui, on dit parfois que c'est moi qui ai découvert le lysozyme ». En menant ainsi ces recherches, Christian de Duve a participé à la découverte et à la mise au point de nouvelles techniques de séparation des différents composés cellulaires.

Ce même groupe de chercheurs a également poursuivi ses recherches sur la fraction mitochondriale. Ils iront jusqu'à qualifier cette fraction « d'or », parce que cette fraction ne contient pas qu'un seul nouvel organite, mais bien deux. Cette nouvelle deuxième organelle ne contient pas les mêmes caractéristiques que les lysosomes, à savoir, un contenu d'acides hydrolases, mais un contenu composé d'une grande quantité d'uricane. Christian De Duve et ses collègues baptisent alors cet organite le *peroxisome*. Celui-ci est une vésicule qui contient des oxydases et des catalases. Il permet la dégradation de certaines molécules potentiellement toxiques, mais participe également à l'élimination de l' H_2O_2 et à la β -oxydation des acides gras.

Parallèlement à la découverte du peroxisome et du lysosome, juste avant les années 1960, Clark et Novikoff observèrent des mitochondries contenues dans des compartiments fermés par une membrane dans des ganglions de souris. Ils appelleront ces compartiments des « corps denses » (Novikoff, 1959). Après plusieurs études de ces nouveaux compartiments, ils réalisent que ces corps contiennent des enzymes de nature lysosomale. Par ailleurs, Ashford et Porter qui travaillent sur des hépatocytes de rat (Ashford and Porter, 1962) observent dans ces cellules le même type de compartiments après traitement de ces cellules au glucagon et pouvant contenir des mitochondries

ou du réticulum endoplasmique (RE) endommagé. A cet instant, Ashford et Porter observent sans le savoir, des « autophagosomes ». Ils interprètent ces vésicules comme étant, à tort, des lysosomes. Intéressé par ces études, Christian De Duve pose le premier un terme pour nommer le phénomène menant à la formation de ce type de compartiment, « autophagie ». Ce terme vient du grec, « phage » qui veut dire manger et « auto » qui veut dire « soi-même ». De Duve décrit alors les « autophagosomes », comme étant des compartiments à double membrane qui contiennent une portion de cytoplasme et/ou d'organelles à des stades de dégradation plus ou moins aboutis. Cet autophagosome est lié à la dégradation lysosomale et est présent de façon constitutive dans la cellule. Les premiers autophagosomes ont été observés dans des hépatocytes de rat après avoir été injectés par des solutions contenant du glucagon. Quelques années plus tard, Pfeifer démontre qu'à l'inverse, l'insuline inhibe l'autophagie, suggérant un rôle de ce mécanisme dans le métabolisme (Pfeifer, 1978). De plus, Mortimore et Schworer démontrent que des acides aminés sont produits à la fin de la dégradation par le phénomène d'autophagie, confirmant le rôle catabolique de ce mécanisme (Mortimore and Schworer, 1977). Toutes les cellules de foie de rat qui sont cultivées en présence d'excès d'acides aminés voient une diminution de l'autophagie. L'autophagie semble donc être un mécanisme catabolique permettant la génération d'énergie et de nouvelles molécules, pour la cellule, lors une carence énergétique.

Les études précédemment citées, sont basées sur une étude morphologique et sur l'observation de la partie finale de la formation de l'autophagosome ou d'un autolysosome (vésicule formée d'une seule membrane avec un contenu cytoplasmique partiellement dégradé). Il faut attendre les études de Seglen, dans les années 1980, pour voir apparaître la description des étapes précoces de la formation du compartiment autophagique. L'initiation de l'autophagie peut être formée par deux types de vésicules. La première appelée « phagophore », membrane se formant autour de la portion de cytoplasme à séquestrer pour aboutir, après élongation, à l'autophagosome. La deuxième vésicule, appelée « amphisome », forme une vésicule de type non-lysosomale par fusion d'un endosome et d'un autophagosome. Déjà à ce moment, Christian De Duve soupçonnait que les cellules emploieraient ce mode de dégradation pour digérer des portions de cytoplasme de façon non sélective par le lysosome, mais également, que ce mécanisme pourrait être sélectif et dégrader des organelles anormalement formées ou endommagées. C'est en 1973 que Bolender et Weibel, les premiers, travaillent sur ce thème, et démontrent que l'autophagosome est capable de dégrader de manière spécifique des portions du RE (Bolender and Weibel, 1973). Par la suite, Beaulaton et Lockskin suggèrent que les mitochondries sont également dégradées de manière sélective (Beaulaton and Lockshin, 1977). En 1983, Veehuis démontre que les péroxisomes superflus sont dégradés de façon spécifique dans la levure (Veenhuis *et al.*, 1983) et cinq ans plus tard, Lemasters et

ses collègues montrent que c'est le changement dans le potentiel de membrane des mitochondries qui mène à leur dégradation par l'autophagie (Lemasters *et al.*, 1998).

1.1.2 Le choix entre protéasome et autophagie pour la protéolyse

Le protéasome est un complexe enzymatique capable de dégrader des protéines mal repliées, en « fin de vie », non fonctionnelles. Le protéasome a été découvert par Ciechanover en 1978 (Ciechanover, 2009). Cette découverte fait suite à de nombreuses recherches menées entre les années 1950 et 1970 sur le catabolisme cellulaire avec entre autre, comme je l'énonçais précédemment, la découverte du lysosome par Christian De Duve. Le lysosome est un compartiment ayant un pH acide (pompe à protons au niveau de la membrane) et contenant des protéases de type cathepsines et pepsines, osidases et lipases. C'est en émettant l'hypothèse que le lysosome ne peut pas être l'organelle unique qui dégrade toutes les protéines essentielles de la cellule à l'état basal, que Ciechanover a recherché d'autres mécanismes. C'est ainsi que fut découvert le système de protéolyse dépendant de l'ATP. De fait, l'inhibition des protéases lysosomales par des inhibiteurs pharmacologiques n'affecte pas toute la protéolyse. Dans ce mécanisme, nouveau et complexe, il ne s'agit plus d'avoir une seule protéase qui clive son substrat, mais plusieurs composants qui réalisent cette activité. Une petite protéine, très stable qui sera nommée par la suite « ubiquitine », joue un rôle crucial dans ce nouveau mécanisme. Les premiers systèmes de dégradation (protéasome, lyse par le lysosome) ont été observés grâce à de nouvelles techniques élaborées par Hainfeld et Powell (Hainfeld and Powell, 2000). Ils ont réalisé une avancée majeure dans le domaine de l'imagerie électronique grâce à l'immunomarquage aux billes d'or. C'est cette technique qui permettra un peu avant les années 2000 de pouvoir visualiser le site de liaison des peptides en voie de dégradation par le protéasome.

Le protéasome est un complexe de plusieurs sous-unités existant sous plusieurs formes moléculaires. Les formes 20S et 26S ont été les premières découvertes. Le protéasome est une protéase multicatalytique qui permet le clivage d'un grand nombre de substrats protéiques de petite taille, ubiquitynés. Le clivage de la protéine en peptides est possible grâce à son site carboxylique. Le protéasome joue un rôle dans plusieurs mécanismes cellulaires et son dysfonctionnement favorise le développement de maladies graves telles que la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer.

Comme énoncé précédemment, le protéasome est capable de dégrader des agrégats protéiques ubiquitynés de faible masse molaire (MM). Qu'en est il alors de la dégradation d'agrégats ou de grosses protéines ? Un mécanisme utilisant une protéine liée à l'autophagie, le sequestosome (SQSTM1/p62) peut prendre en charge les gros agrégats protéiques ubiquitynés. Le SQSTM1/p62

est une protéine cellulaire capable de lier l'ubiquitine de manière non covalente. La protéine peut se lier à l'agrégat et participer à sa dégradation via l'autophagie. p62 est capable de se lier à certaines protéines autophagiques qui seront décrites dans la suite de mon manuscrit.

1.1.3 Le lysosome : acteur de l'hétérophagie et de l'autophagie

Le lysosome est une organelle dynamique, compartiment de dégradation de la cellule eucaryote. Il est impliqué dans le recyclage de macromolécules de natures variées. Le contenu lysosomal est dégradé grâce à un pH acide, inférieur à 5 et contient plus de 50 hydrolases. Il est capable de dégrader aussi bien des composants intracellulaires qu'extracellulaires, provenant de différentes voies telles que l'endocytose, la phagocytose et/ou l'autophagie. Ces mécanismes font converger vers le lysosome un grand nombre de vésicules comme des granules lytiques, le compartiment du CMH II, les phagosomes, les corps multivésiculaires et les autophagosomes. Par définition, l'hétérophagie est distincte de l'autophagie car elle implique une dégradation intracellulaire de matériel provenant de l'extérieur de la cellule. Ce processus utilise les voies d'endocytose afin de livrer son matériel au lysosome.

Le matériel intégré par endocytose est constitué de macromolécules, particules, composants membranaires. A ce moment, cet endosome peut être dirigé vers plusieurs voies telles que la voie de recyclage vers la membrane plasmique, le transfert vers la voie trans-golgienne ou encore l'adressage pour dégradation vers le lysosome. Plusieurs mécanismes interviennent lors de l'internalisation de l'endosome comme par exemple la mobilisation de la clathrine ou la cavéoline. La phagocytose est une forme d'endocytose qui permet l'internalisation de particules de grande taille (>250nm) contrairement à la pinocytose qui internalise plutôt des fluides ou macromolécules (<150nm). Le matériel d'internalisation peut alors être recyclé et redirigé vers la membrane sans dégradation ou alors, être dégradé et fusionner à terme avec des endosomes tardifs. Cette fusion peut former les corps multivésiculaires (MVBs) de taille importante. Ces vésicules fusionnent ensuite avec les lysosomes. Cette vésicule dite endosome tardif/lysosome voit alors son contenu dégradé. Un grand nombre d'études, dont je parlerais tout au long de mon manuscrit, montrent que l'autophagie, ou tout au moins des composants de sa machinerie, sont impliqués dans ce processus biologique.

1.1.4 Les trois formes d'autophagie

1.1.4.1 L'autophagie assistée par les chaperonnes

La machinerie macroautophagique est impliquée dans le recyclage de plusieurs organelles, d'agrégats protéiques ou de contenu cytoplasmique au sens large. Ce processus dépend de la fusion entre un lysosome et un autophagosome pour finalement former un autolysosome qui dégradera le contenu cytoplasmique. La CMA, processus de transport direct de protéines cytosoliques sélectionnées vers le lysosome, est régulée par les protéines du lysosome, à savoir les « lysosomal associated membrane proteins » (LAMPs), en particulier LAMP2A et par les protéines de choc thermique (« heat shock proteins », HSPs)

Certains composés destinés à être dégradés sont ciblés et directement transportés à travers la membrane du lysosome. Pour cela, le lysosome exprime des récepteurs spécialisés à la surface cytosolique de sa membrane. Les récepteurs qui y sont les plus abondants sont les protéines membranaires associées au lysosome, « LAMP1 » et « LAMP2 ». Les lysosomes contiennent également des protéines membranaires intégrales du lysosome « LAMP2 » et la tetraspanine CD63. Cette composition particulière de la membrane confère au lysosome une stabilité et une intégrité dans le temps. En effet, ces protéines permettent le contrôle de l'intégrité de la membrane. Cette caractéristique peut moduler la fusion du lysosome avec les phagosomes, donnant naissance aux phagolysosomes et aux membranes plasmiques durant l'exocytose.

La CMA suit un processus à plusieurs étapes, la première étant la reconnaissance du substrat et son ciblage vers le lysosome (Cuervo and Wong, 2014). La seconde étape consiste en la liaison au substrat. La troisième permet de transporter le substrat vers la lumière du lysosome où il sera dégradé. La prise en charge du substrat a lieu dans le cytosol grâce à une molécule chaperonne constitutive, la protéine « heat-shock » 70 (HSPA8/HSC70), via la reconnaissance d'un pentapeptide présent sur la séquence d'acides aminés du substrat, KFERQ. Ce motif, exact ou dégénéré, peut devenir accessible pour la reconnaissance par les chaperonnes dans plusieurs cas de figures, notamment lors d'un repliement incorrect des protéines ou après désassemblage d'un complexe protéique. Une fois que la protéine chaperonne a lié son substrat, celui-ci peut être dirigé à la surface du lysosome. A partir de ce moment, le substrat est pris en charge par l'isoforme LAMP2A, issue d'un épissage alternatif du transcrit codant pour la protéine LAMP2. LAMP2A est exprimé à la surface du lysosome sous une forme monomérique. Afin de permettre la translocation du substrat à l'intérieur du lysosome, la protéine LAMP2A se multimérise (Bandyopadhyay *et al.*, 2008). Ce complexe est alors stabilisé par la protéine HSP90 localisée à la surface luminale de la membrane du lysosome. Le

mécanisme d'internalisation du substrat dans le lysosome n'est pas encore totalement compris. La translocation du substrat à travers la membrane du lysosome requiert la présence de la protéine HSPA8, résidente dans le lysosome. Il est possible que la présence d'HSPA8 dans le lysosome résulte de l'internalisation d'HSPA8 par des corps multivésiculaires qui proviennent d'endosomes tardifs, ce qui permettrait l'enrichissement du compartiment endosome/lysosome en HSPA8 (Massey *et al.*, 2006). Une simple augmentation du pH serait suffisante pour induire sa destabilisation dans ce compartiment. Après l'internalisation du substrat dans la lumière du lysosome, LAMP2A est rapidement dissociée et retrouve sa forme monomérique, avant liaison à d'autres substrats. Le contrôle de la CMA peut se faire par l'assemblage/désassemblage du complexe formé par LAMP2A nécessaire à la translocation du substrat vers la lumière du lysosome. De ce fait, plusieurs facteurs participent à la régulation de ce processus. Un simple changement dans la fluidité de la membrane lysosomale peut affecter la mobilité des protéines la composant. Cela peut entraîner un dysfonctionnement dans la formation du complexe de translocation. L'activité de la CMA est directement liée à la concentration de LAMP2A présente dans la membrane. La quantité de LAMP2A peut être régulée par une augmentation de sa transcription, dans le cas de stress oxydatif, ou par la modulation de la quantité présente sur la membrane lysosomale. On sait que l'activité de la CMA augmente lors d'une carence prolongée en acides aminés (Cuervo and Dice, 2000a, b). D'autres rôles sont attribués à la CMA, comme son implication dans la dégradation de protéines mal repliées. Elle est également activée lorsqu'il y a des dommages de protéines dus à une exposition longue à des composés toxiques. Par ailleurs, une étude récente menée par le groupe d'Ana Maria Cuervo a montré que la dégradation par la CMA de certaines enzymes impliquées dans la glycogénèse et lipogénèse dans le foie est requise pour s'adapter au changement métabolique observé lors d'une variation de nutriments dans l'environnement cellulaire (Schneider *et al.*, 2014). Enfin la CMA pourrait contribuer à la dégradation complète de certaines protéines, dans les cellules présentatrices d'antigènes (CPA) participant à la présentation de peptides par le CMH de classe II (Crotzer and Blum, 2008). L'équipe d'Ana Maria Cuervo a développé un modèle de délétion spécifique de la CMA en inhibant *Lamp2a* spécifiquement dans les LTs. Des expériences *in vivo* utilisant un modèle d'infection par *Listeria monocytogenes* ont montré que la CMA module l'activation des LTs en ciblant la dégradation de certains régulateurs négatifs d'activation des LTs en réponse à une infection. (Valdor *et al.*, 2014).

1.1.4.2 La microautophagie

La microautophagie est considérée depuis longtemps comme étant une forme d'autophagie non sélective. Ce processus implique l'intégration d'une partie de cytoplasme lors de micro-invaginations

de la membrane du lysosome (Li *et al.*, 2012). La microautophagie peut être induite lors de carence en azote ou par certains agents pharmaceutiques tels que la rapamycine. Le maintien de la taille des lysosomes, l'homéostasie membranaire, la survie cellulaire en cas d'absence d'azote sont des phénomènes influencés par la microautophagie.

1.1.4.3 La macroautophagie

Comme il est dit plus haut, la macroautophagie, souvent abrégée par « autophagie », est un mécanisme de dégradation primaire de toutes les cellules eucaryotes, de la levure aux vertébrés. L'autophagie basale permet le recyclage d'organelles endommagées et d'agrégats protéiques. L'autophagie peut également être induite par des stress énergétiques (carence en acide aminé, faible niveau d'ATP) ou par des signaux extérieurs après stimulation de récepteurs. L'autophagie permet de s'adapter à des changements environnementaux et favorise la survie de la cellule en permettant le maintien de son homéostasie.

L'autophagie est un processus aboutissant à la séquestration de composants cytoplasmiques par des vésicules à double membrane (Figure 1). Pour cela, des portions de membranes se rassemblent pour former le phagophore, c'est l'étape d'initiation. L'origine de la membrane de l'autophagosome peut être multiple. Cet aspect sera détaillé plus tard dans ce manuscrit, dans le paragraphe traitant de l'origine de la membrane autophagique. Les deux extrémités de membrane se rejoignent ensuite pour former l'autophagosome, vésicule circonscrite par une double membrane, c'est l'étape d'élongation. Il est à noter que cette double membrane est propre et caractéristique à l'autophagosome. En effet, elle est plus fine que toutes les autres organelles qui composent la cellule et elle ne contient pas d'espace intermembranaire. Puis, cette vésicule subit une étape de maturation après fusion avec des lysosomes, aboutissant à la dégradation du contenu cytoplasmique, c'est l'étape de dégradation. Par ailleurs, les autophagosomes sont capables de fusionner avec des endosomes et forment ainsi une vésicule appelée amphisome. Bien que le processus soit connu « morphologiquement » depuis les années 1950, la machinerie moléculaire régulant ce processus n'a été décrit que dans les années 1990 ; c'est la découverte des gènes que l'on appelle *ATGs* (« autophagy-related genes »). Cette appellation « related » tient du fait que certaines protéines de la machinerie autophagique remplissent des fonctions non strictement autophagiques comme évoqué plus tard.

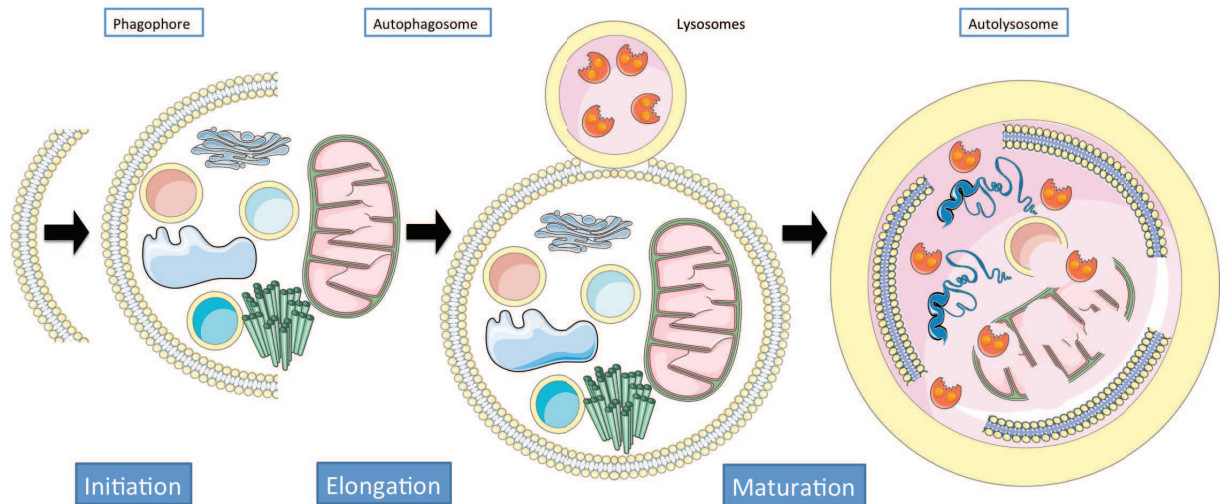


Figure 1 : Les étapes de la formation d'un autophagosome

L'autophagie est une voie de dégradation catabolique lysosomale majeure conservée au cours de l'évolution. Elle se déroule en trois grandes étapes : le recrutement de la membrane qui permet d'initier la formation d'un phagophore (étape d'**initiation**), l'étape d'**élongation** qui permet de former une vésicule close à double membrane (autophagosome) qui séquestre le matériel cytoplasmique, enfin, l'étape de **maturation** au cours de laquelle l'autophagosome fusionne avec les lysosomes menant à la dégradation du contenu cytoplasmique de la vésicule.

1.2 La machinerie autophagique

1.2.1 Apg, découverte de la première protéine impliquée dans l'autophagie

La mesure de l'autophagie a été longtemps réduite à une étude morphologique grâce à l'utilisation de la microscopie électronique permettant de distinguer les différentes étapes de la formation des autophagosomes. Ces méthodes sont techniquement complexes, peu quantitatives et requièrent un œil exercé pour distinguer les autophagosomes des autres vésicules qui composent la cellule. Ainsi, les chercheurs manquaient de marqueurs spécifiques de l'autophagie pour réaliser une étude quantitative précise et des méthodes autres que la microscopie électronique.

Les protéines clés dans le mécanisme de l'autophagie ont été identifiées dans un modèle génétique simple : *S. cerevisiae*. Cet eucaryote unicellulaire contient une simple organelle de dégradation, la vacuole. Cette organelle remplit, entre autres, des rôles proches de ceux des lysosomes des eucaryotes supérieurs et peut s'observer simplement par un microscope à contraste de phases. La vacuole contient des acides aminés et des ions constituant un stock pour la cellule et régulant la pression osmotique. Ce compartiment est, de plus, acide et contient un grand nombre d'enzymes hydrolytiques. Lors d'une carence en azote dans l'environnement de la levure, il y a induction de sporulation et activation de la méiose. Cette sporulation et division méiotique fait intervenir une

dégradation d'agrégats protéiques. Cette dégradation est observable au microscope en contraste de phases car la vacuole a alors une densité faible au regard des agrégats remplissant la vacuole. Yoshinori Ohsumi a remarqué également un changement de la morphologie de la vacuole lorsqu'on prive la levure d'azote (Takeshige *et al.*, 1992). Après 30 minutes, des corps sphériques granuleux apparaissent dans la vacuole. Ces vésicules seront rapidement appelées « corps autophagiques », malgré le fait que ces vésicules ne présentent qu'une simple membrane. La progression de ce mécanisme orthologue de l'autophagie des eucaryotes supérieurs, peut être alors suivie dans le temps par un microscope à lumière blanche où l'on observe une augmentation de la quantité de ces vésicules autophagiques en cas de carence en azote. Ces vésicules autophagiques fusionnent rapidement avec la vacuole de la levure. Par la suite, Misuzu Baba *et al.* révéleront que l'autophagosome de la levure, avant fusion avec la vacuole, est composé d'une double membrane, comme dans les cellules de vertébrés. Cette structure est aussi appelée « cytoplasm vacuole targeting » (cvt) chez la levure (Baba *et al.*, 1995). Il résulte de cette fusion une vésicule avec une simple membrane après translocation de la vésicule cvt (l'autophagosome) dans la vacuole formant le « corps cvt ». Cette série d'événements opérant chez la levure sera détaillée dans la suite de ce document. Les chercheurs travaillant sur l'autophagie des levures ont noté une différence de composition de la membrane externe et interne. C'est Takeshi Noda, dans le laboratoire de Y. Ohsumi, qui a été le premier à avoir imaginé un outil capable de mesurer l'activité autophagique (Noda and Ohsumi, 1998). L'ingéniosité de son système est qu'il va non pas observer une diminution d'une protéine cytoplasmique dégradée par l'autophagie dont la détection serait délicate, mais utiliser l'activité d'une enzyme dépendante de la mise en place du processus autophagique à savoir Pho8 Δ 60. Cette enzyme est une phosphatase alcaline dont l'activation permet de suivre le transport de la vésicule cvt vers la vacuole, cette enzyme étant contenue dans l'autophagosome. Son activation dépend de la fusion de l'autophagosome avec la vacuole. Cette expérience a permis de réaliser un grand pas vers l'estimation de l'activité autophagique et ceci de manière quantitative.

Ce n'est que par la suite que Y. Ohsumi adoptera une approche génétique pour découvrir les molécules de la machinerie autophagique. Dans son équipe, M. Tsukada utilisera une approche simple, par observation au microscope à lumière blanche, pour sélectionner les différents mutants, choisis à partir d'une banque, qui n'accumulent pas de vésicule autophagique en situation de carence en azote. Ils réalisèrent de plus un criblage sur cette banque sur le critère de la survie de la levure après carence en azote. Le premier mutant qu'il met en évidence est le mutant *apg1* (Tsukada and Ohsumi, 1993). Après une carence en azote, les levures mutées pour ce gène *apg1* (*apg pour autophagie*), ne parviennent pas à former de vésicule autophagique et meurent rapidement en comparaison des souches sauvages. Ce résultat suggère que l'autophagie, via les autophagosomes, est indispensable pour la dégradation des protéines dans la vacuole de la levure en condition de

carence en azote. Par la suite, il identifiera plus d'une quinzaine de gènes *apg* qui seraient impliqués dans la machinerie autophagique chez la levure. La fonction de tous ces gènes n'est pas encore connue et leurs mutants ont tous le même phénotype : ils présentent tous un défaut d'accumulation d'autophagosomes dans la vacuole et un défaut de dégradation des protéines dans cette vacuole. De plus, ils meurent rapidement après la carence en azote. Cela suggère un défaut dans la formation de l'autophagosome et/ou de l'autolysosome. Sans *apg*, la levure est en revanche capable de se développer dans un milieu qui est riche en nutriments. En parallèle, Michael Thumm isole six mutants *aut* déficients pour l'autophagie (Thumm *et al.*, 1994). Il réalise, pour sa part, une étude d'une banque de mutants et suit les enzymes de dégradation (endoprotéinases *yscA* et *yscB* présentes dans la vacuole) grâce à un marquage d'anticorps fluorescent. Daniel Klionsky, travaillant sur le transport d'une enzyme α aminopeptidase vers la vacuole de levure dans la voie de transport *cvt*, isole quant à lui plusieurs mutants déficients pour le transport de cette enzyme vers la vacuole (Harding *et al.*, 1995). Des expériences de microscopie électronique confirment que ces mutants ont un phénotype identique aux mutants déficients pour les *apg* (Baba *et al.*, 1997). Il est à noter que dans ces expériences, l'autophagie est induite par carence en acides aminés. Le même défaut de formation de vésicule à double membrane, vésicule *cvt*, et de dégradation protéique à l'intérieur de la vacuole est observé. En réalité, de nombreux groupes travaillent et réalisent des mutants impliquant l'autophagie. Un problème se profilait, car tous avaient des nomenclatures différentes. Une nomenclature unique sera adoptée en 2003 (Klionsky *et al.*, 2003) et l'on utilisera la terminologie *ATG*. Aujourd'hui, le nombre de gènes *ATG* participant à la machinerie autophagique est estimé à 37. Ce nom convient à la fois pour les protéines qui sont à la base de la formation de l'autophagie mais également pour les protéines autophagiques qui sont impliquées, parfois, dans un mécanisme différent de l'autophagie canonique.

1.2.2 Les phases de formation de l'autophagosome

1.2.2.1 L'initiation

Le complexe 1 : ULK1-ATG13-FIP200-ATG101

L'autophagosome est issu de l'élongation d'une structure appelée phagophore. L'incorporation de phosphatidylinositol 3 phosphate (PI3P) dans la membrane du phagophore est nécessaire et permet l'association des protéines participant à sa formation. Chez la levure, le complexe Atg1-Atg13-Atg17 régule la phase d'initiation de la formation de l'autophagosome (Kabeya *et al.*, 2005). En effet, en cas de carence en acides aminés, la protéine Atg1 interagit avec Atg13 et Atg17 (Cheong *et al.*, 2005).

Atg1 est la plupart du temps hors du complexe Atg13-Atg17. Etant donné que l'activité d'Atg1 augmente durant une carence énergétique pour la cellule, et que, l'activité d'Atg13 et d'Atg17 est importante pour l'activité d'Atg1, il est admis que l'association d'Atg13 et d'Atg17 déclenche l'activité d'Atg1.

Les gènes *ATGs* requis pour l'autophagie sont très conservés dans l'évolution. Les homologues d'Atg1 chez les mammifères sont « Unc-51-Like Kinase » 1 et 2 (ULK 1 et 2). ULK 1 a été pour la première fois décrite chez *C. elegans*. ULK1 est nommé un-51 chez *C. elegans*, cette protéine servant à la coordination de l'animal. Il a été démontré que la suppression de ULK1 dans une cellule de type HEK293 (« human embryonic kidney 293 cells ») suffit à inhiber l'autophagie en réponse à une carence en acides aminés. Des partenaires, requis pour l'autophagie de ULK 1 ont été identifiés. ULK 1 est ainsi capable d'interagir avec la kinase d'adhésion focale (« focal adhesion protein (FAK) family interacting protein of 200 kD » (FIP200)) et ATG101. FIP200 est une kinase qui intervient également dans l'adhésion cellulaire, la migration et la mort cellulaire (Hara *et al.*, 2008). ATG101 est une petite molécule encore peu connue (Hosokawa *et al.*, 2009). Plusieurs études sont en accord sur le fait que la protéine ATG13 peut jouer le rôle d'intermédiaire entre ULK 1 et la protéine FIP200, mais ULK 1 peut s'associer directement avec FIP200 (Ganley *et al.*, 2009). ATG13 et FIP200 sont capables d'activer la kinase ULK1. ULK1, ATG13, FIP200 et ATG101 forment un complexe stable quelles que soient les conditions de nutrition de la cellule. Le complexe ULK1-ATG13-FIP200-ATG101 va être à l'origine de la régulation de l'initiation de l'autophagie canonique chez les mammifères (Figure 2). Ce complexe régule l'activation du complexe Beclin1-VPS34-VPS15 (« vacuolar protein sorting », VPS), à activité PI3 kinase de type III. En particulier la protéine VPS34 génère la PI3P au niveau de la membrane de l'autophagosome. La fonction de ce complexe sera détaillée plus loin.

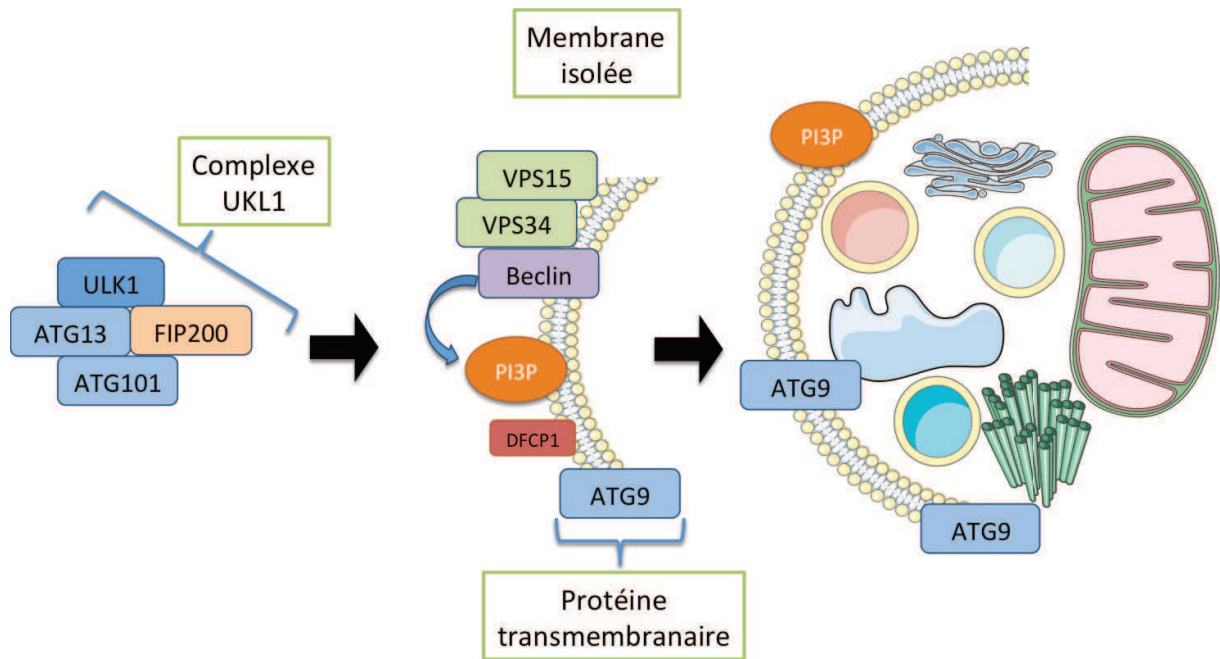


Figure 2 : Formation du phagophore

Le complexe ULK1, nécessaire à l'initiation de l'autophagie contient les kinases ULK1, ATG1, ATG101, FIP200 et ATG13. Ce complexe sert au recrutement de la membrane isolée, avec l'aide de la protéine ATG9, permettant la mise en place du phagophore. Ces protéines régulent un autre complexe majeur impliqué dans la formation du phagophore, à savoir le complexe Beclin/VPS34/VPS15.

Le complexe 2 : Beclin1-VPS34-VPS15

Le complexe Beclin1-VPS34-VPS15 occupe une place majeure dans l'initiation de la formation de la membrane de l'autophagosome (Figure 3). La protéine Beclin1 a tout d'abord été identifiée comme gène suppresseur de tumeur, homologue chez les vertébrés d'Atg6 chez la levure (Kang *et al.*, 2011). Elle joue un rôle central dans le processus autophagique mais également dans la voie d'endocytose et dans la régulation de la mort cellulaire par apoptose. Elle forme avec la phosphatidylinositol 3-kinase de type III (PI3K de type III) et VPS34, le complexe cœur de l'initiation de l'autophagosome. D'autre part, la protéine VPS15 est nécessaire à l'activité régulatrice de ce complexe. C'est l'activité de la PI3K de type III qui permet la génération de PI3P à partir de phosphatidylinositol (PI) lors de la croissance de la membrane autophagique (Figure 2). Comme mentionné précédemment, c'est la PI3P qui permettra l'apport des protéines nécessaires à la formation du phagophore telles que la protéine « double FYVE domain-containing protein 1 » (DFCP1). La protéine Beclin1 est capable de se lier avec VPS34, VPS15 mais également avec la protéine du gène associé à la résistance aux irradiations UV (UVRAG), ATG14L et Rubicon (contient un domaine RUN, avec un site riche en résidus cystéine, se lie à Beclin1). Beclin1 est également capable de se lier, sous une autre conformation, à Bcl2 et à la protéine appelée « activating molecule in Beclin1-related autophagy » (AMBRA1) (Di

Bartolomeo *et al.*, 2010). Le rôle de ces protéines sera abordé plus en détail dans le paragraphe dédié à l'origine de la membrane autophagique.

La protéine Beclin1 peut se lier à des protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 (Bcl-2 et Bcl-xl) via leur domaine BH3. Le complexe Beclin1-Bcl2 fonctionne comme un rhéostat qui assure un équilibre entre autophagie et apoptose (Patingre *et al.*, 2005).

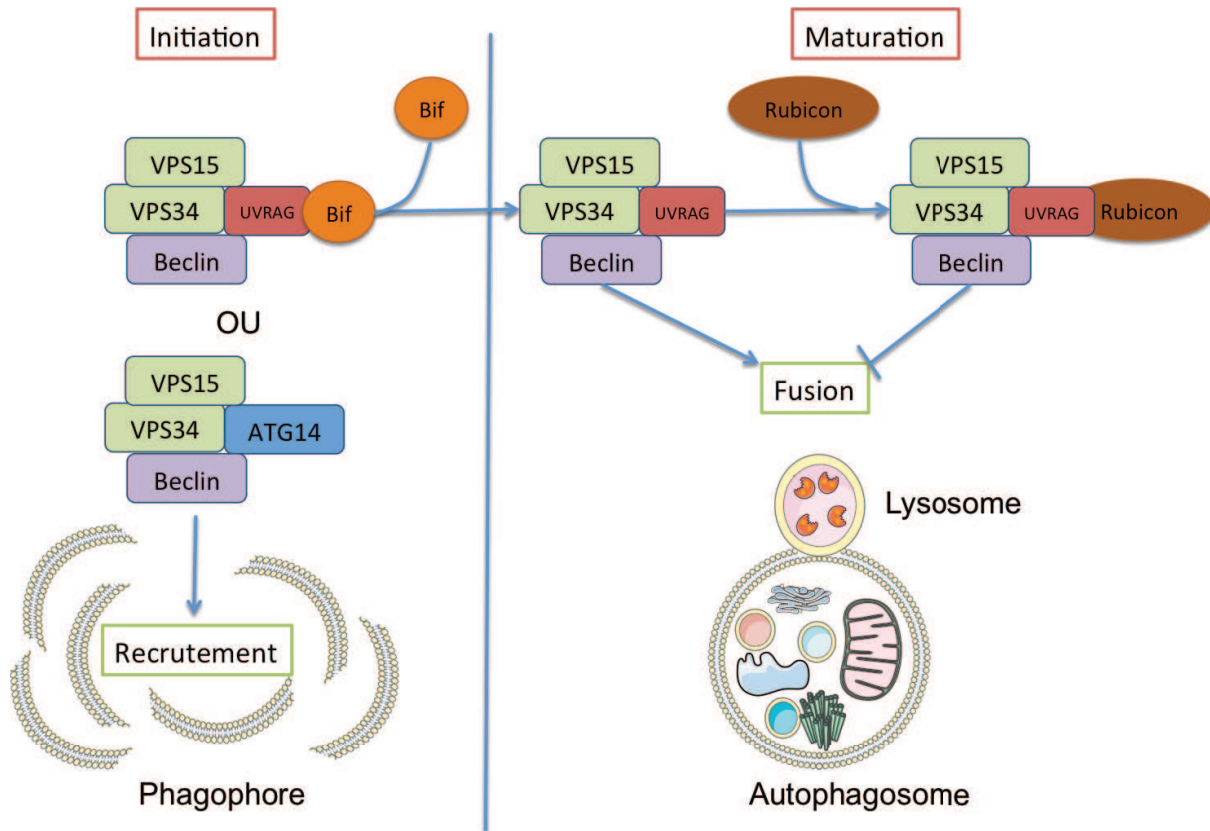


Figure 3 : Rôle du complexe Beclin1-VPS34-VPS15-UVRAG au cours des différentes étapes de l'autophagie

Le complexe Beclin1-VPS34-VPS15-UVRAG a une double fonction dans le phénomène autophagique. Il intervient dans le recrutement des membranes pour former le phagophore lorsque ce complexe est associé à Bif. Beclin1 et ses partenaires régulent également positivement la maturation/fusion de l'autophagosome avec les lysosomes. Ce complexe peut également avoir une action inhibitrice sur la maturation de l'autophagosome lorsqu'il est associé à la protéine Rubicon.

Beclin1 possède un domaine BH3 permettant de se lier à la protéine Bcl-2. Le travail de Sophie Patingre au sein de l'équipe de Beth Levine, a montré que la protéine anti-apoptotique Bcl-2, exerçait aussi une fonction anti-autophagique en se liant à la protéine Beclin1 (Patingre *et al.*, 2005). En fait, le complexe Beclin1-Bcl2 régule l'homéostasie basale de l'autophagie. Le mécanisme exact reste encore mal connu, mais il serait possible que Bcl-2 limite l'interaction entre Beclin1 et VPS34 (Figure 4). Lors de la dissociation du complexe Beclin1-Bcl2, la protéine Beclin1 peut alors

reformer son complexe Beclin1-VPS34 et induire l'activité de la PI3K de classe III afin d'induire l'initiation de l'autophagie. Il existe des mécanismes qui régulent l'association du complexe Beclin1-Bcl2 ou Beclin1-Bcl-xl. Les protéines « BH3-only » peuvent induire l'autophagie en libérant la protéine Beclin1 de son inhibition par Bcl-2 ou Bcl-xl, autre protéine anti-apoptotique de la même famille (Maiuri *et al.*, 2007). L'induction de l'autophagie, à cette étape, peut résulter de deux événements. Le premier est que d'autres protéines qui contiennent un site de liaison BH3 entrent en compétition avec Beclin1 pour la liaison avec Bcl2/Bcl-xl (Sinha and Levine, 2008). Le deuxième est l'activation de la voie de signalisation JNK1 (Wei *et al.*, 2008). En effet, il a été montré que lorsque la cellule subit un stress énergétique, la voie JNK1 peut phosphoryler le site BH3 des protéines Bcl2 et Bcl-xl. Le complexe Beclin1-Bcl2 ou Beclin1-Bcl-xl sont ainsi dissociés et la protéine Beclin1 peut induire l'autophagie. Il a été montré plus précisément que Bcl2 présent sur la membrane du RE et non Bcl2 présent sur la mitochondrie est capable d'inhiber l'autophagie induite par la carence en acides aminés. Cela suggère que la localisation de Bcl2 joue un rôle important dans la co-régulation de l'autophagie et de l'apoptose (Figure 4).

Deux autres protéines nommées Ambra 1 et Bif-1 peuvent interagir avec le complexe Beclin1-VPS34-VPS15. Toutes deux possèdent un site de liaison transitoire à la protéine Beclin1. La liaison de la protéine Bif-1 avec Beclin1 reste indirecte, via la protéine UVRAG (Figure 3). On sait juste que l'augmentation de la quantité de cette dernière protéine est corrélée avec l'augmentation de l'activité autophagique. Ambra1 peut également directement interagir avec la protéine Beclin1. Lorsque l'autophagie n'est pas activée, Ambra1 est localisée au niveau des microtubules, mais, lorsqu'il y a induction de l'autophagie, Ambra1 peut être phosphorylée par le complexe ULK1-ATG13-FIP200-ATG101 (Di Bartolomeo *et al.*, 2010). Le complexe Beclin1-VPS34-VPS15 est alors recruté au niveau du RE et la formation du phagophore est ainsi initiée.

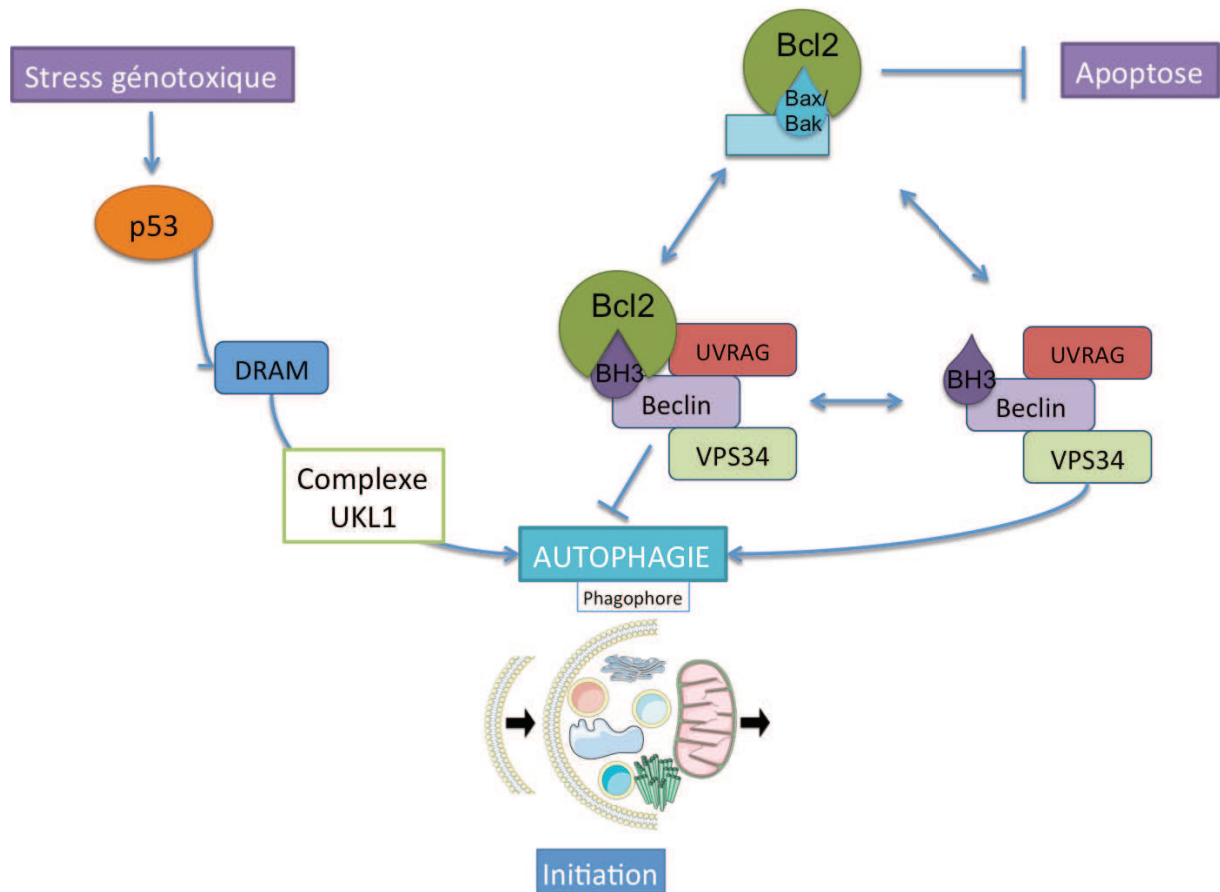


Figure 4 : Rôle des protéines p53 et Bcl2 dans l'autophagie

En réponse à un stress cellulaire, p53 se localise dans le noyau et peut se lier à la région promotrice de plusieurs gènes pro-autophagiques tels que l'AMPK et DRAM1. DRAM1 peut alors permettre l'initiation de l'autophagie via l'activation du complexe ULK1.

La protéine Beclin1 est capable d'interagir avec les protéines anti-apoptotiques de la famille des Bcl-2. La protéine Beclin1 possède un domaine BH3. De ce fait, si la protéine Bcl-2 est liée au domaine BH3 de Beclin1, celle-ci ne peut pas remplir sa fonction activatrice de l'autophagie. Par contre, après dissociation de Bcl-2, la protéine Beclin1 remplit sa fonction activatrice de l'autophagie. Bcl-2 peut, dans ce cas, inhiber l'apoptose par rétention d'autres protéines pro-apoptotiques possédant un domaine BH3. Bcl-2 est ainsi un facteur d'équilibre entre activité autophagique et activité apoptotique.

1.2.2.2 Régulation de l'initiation de l'autophagie

Régulation de l'autophagie dépendante de mTOR

Un des régulateurs majeurs de la voie de signalisation liée à la détection du niveau métabolique de la cellule chez les mammifères est le « mammalian Target Of Rapamycin » (mTOR). L'activité de cette enzyme est connue pour réguler l'autophagie de façon négative. L'inhibition de mTOR est suffisante pour induire l'autophagie en absence de nutriment. La rapamycine, inhibiteur de mTOR, est capable au contraire d'activer l'autophagie. La rapamycine est capable de se lier au récepteur intracellulaire

FKBP12. Une fois le complexe FKBP12-rapamycine formé, il se lie sur mTOR et permet son inhibition et de ce fait, active l'autophagie (Huang and Houghton, 2001).

mTOR est une protéine kinase à résidu sérine/thréonine elle-même régulée par la voie de signalisation Akt/PI3K. Son activation induit la synthèse protéique en permettant l'initiation de la traduction des ARNm (Mamane *et al.*, 2006) et est liée à la prolifération cellulaire (Murakami *et al.*, 2004). mTOR peut former deux complexes protéiques en fonction de la nature de ses partenaires à savoir mTOR complexe 1 (mTORC1) et mTORC2. mTORC1 est hautement sensible aux variations de nutriments (acides aminés et facteurs de croissance) dans l'environnement de la cellule. De plus, il est maintenant connu que seulement certains acides aminés régulent l'autophagie. L'alanine, la leucine, la glutamine et la phénylalanine sont fortement impliquées dans cette voie de signalisation et inhibent le mécanisme autophagique. Il a également été démontré que la leucine peut avoir une action directe sur la PI3K de classe III induisant ainsi l'activation de mTOR (Meijer and Codogno, 2009). mTORC1 est composé de mTOR, un régulateur de mTOR (raptor) et un régulateur de croissance ainsi que de mort cellulaire « mammalian lethal with sec-13 protein 8 » (mLST8) Il en résulte deux situations possibles, en présence de nutriments, mTORC1, mais non mTORC2, phosphoryle le complexe ULK1 et ATG13. Le complexe ULK1-ATG13-FIP200 est alors inactif. Par contre, en cas de carence en acides aminés, mTORC1 est dissocié du complexe, de ce fait, ULK1 et ATG13 sont déphosphorylés, ULK1 peut ainsi s'autophosphoryler (Figure 5). Il induit une trans-phosphorylation des protéines ATG13 et FIP200 permettant leur recrutement à la membrane du phagophore naissant. Dans ce complexe, ATG101 a la fonction de stabiliser ATG13 sur la membrane induisant l'initiation de la formation du phagophore.

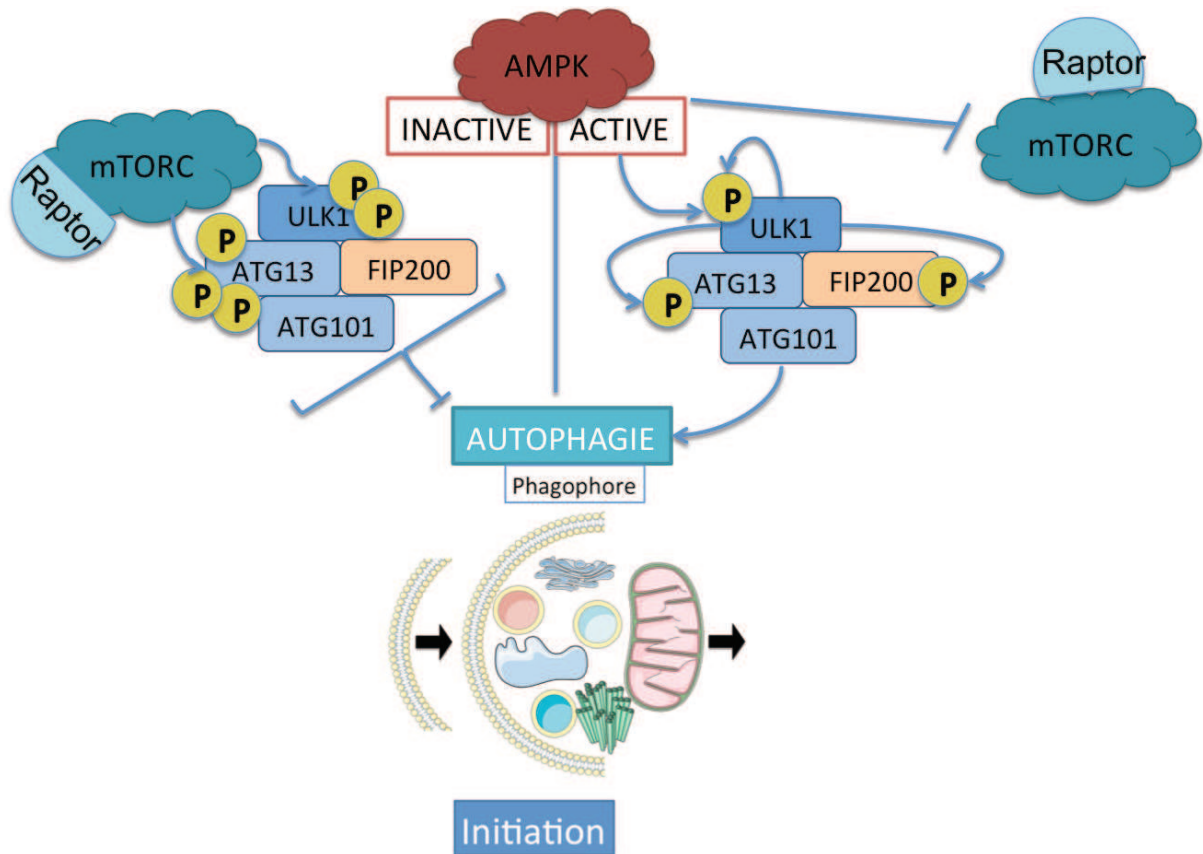


Figure 5 : Régulation de l'autophagie par l'AMPK

En présence d'acides aminés, mTOR est activé et phosphoryle les protéines ULK1 et ATG13. Le complexe ULK est alors inhibé. Au contraire, lors d'une carence en acides aminés, mTOR est inactivé. Dans ce cas, la protéine ULK1 s'active par autophosphorylation et permet de phosphoryler ATG13 et FIP200. Le complexe ULK est activé et permet d'initier l'autophagie.

En présence d'ATP, l'AMPK est inactive et n'exerce pas d'action inhibitrice sur le complexe mTOR. Dans ce cas, mTOR phosphoryle le complexe ULK1 et empêche son activité initiatrice de l'autophagie. Lors d'une carence en ATP, l'AMPK est cette fois-ci activée et inhibe mTOR par la phosphorylation de Raptor. La formation de l'autophagosome peut alors être initiée.

P, Phosphate.

Les fonctions de mTORC2 sont encore mal connues. Des études ont montré que mTORC2 serait également impliquée dans l'inhibition de l'autophagie. En effet, mTORC2 serait capable d'activer la voie Akt (Yang and Klionsky, 2010). Après activation de cette voie, l'activation de « forkhead box P3 » (Foxp3) serait bloquée. Foxp3 intervient dans le contrôle de la transcription des gènes impliqués dans l'autophagie, incluant la protéine « microtubule-associated protein light chain 3 » (MAP1LC3, abrégé en LC3). Dans les cellules musculaires, Foxp3 est suffisant pour induire l'autophagie grâce à son domaine de liaison sur le promoteur LC3. De plus, l'induction du gène Foxp3 joue un rôle dans la formation de l'autophagosome lors d'une atrophie musculaire (Mammucari *et al.*, 2007). Les fonctions détaillées de la protéine LC3 seront abordées dans le paragraphe dédié à l'élongation

Une autre voie de signalisation lie la détection du niveau d'énergie de la cellule aux voies mTOR et permet de réguler l'autophagie via ULK1-ATG13-FIP200-ATG101. Il s'agit de la voie des protéines kinases qui sont activées par l'adénosine monophosphate (AMPK). L'AMPK est activée sous des conditions de stress énergétique, lorsque la concentration d'ATP décline et que l'AMP intracellulaire augmente (Kahn *et al.*, 2005; Shaw, 2009). Cette voie peut alors activer directement ULK1 par phosphorylation (Kim *et al.*, 2011). Les voies de signalisation de l'AMPK et de mTOR sont donc étroitement liées (Figure 6). Dans les faits, lorsque l'AMPK est activée, cette protéine est capable d'inhiber le complexe mTORC. L'AMPK phosphoryle TSC2, une protéine suppressive de tumeur, qui inhibe mTORC1 (Hardie, 2004). De ce fait, l'autophagie est activée par la voie AMPK, mais également par l'inhibition du complexe mTOR.

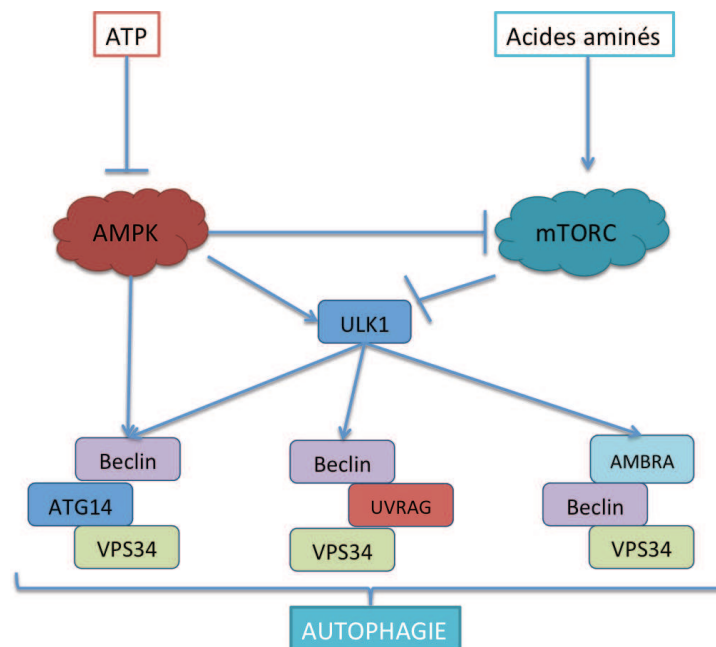


Figure 6 : Senseurs énergétiques et régulation de l'autophagie

Un niveau bas d'ATP ainsi qu'une carence en acides aminés peuvent activer le complexe ULK1 respectivement grâce à sa phosphorylation par l'AMPK et la perte de l'inhibition de mTOR. L'activation du complexe VPS34/Beclin1 est inhibée en absence de stress énergétique. Le complexe ATG14/VPS34 est activé par le complexe ULK1 grâce à la phosphorylation de la protéine Beclin1. Ce complexe peut être inhibé par la phosphorylation d'ATG14 par mTOR. Le complexe VPS34/UVRAG est activé grâce à la phosphorylation de la protéine Beclin1 par l'AMPK en réponse à une carence en acides aminés. Enfin, le complexe ULK1 phosphoryle AMBRA1, dissociant VPS34 du cytosquelette permettant l'initiation de l'autophagie.

Régulation de l'autophagie non dépendante de mTOR

La régulation de l'autophagie peut être indépendante de la voie de signalisation mTOR. L'activité de l'adénylate cyclase (AC) entraîne une augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique (cAMP) cytosolique aboutissant à l'activation de la phospholipase C qui, de ce fait, augmente la production

d'inositol 1,4,5-triphosphate (IP3) (Sarkar *et al.*, 2009). L'IP3 est un inhibiteur de l'autophagie via la stimulation du récepteur IP3 de surface du RE, ce qui provoque une expulsion de Ca^{2+} dans le cytosol. C'est à la fois le Ca^{2+} intracytosolique expulsé du RE et l'import de Ca^{2+} du milieu extracellulaire qui participent à l'inhibition de la fusion autophagosome/lysosome (Ganley *et al.*, 2011; Williams *et al.*, 2008).

Une autre voie de signalisation qui régule l'autophagie de manière mTOR-indépendante est la voie « c-Jun N-terminal kinases » (JNK1)/Beclin1/PI3K de classe III. En effet, l'autophagie peut être activée par JNK lors d'une carence en acides aminés, d'une condition apoptotique ou par une augmentation du niveau cytosolique de monoxyde d'azote (NO) (Marino *et al.*, 2014). L'activation de JNK1 mène à une dissociation du complexe Beclin1/Bcl2, permettant à Beclin1 de jouer son rôle inducteur de l'autophagie par interaction avec la PI3K de classe III initiant la formation du phagophore.

L'autophagie est également mise en place de manière indépendante de la voie de signalisation JNK1, via la protéine Beclin1 (Kang *et al.*, 2011; Salminen *et al.*, 2013). La « Ca^{2+} -modulated death-associated PK » peut directement interagir avec la protéine Beclin1. La « pyruvate deshydrogenase kinase » (PDK) active la voie de signalisation JNK1 et peut alors directement provoquer l'association de la protéine VPS34 et Beclin1. Enfin la molécule « high-mobility group protein box 1 » (HMGB1) permet la dissociation directe de Beclin1 et de Bcl2, ce qui permet l'initiation de la formation du phagophore.

1.2.2.3 Nucléation, recrutement de la membrane autophagique et formation du phagophore

ATG9

La formation du phagophore est suivie de la mise en place de l'autophagosome, étape pendant laquelle ATG9 joue un rôle clé. ATG9 a été identifiée chez la levure au niveau des mitochondries. C'est la seule protéine ATG transmembranaire connue, qui transite entre la pré-structure autophagosomale, site d'assemblage du phagophore, et les sites périphériques à la construction de cette vésicule. Son rôle précis est encore mal connu mais il est soupçonné que cette protéine permette le transport des lipides environnant le site de construction à la membrane du phagophore (Xie and Klionsky, 2007). Ce mécanisme permet l'expansion du phagophore (Figure 7). ATG9 possède également un homologue mammifère, localisé au niveau des endosomes tardifs et de l'appareil de Golgi, qui joue le même rôle que chez la levure. Ainsi, lors de l'induction de l'autophagie, ATG9 est recrutée au niveau de la membrane et permet son expansion en ajoutant des lipides bout à bout le long de la membrane du phagophore naissant (Longatti and Tooze, 2009). Les mouvements d'ATG9 sont dépendants de l'activité d'ULK1 et des kinases PIK3C3/VPS34.

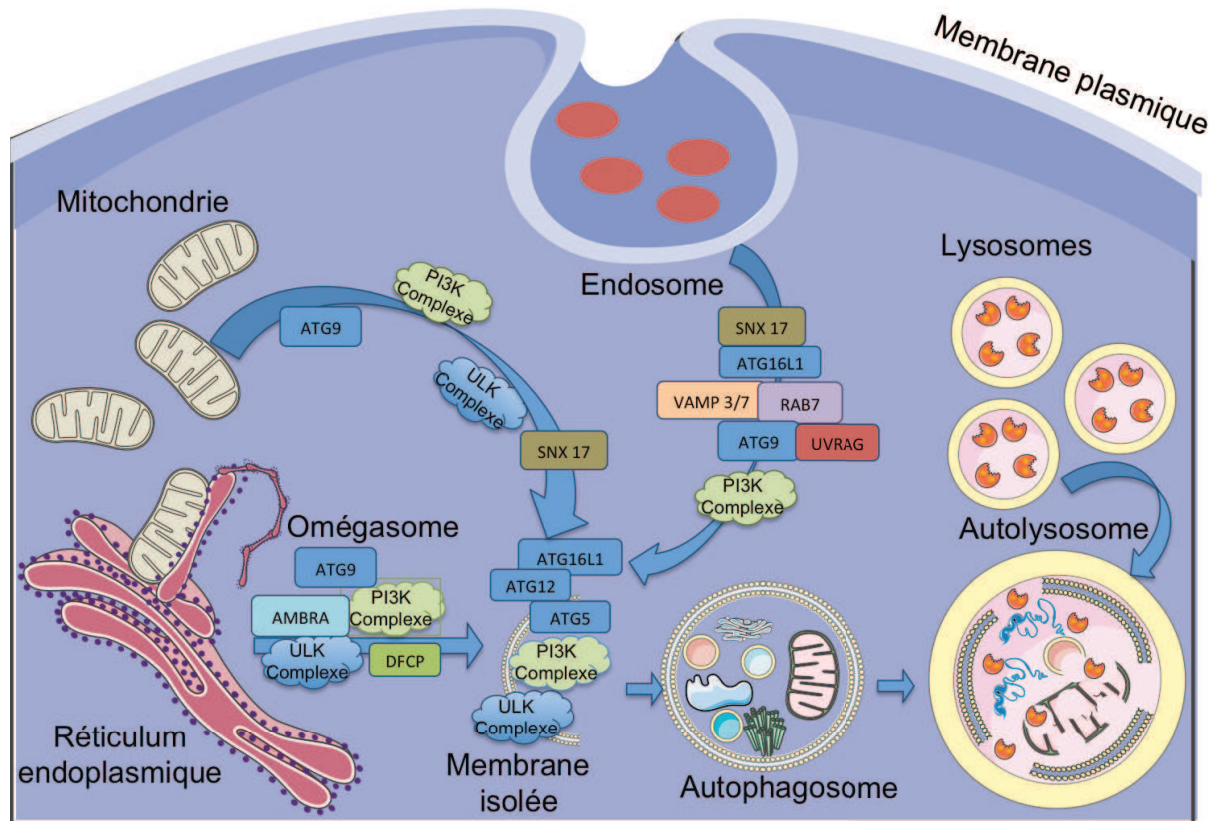


Figure 7 : Origines des membranes de l'autophagosome

La zone de contact entre mitochondrie et RE forme une zone riche en PI3P appelé omégasome. Cette structure est une des nombreuses sources de membranes pour la formation de l'autophagosome. Le RE ou la mitochondrie, de manière indépendante de l'omégasome, peuvent être à l'origine de la membrane autophagique. Enfin, la membrane plasmique, par la voie d'endocytose après transit par l'appareil de Golgi, peut être une source possible de lipides membranaires pour la formation de l'autophagosome.

ATG14L

ATG14L, interagissant avec le complexe ULK1-ATG13-FIP200-ATG101, participe à la liaison avec le complexe Beclin1-VPS34-VPS15 (Figure 6). Il forme alors un complexe Beclin1-Atg14L-VPS34-VPS15. ATG14L est essentiel à la formation des autophagosomes. La localisation initiale précise d'ATG14L n'est encore bien déterminée même si l'on sait qu'elle permet la translocation de membrane isolée vers le lieu de formation du phagophore. ATG14L colocalise avec des marqueurs de membrane isolée, comme la calnexine présente dans la membrane du RE (Matsunaga *et al.*, 2009). Cela suggère que la protéine ATG14L jouerait un rôle crucial dans les étapes précoces de formation du phagophore mais que sa présence est fortement dépendante de la protéine Beclin1. Outre son interaction avec Beclin1, on sait également que la protéine ATG14L joue un rôle dans l'activation de la kinase VPS34 qui est aussi cruciale pour la formation de l'autophagosome. De plus, il a été montré que la surexpression de la protéine Beclin1 avait un effet positif sur l'activation de VPS34 et ce de

manière dépendante d'ATG14L. On sait maintenant que le complexe stable entre ATG14L et Beclin1 permet la régulation de l'autophagie via les kinases VPS34-VPS15 (Itakura *et al.*, 2008).

UVRAG

UVRAG comme *Beclin1* est un gène suppresseur de tumeur et contribue à l'initiation de la formation du phagophore. *UVRAG* contient un domaine d'interaction avec la protéine *Beclin1* (Figure 6). Une forte proportion de la protéine *UVRAG* est présente dans le complexe *Beclin1-VPS34-VPS15*. Le fait que la protéine *UVRAG* interagisse avec le complexe, exclut de fait la présence d'ATG14L. En effet, il se crée une exclusion mutuelle entre *UVRAG* et ATG14L pour se lier à la protéine *Beclin1*, due à la liaison au niveau d'un site d'interaction commun de ces deux protéines sur la troisième. Il a été montré récemment qu'il y avait une proportion plus importante, dans la cellule, du complexe *Beclin1-UVRAG* comparé au complexe *Beclin1-ATG14L*. On peut conclure que le complexe *Beclin1-UVRAG*, en condition normale, est plus actif que le complexe *Beclin1-ATG14L*. Dans la formation de la vésicule autophagique, il est rapporté que la protéine *UVRAG* agit en synergie avec *Beclin1* afin de participer à l'initiation de la formation de la membrane du phagophore (Sun *et al.*, 2008). Il est également démontré qu'*UVRAG* exerce une action indépendante de *Beclin1*. Elle joue un rôle direct dans la maturation de l'autophagosome, qui sera évoquée dans le paragraphe dédié.

Source de la membrane autophagique

Bien que le rôle d'ATG9 dans la formation du phagophore soit admis, la source membranaire des structures autophagiques a longtemps fait débat. Chez la levure, la source membranaire du phagophore est connue : elle dérive de la structure du pré-autophagosome (PAS), à membrane unique (Kim *et al.*, 2002). Le PAS est formé chez la levure à partir de regroupement de vésicules et de tubules qui présentent tous Atg9 à leur surface. Cette structure est appelée réservoir Atg9. Chez les mammifères, en revanche, l'origine de la membrane semble multiple. Cette membrane, qui forme le phagophore, n'est pas une membrane nouvellement synthétisée. Elle serait plutôt le fruit d'un recyclage de membranes qui proviendraient d'organelles préexistantes dans la cellule telles que le RE, les endosomes, les mitochondries, voire la membrane plasmique.

La source de membranes pour la formation du phagophore, la mieux décrite, est le RE (Figure 7). Plusieurs protéines ATGs telles ULK1 et ATG14L, impliquées dans la formation de la membrane du phagophore, sont localisées dans le RE. Cette localisation est accentuée en cas de carence en acides aminés. Les membranes isolées émergeraient en particulier d'une structure appelée omegasome (Figure 7), qui est un sous-domaine du RE riche en PI3P. Axe et son équipe ont identifié la protéine DFCP1 localisée dans le RE, capable d'interagir avec la PI3P (Axe *et al.*, 2008). En cas de carence en acides aminés, DFCP1 se lie à la membrane du RE grâce au PI3P et recrute ainsi ATG14L. A partir de

ce moment, la protéine DFCP1 recrutée à la membrane du RE, engage ATG14L et ULK1 afin d'initier la formation de la membrane de l'autophagosome. La formation du phagophore peut se poursuivre.

D'autres sources de membrane existent, car il n'y a pas colocalisation absolue entre les omegasomes et les phagophores lors de l'induction de l'autophagie par une carence en acides aminés (Axe *et al.*, 2008). En effet, la mitochondrie serait également à l'origine d'une partie de la membrane du phagophore (Hailey *et al.*, 2010). Des expériences ont prouvé qu'une partie des portions de membranes mitochondriales (Figure 7), étiquetées d'une séquence fluorescente spécifique, pouvait être détectée ensuite au niveau des phagophores. De nombreuses interactions physiques existent entre le RE et les mitochondries. Cette proximité est importante pour l'efflux de calcium du RE vers le cytosol, le transfert de lipides entre ces deux organelles et la fission mitochondriale. De manière intéressante, la protéine ATG5 impliquée dans l'élongation de la membrane du phagophore, colocalise à 98% avec le RE et 79% à proximité des membranes mitochondriales. ATG5 et DFCP1 apparaissent ensemble dans la fraction de membrane isolée du RE associée aux mitochondries (MAM). Lorsque l'on délète une protéine impliquée dans l'assemblage de cette MAM, on observe un défaut dans le recrutement de la membrane nécessaire à la formation de l'autophagosome. De plus, certaines protéines résidentes du RE telle que la syntaxine 17 (STX17) faisant partie de la famille des « soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor » (SNARE), ont été identifiées comme effectrices d'ATG14L. Dans le contexte de l'autophagie, STX17 joue deux rôles : elle permet le recrutement d'ATG14L mais agit aussi au niveau de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome. Dans ce modèle, lors d'une carence en acides aminés, STX17, présente sur la membrane du RE, recrute le complexe ULK1/FIP200. Cette formation permet l'association STX17/ATG14L et ainsi STX17 se relocalise entre le RE et la mitochondrie. Dans ce cas, ATG14L peut recruter le complexe Beclin1-VPS34-VPS15, autre complexe servant à l'initiation du phagophore.

L'autre source de membrane décrite pour le phagophore est la membrane plasmique (Figure 7). La formation de l'autophagosome est liée aux mécanismes d'endocytose, en particulier celui assisté par les clathrines. Les vésicules d'endocytose nouvellement formées sont appelées endosomes précoces, puis deviennent endosomes matures et enfin endosomes tardifs, après fusion avec des vésicules prélysosomales provenant de l'appareil de Golgi. Une fois formé, le manteau de clathrine de l'endosome peut se lier à une protéine de l'autophagie, ATG16L1, protéine impliquée dans l'élongation de la membrane autophagique, présente au même moment qu'ATG5. De ce fait, une partie de la membrane de l'endosome peut recruter les protéines autophagiques nécessaires à la formation du phagophore en cas d'une forte induction de l'autophagie. Dans ce cas, un apport important de lipides membranaires est nécessaire et la membrane plasmique constitue une réserve considérable (Ravikumar *et al.*, 2010a). La nature de la membrane d'un phagophore peut donc être multiple, mais provient d'organelles déjà préformées des cellules.

1.2.2.4 Elongation, deux systèmes de conjugaison liés à l'ubiquitine.

Après la phase d'initiation réalisée grâce aux complexes ULK1-ATG13-FIP200-ATG101 et Beclin1-VPS34-VPS15, la phase d'élongation est également réalisée grâce à deux systèmes : le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1 et la protéine LC3.

Le complexe ATG12-ATG5-ATG16L1

Ce système de conjugaison constitué par des protéines « ubiquitine-like » a été initialement décrit par Noboru Mizushima (Mizushima *et al.*, 1998) et inclut trois protéines clés, Atg5, Atg12 et Atg8. Les trois protéines sont bien conservées dans l'évolution, de la levure à l'Homme. L'expérience initiale de N. Mizushima et ses collègues a permis de visualiser par immuno-empreinte une occurrence de bandes de MM supérieure à celle attendue pour Atg12. Il s'est avéré que cette détection correspondait à la protéine Atg12 conjuguée de manière covalente à Atg5. Ces bandes disparaissaient lorsque des levures déficientes pour les gènes *atg5*, *atg7* et *atg10* étaient utilisées. Atg12 est une molécule unique « ubiquitine-like » dont la MM est 2,5 fois celle de l'ubiquitine. Elle est synthétisée sous sa forme inactive sans son repliement « ubiquitine-like » en partie C-terminale. Atg12 est liée de façon covalente à la protéine Atg5 grâce à un isopeptide qui crée une liaison entre la glycine en C-terminale d'Atg12 et un résidu lysine au milieu la séquence de la protéine Atg5. La réalisation de la conjugaison entre ces deux protéines est le résultat d'une réaction de catalyse par deux protéines additionnelles, Atg7 et Atg10. Atg7 est une protéine homologue fonctionnelle de l'ubiquitine ligase E1, Uba1. La fonction d'Atg10 est similaire à l'ubiquitine ligase E2 mais néanmoins ne partage pas d'homologie de séquence avec cette dernière. De manière équivalente au mécanisme d'ubiquitylation, Atg7 hydrolyse l'ATP, il en résulte une activation d'Atg12 grâce à une liaison thioester forte en énergie entre la glycine en C-terminal d'ATG12 et la cystéine active en position 507 d'Atg7. Par conséquent, Atg12 est activée et est directement associée à la cystéine active 133 d'Atg7 de manière transitoire, pour former ensuite un complexe thioester Atg12-Atg10. Par la suite, Atg12 est transférée sur sa protéine cible Atg5 afin de former le complexe final, Atg12-Atg5. La conjugaison Atg12-Atg5 est essentielle pour l'élongation de l'autophagosome. Par la suite, ATG5 entretient une liaison non-covalente avec une autre protéine, la protéine ATG16L1, afin de former le complexe ATG12-ATG5/ATG16L1 (Kuma *et al.*, 2002). Ce complexe multimérique ATG12-ATG5/ATG16L1 présente une MM de 350 kDa (Figure 8). Ce complexe fonctionnel est indispensable pour l'élongation de l'autophagosome même si le rôle précis du conjugué ATG12-ATG5 dans la formation des membranes reste peu compris pour le moment. L'association d'ATG16L1 à la membrane plasmique peut mener à son internalisation par des voies d'endocytose pour être recrutée vers les structures précurseurs des phagophores comme souligné précédemment. Bien que l'importance d'ATG16L1

dans l'élongation de la membrane autophagique ait été bien admise depuis plusieurs années, des informations sur les rôles complexes de cette protéine ont été apportées bien plus tard par l'étude de la maladie de Crohn comme exposé plus loin. Par contre, il est maintenant connu que le complexe ATG12-ATG5/ATG16L1 et plus particulièrement la protéine ATG16L1, jouent un rôle essentiel dans le système de lipidation de la protéine LC3, préalable à son intégration dans la membrane de l'autophagosome. LC3 compose le deuxième élément de conjugaison nécessaire à l'élongation de la membrane de l'autophagosome.

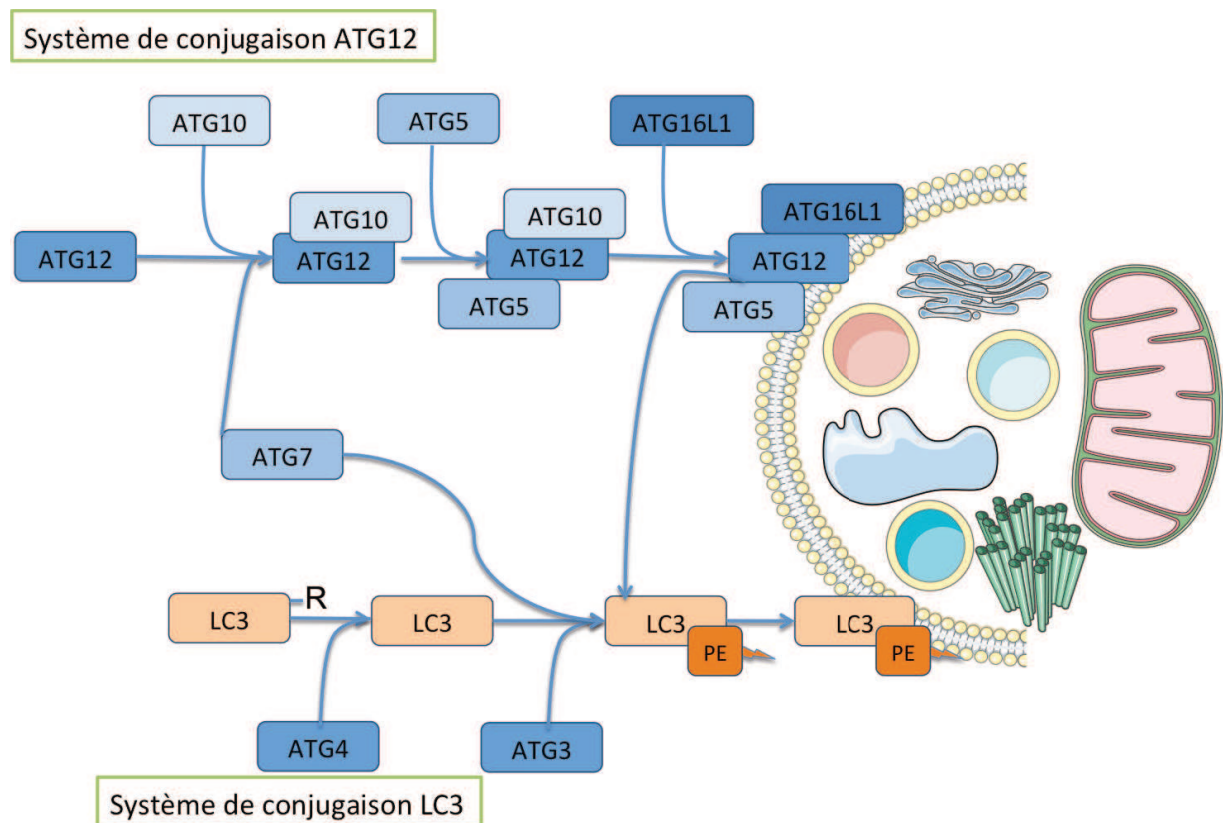


Figure 8 : Elongation du phagophore

La machinerie d'élongation est composée de deux systèmes de conjugaison, à savoir les systèmes ATG12 et LC3. Ils sont incorporés dans les membranes de l'autophagosome sous la forme d'un complexe ATG12-ATG5/ATG16L1 et sous forme lipidée pour LC3 après incorporation d'une phosphatidyléthanolamine (LC3-PE). La lipidation de LC3 est possible, suite au clivage via la protéine ATG4 et conjugaison à la PE grâce à ATG3. La conjugaison ATG12/ATG5 s'effectue grâce à l'action d'ATG10 avant liaison à ATG16L1. La formation des deux systèmes de conjugaison nécessite également l'activité de l'enzyme ATG7.

R-, Résidu d'arginine 117.

Le système de lipidation LC3

Peu de temps après la description du système de conjugaison ATG12-ATG5/ATG16L1 (Mizushima, 1998), un autre système de conjugaison nécessaire à l'élongation du phagophore a été découvert impliquant une autre protéine Atg, à savoir Atg8 (Ichimura *et al.*, 2000; Kabeya *et al.*, 2000). Ce

deuxième système de conjugaison est lié à la membrane lipidique de l'autophagosome par la phosphatidylethanolamine (PE ; Figure 8). Le résidu d'arginine 117 en position C-terminale de la protéine Atg8 nouvellement synthétisée est clivé par une protéase à cystéine, la protéine Atg4 (Kirisako *et al.*, 2000). Ce mécanisme expose un résidu glycine sur ATG8 qui va être liée à un résidu cystéine active en position 507 d'Atg7. Atg8 ainsi activée est transférée sur une autre protéine à activité ubiquitine ligase E2, Atg3, possédant un résidu cystéine 234 active via une liaison thioester. La région autour du résidu cystéine 234 d'Atg3 présente une homologie de la région correspondante à l'environnement d'un résidu cystéine 133 de la protéine Atg10. De ce fait, Atg8 est conjuguée à la PE grâce à une liaison amide entre la glycine en C-terminale et le groupe amine de la PE. Le complexe Atg8-PE est ancré dans la membrane. Contrairement au conjugué Atg12-Atg5, la formation du conjugué Atg8-PE est réversible. En effet l'activité d'Atg4 peut libérer Atg8 de sa cible lipidique. Atg8 ainsi libéré peut être recyclée et utilisée dans d'autres réactions de conjugaison. Les systèmes de conjugaison Atg12 et Atg8 ont été très conservés pendant l'évolution. Les homologues mammifères de chaque composant chez la levure, à savoir pour Atg12-Atg5, les protéines ATG5, ATG7, ATG10 et ATG12 ont été caractérisés chez les mammifères. Ils ont des fonctions similaires à la levure. La protéine mammifère ATG16L1, homologue d'Atg16 chez la levure, participe aussi à la formation du complexe Atg12-Atg5/AT16L1, complexe protéique d'environ 800kDa.

Il existe quatre familles d'homologues mammifères d'Atg8. La famille des MAP1LC3, souvent abrégé en LC3, renferme trois protéines, à savoir LC3A, LC3B, LC3C chez l'Homme. La famille GATES (« Golgi-associated ATPase enhancer ») est constituée de la protéine GATE-16 et la famille GABARAP (« γ -amino-butyricacid receptor-associated protein ») renferme deux membres, GABARAP et GABARAPL1. Enfin la protéine ATG8L est le membre unique de la dernière famille. Toutes ces protéines ont conservé un résidu glycine près du résidu C-terminal et sont conjuguées de la même manière à la PE. Les isoformes de la protéine LC3 sont des protéines localisées à la membrane des structures autophagiques, présentes de la formation de l'autophagosome à la génération des autolysosomes. Elles constituent un marqueur validé pour étudier l'autophagosome et évaluer l'activité de la machinerie autophagique.

Pendant la formation de l'autophagosome, le complexe ATG12-ATG5/ATG16L1 et LC3-PE se localisent près de la zone de formation l'autophagosome (Figure 8). Des expériences de microscopie électronique montrent que les deux conjugués décoorent la membrane du phagophore (Kirisako *et al.*, 1999). Le complexe ATG12-ATG5/ATG16L1, d'une part, se trouve à l'extérieur de la membrane du phagophore et se maintient dans le cytosol avant et après la formation de l'autophagosome suggérant un rôle dans l'origine de l'expansion et de la courbure de la membrane du phagophore naissant. Le complexe se dissocie de la membrane à la fermeture de l'autophagosome. D'autre part, la protéine LC3-PE est localisée à la fois à l'intérieur et à l'extérieur de la membrane du phagophore.

La partie de complexe LC3-PE qui se trouve à la surface externe du phagophore, peut être partiellement recyclée de la membrane par la protéine ATG4. Les molécules LC3-PE se trouvant à l'intérieur de la membrane sont quant à elles éliminées lors de la fusion de la vésicule autophagique et des lysosomes. Le complexe LC3-PE est un bon candidat pour quantifier l'expansion de la membrane autophagique, car il peut être détecté du début du processus autophagique jusqu'à la dégradation lysosomale.

ATG7 est une enzyme de type ubiquitine ligase E1 (unique) qui participe aux deux systèmes de conjugaison, ATG12-ATG5/ATG16L1 et LC3. Elle transfère ces deux protéines vers des enzymes E2 différentes. Récemment, Noda *et al.* ont approfondi la connaissance de l'action de cette enzyme grâce à la détermination de sa structure. Il est évident que le système ATG12-ATG5/ATG16L1 est nécessaire à la formation de LC3-PE. En fait, ATG12-ATG5 fonctionne comme une enzyme E3 et est donc capable de favoriser la lipidation de la protéine LC3 (Noda *et al.*, 2013). Cela nous indique qu'une grande partie des gènes *Atgs* sont impliqués dans cette réaction de conjugaison. Le rôle précis de la forme lipidée de LC3 dans la formation de l'autophagosome n'est pas encore totalement élucidé. Il est suspecté que la protéine LC3-PE intervienne dans l'hémi-fusion de la membrane autophagique comme suggéré par les expériences *in vitro* de Y. Ohsumi et son groupe utilisant des liposomes en guise de membranes (Nakatogawa *et al.*, 2007). LC3 est quoiqu'il en soit indispensable à la formation de l'autophagosome *in cellulo*.

1.2.2.5 La maturation

L'étape de maturation permet la dégradation du contenu de la vésicule autophagique grâce à la fusion de l'autophagosome ou de l'amphisome et des lysosomes. Cette étape, terminale du flux autophagique est régulée à plusieurs niveaux. La régulation intervient au niveau de la fusion des autophagosomes et des lysosomes jusqu'au recyclage des différentes protéines autophagiques à la fin de ce processus.

UVRAG et Rubicon

La protéine UVRAG a été mentionnée précédemment lors de la formation du phagophore. Nous avons vu jusqu'à présent des protéines, comme UVRAG, qui se lient au complexe Beclin1-VPS34-VPS15 et qui participent à l'activation de la formation du phagophore. D'autres protéines peuvent s'associer à ce complexe et exercent une action inhibitrice sur l'autophagie mais à un stade plus tardif. C'est le cas de la protéine Rubicon (Matsunaga *et al.*, 2009; Zhong *et al.*, 2009). Elle contient un domaine de liaison avec Beclin1 et VPS34. Rubicon est capable de s'associer à la fois avec le

complexe Beclin1-ATG14L ou Beclin1-UVRAG. De plus, on sait maintenant que Rubicon et UVRAG peuvent être associées dans le complexe créant un ensemble Beclin1-VPS34-VPS15-UVRAG-Rubicon. Comme mentionné dans le paragraphe précédent, UVRAG peut être lié au complexe Beclin1-VPS34-VPS15 sans Rubicon. La réciproque n'est pas vraie : Rubicon aura tendance à se lier au complexe Beclin1-VPS34-VPS15 lorsque UVRAG est présent dans celui-ci. De ce fait, Rubicon, via UVRAG peut interagir avec la protéine Beclin1. Rubicon intervient dans les étapes tardives de la formation de l'autophagosome. Ainsi, dans ce cas, lors d'une surexpression de Rubicon dans des cellules HEK293, celles-ci contiennent un grand nombre d'autophagosomes immatures. Cela suggère que la protéine Rubicon empêche la maturation des autophagosomes. Il a été démontré que Rubicon avait pour fonction de diminuer l'activité kinase de VPS34. En effet, la délétion du gène Rubicon augmente le nombre d'autolysosomes et non pas d'autophagosomes. Rubicon est bien une protéine capable de bloquer l'autophagie en diminuant la formation d'autophagosomes matures.

Les interactions d'UVRAG et Rubicon avec Beclin1 interviennent donc dans la régulation de la formation et de la maturation de l'autophagosome. Beclin1 régule de ce fait l'autophagie à deux niveaux (Figure 3).

« *Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors* » (SNARE)

Les protéines SNAREs sont des éléments intracellulaires régulant l'adressage et la fusion des membranes lipidiques. La protéine SNARE Vti1b est impliquée dans les stades tardifs de la formation de l'autophagosome. Une étude portant sur l'implication de la maturation des vacuoles autophagiques montre que cette dernière est retardée dans des hépatocytes de souris lorsque Vti1b est délété (Atlashkin *et al.*, 2003). De plus, il a été démontré que VAMP3 et VAMP7 (Figure 9), deux protéines SNARE, contrôlent la fusion entre les autophagosome et les MVBs et favorisent la fusion des amphisomes avec les lysosomes (Fader *et al.*, 2009). Dernièrement, la syntaxine 17 a été identifiée comme une SNARE lié à l'autophagososome requise pour la fusion de celui-ci et des lysosomes chez les mammifères. De plus, cette étude montre que la syntaxine forme des liaisons directes avec le complexe HOP (composé de VPS33 et VPS16). Ce complexe joue un rôle important dans la fusion autophagosome/lysosome, grâce à son interaction avec la syntaxine 17 (Jiang *et al.*, 2014).

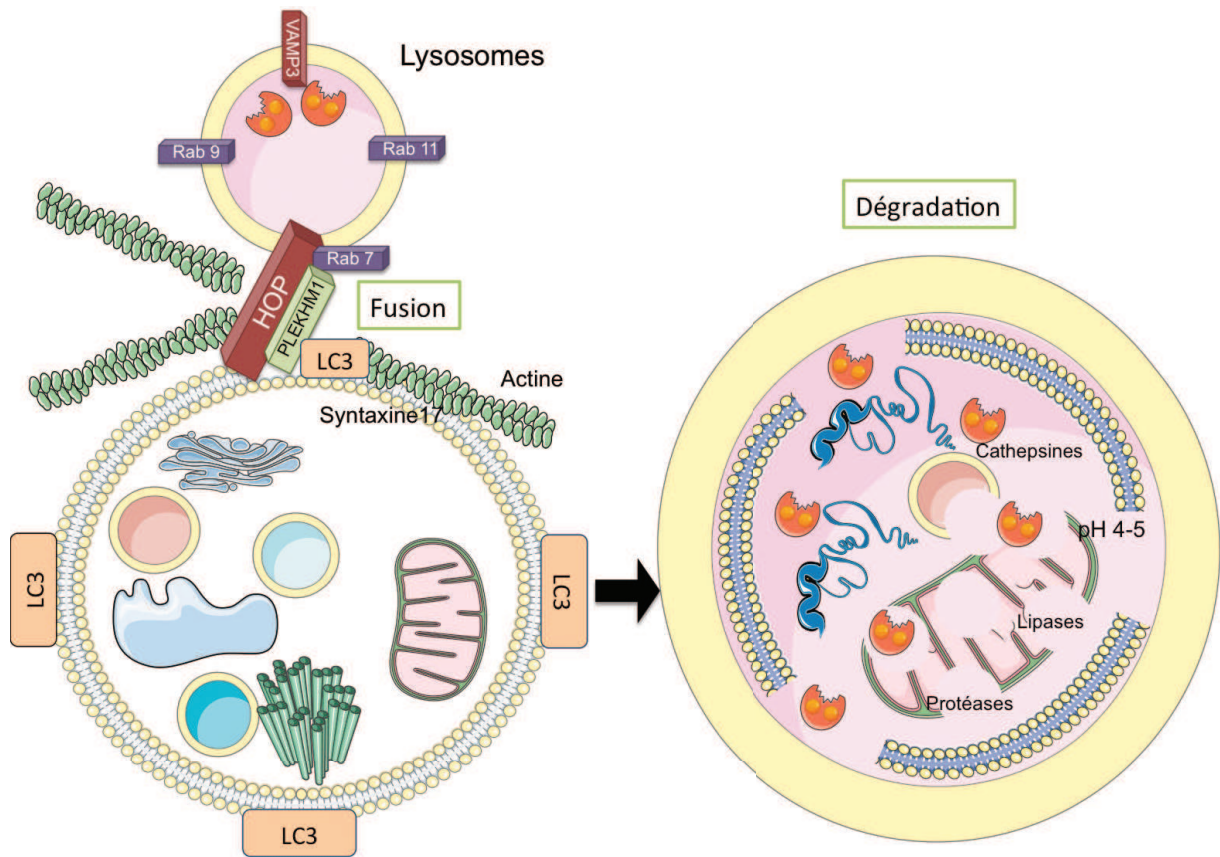


Figure 9 : Maturation du phagosome

La maturation est la dernière étape de formation de l'autophagosome. L'adressage de ces deux vésicules, autophagosomes/lysosomes est réalisé entre autres par les protéines SNARE/Rab et les composants du cytosquelette tels que l'actine. La fusion en elle-même est réalisée par l'interaction de PLEKHM1, protéine effectrice de RAB7, avec la protéine LC3. De plus, PLEKHM1 interagit de manière directe avec les protéines HOP. Ce complexe qui interagit de plus avec Rab7 forme un ensemble qui permet la fusion entre l'autophagosome et les lysosomes. Cette fusion crée une vésicule appelée autolysosome dans laquelle sera dégradé le contenu cytoplasmique séquestré.

Les protéines Rab

Les protéines Rab interviennent dans la régulation du trafic intracellulaire des domaines membranaires et participent à la dynamique des membranes (Figure 9). Le rôle de la protéine Rab7 est démontré dans l'étape de maturation de l'autophagosome (Gutierrez *et al.*, 2004b; Jager *et al.*, 2004). Ce mécanisme est dépendant de l'interaction de la protéine VPS de classe C avec UVRAG (Liang *et al.*, 2008). Cette fonction de UVRAG est indépendante de sa liaison avec Beclin1. Elle induit dans ce cas l'activité GTPase de Rab7 et favorise la fusion de l'autophagosome avec les lysosomes. La protéine Rab11, quant à elle, est requise pour la fusion de l'autophagosome et des MVBs (Fader *et al.*, 2008). Ces résultats suggèrent que la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes requiert la présence de différentes protéines Rab. Récemment, une étude a caractérisé une protéine effectrice de Rab7, PLEKHM1 (protéine initialement connue pour sa liaison avec LC3), comme

pouvant se lier à HOP (Figure 9). Cette étude démontre que PLEKHM1 est un effecteur spécifique pour la fusion de l'autophagosome et des lysosomes, grâce aux protéines LC3, Rab7 et au recrutement du complexe HOP au niveau du site de contact (McEwan *et al.*, 2015).

« *Endosomal sorting complex required for transport* » (ESCRT)

La protéine ESCRT participe à la biogénèse des MVBs et intervient dans l'endocytose. Il a été récemment montré que le complexe ESCRT III était nécessaire à la fusion de l'autophagosome avec les MVBs et les lysosomes. Ceci génère ainsi un amphisome ou un autolysosome (Filimonenko *et al.*, 2007; Lee *et al.*, 2007b; Rusten *et al.*, 2007). Le dysfonctionnement d'ESCRT III est associé à une dérégulation de l'autophagie dans les maladies neurodégénératives. La protéine Hsr, substrat d'une tyrosine kinase qui régule des facteurs de croissance dans les hépatocytes, joue également un rôle majeur dans la voie endosomale en amont du complexe ESCRT. Hrs contient un domaine FYVE qui se lie à PtdIns3P et facilite la maturation de l'autophagosome (Tamai *et al.*, 2007). Cette liaison est nécessaire pour la formation et la maturation de l'autophagosome.

Les protéines LAMP

Les protéines LAMP appartiennent à la famille des protéines transmembranaires endo/lysosomales, elles sont très glycosylées. La dégradation autophagique est réduite dans des souris déficientes pour *Lamp2*, spécifiquement dans les hépatocytes (Tanaka *et al.*, 2000). En revanche, on ne retrouve pas cette réduction de la dégradation autophagique dans des fibroblastes de souris déficientes pour *Lamp2* (Eskelinen *et al.*, 2004), suggérant une importance tissu-spécifique de la protéine dans le processus autophagique. De manière intéressante, une double déficience de LAMP1 et LAMP2 dans ces fibroblastes induit un blocage dans les stades tardifs de la formation de l'autophagosome. La différence de l'activité autophagique observée entre les hépatocytes et les fibroblastes pourrait ainsi être due à une redondance de fonction entre LAMP1 et LAMP2 dans les fibroblastes, que l'on ne retrouverait pas dans les hépatocytes.

DRAM

DRAM est une cible directe de p53 (Crighton *et al.*, 2006). C'est une protéine transmembranaire du lysosome. Elle pourrait donc jouer un rôle dans les stades tardifs de l'autophagie. Son rôle le mieux décrit est cependant lié à la formation du phagophore. Ainsi, au-delà d'un rôle éventuel dans la maturation des autophagosomes, il est possible qu'un signal provenant du lysosome régule les stades précoces de la formation du phagophore. L'inactivation des programmes de mort cellulaire est une étape importante dans le développement de la tumeur. p53 participe à la régulation de la mort cellulaire, en particulier en condition de stress génotoxique. Il a été montré que p53 est capable

d'induire l'autophagie via DRAM. En effet, postérieurement à la suppression de p53 dans une lignée cellulaire RKO (cellule provenant d'un carcinome) par un « petit ARN à épingle à cheveux » shARN, DRAM n'est pas induite alors qu'il l'est dans les cellules contrôle. Cela montre une forte dépendance de p53 dans l'induction de DRAM.

Le rôle du cytosquelette dans l'autophagie

Le cytosquelette participe à l'édification de l'architecture tridimensionnelle de la cellule, mais également au trafic, au mouvement et à la division cellulaires. Le cytosquelette est constitué de quatre composants majeurs: les filaments d'actine, les microtubules, les filaments intermédiaires et la septine intervenant tous à divers niveaux dans le mécanisme d'autophagie.

L'actine est une protéine multifonctionnelle qui forme un filament. Pour générer ce filament, les chaînes d'actine sont polymérisées via un mécanisme dépendant de l'hydrolyse de l'ATP, pour former une hélice polarisée. Lors de l'induction de l'autophagie en cas de carence en acides aminés, l'actine a été montrée comme étant impliquée dans la génération de PI3P nécessaire à la formation du phagophore (Aguilera *et al.*, 2012). La protéine WASH, de la grande famille des « Wiskott-Aldrich syndrome protein » (WASP), est un facteur qui promeut la nucléation (NPF) du complexe « actin-related protein 2/3 », nécessaire au trafic d'ATG9 vers le membrane du phagophore (Zavodszky *et al.*, 2014). De plus, lors de l'activation de l'autophagie indépendamment d'une carence en nutriments, l'actine a été montrée comme nécessaire à la fusion de l'autophagosome et du lysosome (Lee *et al.*, 2010b). En résumé, ces observations montrent que l'actine peut intervenir dans la liaison des membranes du phagophore mais également réguler la fusion entre l'autophagosome et le lysosome (Figure 10).

Les microtubules ont un rôle majeur dans le dynamisme de la cellule. Ils sont formés de polymères de tubuline, plus précisément constitués de 13 profils d' α tubuline et de β tubuline. Ils sont polarisés grâce à l'hydrolyse de GTP. Lors d'un stress énergétique, l'utilisation d'inhibiteurs de polymérisation de la tubuline bloque la formation de l'autophagosome (Fass *et al.*, 2006). En effet, les microtubules facilitent le trafic et participent à la biogénèse d'autophagosomes (Figure 10). De plus, ils favorisent la fusion de l'autophagosome et du lysosome. Il a été montré que dans des hépatocytes de rat, les microtubules permettent la fusion des vésicules autophagiques et d'endosomes (Kochl *et al.*, 2006). Les microtubules ne sont pas seulement impliqués dans l'initiation mais également dans la maturation et la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Yu and Marzella, 1986). Pour interagir avec l'autophagosome, la protéine motrice dynéine, est requise pour le trafic de l'autophagosome le long du microtubule (Jahreiss *et al.*, 2008). L'autophagosome peut se déplacer le long du microtubule en direction de la zone où se concentrent les lysosomes près du centre organisateur des microtubules (MTOC) (Kimura *et al.*, 2008). La mutation de la dynéine (par

délétion du gène « dynein heavy chain 1 gene » (*Dnchc1*), bloque la dégradation d'agrégats protéiques et peut favoriser l'émergence de maladies neurodégénératives telles que la maladie de Huntington (Ravikumar *et al.*, 2005). La dynéine se lie aux autophagosomes grâce à des protéines de la famille LC3. En effet les microtubules interagissent de manière directe avec LC3, comme leur nom l'indique (Pankiv *et al.*, 2010). Ces interactions mettent en évidence la participation des microtubules également aux étapes précoces du mécanisme autophagique. Il est maintenant clair que, grâce à la protéine WIP1, les microtubules sont capables de véhiculer des fragments de membrane sur le lieu d'assemblage de l'autophagosome. De plus, les microtubules sont capables d'activer l'autophagie par deux complexes, à savoir mTORC1 et la PI3K de classe 3. mTOR se situe initialement sur la face cytosolique du lysosome et son activité est contrôlée par la localisation des lysosomes (Sancak *et al.*, 2010). Certains activateurs de mTOR se trouvent sur la membrane lysosomale telle que la protéine Rheb. Cette localisation est organisée par les microtubules. Lors d'une situation où les nutriments sont disponibles, les microtubules relocalisent les lysosomes à la périphérie de la cellule ; mTORC1 reste actif et empêche la formation de l'autophagosome. Par contre lors d'une carence en acide aminé, mTORC1 est dans ce cas inactif et la formation de l'autophagosome commence. Le pH du cytoplasme augmente et les microtubules créent un mouvement centripète permettant d'allonger la membrane de l'autophagosome dans une trajectoire circulaire. L'autophagie est initiée (Korolchuk *et al.*, 2011; Pous and Codogno, 2011).

Les filaments intermédiaires sont la structure majeure dans le maintien de l'intégrité des cellules mammifère. Ces protéines forment ensemble une sous-unité tétramérique formé de deux dimères de filament intermédiaire, l'assemblage de ces sous-unités forme un filament qui compte huit tétramères. La formation de ce filament, non polarisé, ne nécessite pas d'hydrolyse de nucléotides. Ces filaments sont plus stables que l'actine et les microtubules. De ce fait, ils sont moins dynamiques. Les filaments intermédiaires de vimentine agissent comme des inhibiteurs de la dynamique autophagique en se liant avec la protéine Beclin1 (Wang *et al.*, 2012), protéine cruciale de l'initiation. La phosphorylation de la protéine Beclin1 par la protéine kinase Akt forme un complexe Beclin1/vimentine inhibant le rôle initiateur de l'autophagie de Beclin1 (Figure 10).

Le dernier composant du cytosquelette est la septine. C'est une protéine associée à la GTP conservée et associée aux membranes, filaments d'actine et microtubules. Elle forme un filament non polarisé et rond. Il a été démontré que le recrutement de composants autophagiques, tels que p62 et LC3, sur leur site de fonction, peut être réduit lorsque la septine est inhibée (Mostowy *et al.*, 2010). Elle sert également à maintenir la structure et la taille de l'autophagosome (Figure 10).

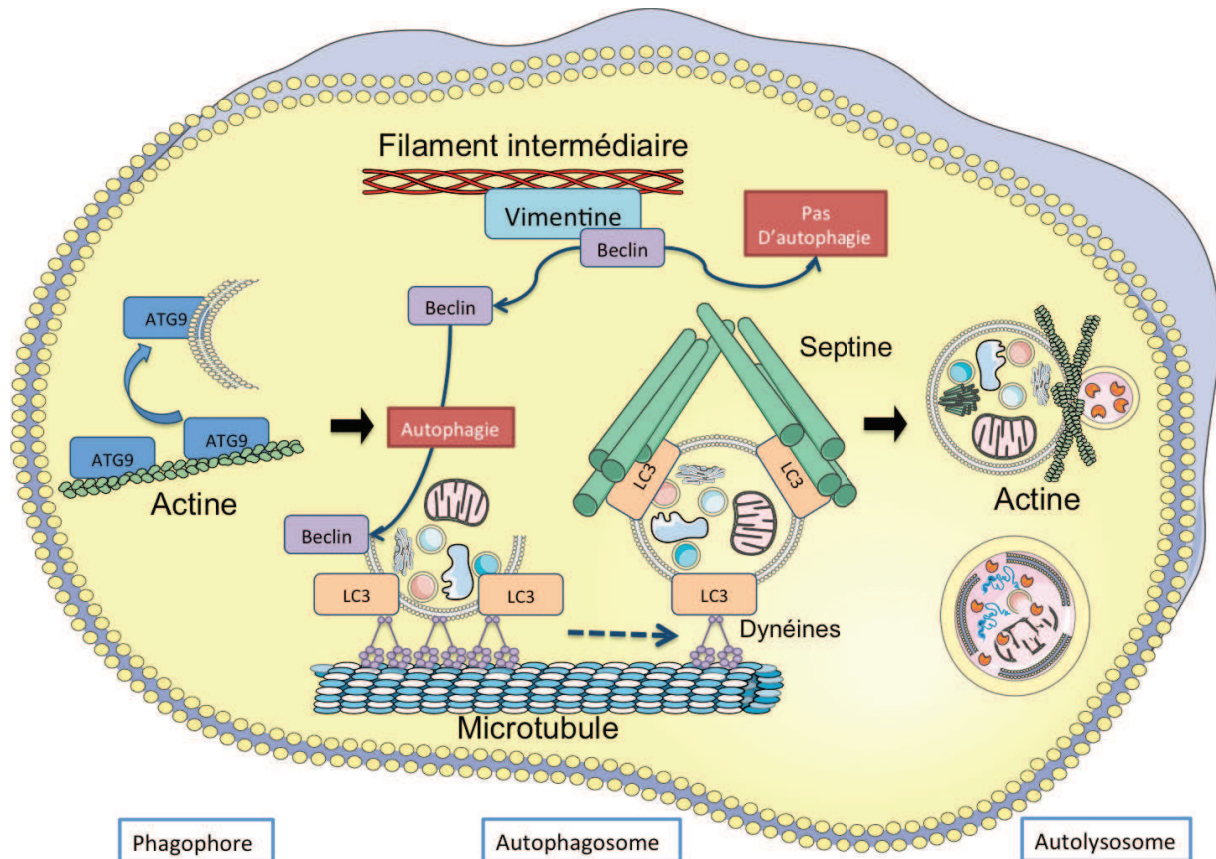


Figure 10 : Rôle du cytosquelette dans la dynamique de l'autophagie

Lors de l'initiation du phagophore, ATG9 est une protéine transmembranaire qui sert au recrutement de la membrane. La polymérisation de l'actine permet le mouvement de la protéine ATG9 vers le site d'assemblage du phagophore.

Lors de l'étape d'élongation, les microtubules et la dynéine dirigent l'autophagosome vers la zone où sont concentrés les lysosomes. C'est la protéine LC3 qui crée le lien entre les microtubules et l'autophagosome. De plus, pendant cette étape, la septine contrôle la taille et la structure de l'autophagosome. Elle permet également le recrutement des protéines autophagiques telles que LC3 afin de faciliter la formation de l'autophagosome. Au contraire, la phosphorylation de la protéine Beclin1 par la protéine kinase Akt peut promouvoir l'association de cette protéine avec la vimentine. Ce complexe inhibe le rôle pro-autophagique de la protéine Beclin1.

Lors de la maturation de l'autophagosome, dans le cas de l'autophagie sélective par l'ubiquitine, l'actine permet la fusion de l'autophagosome et des lysosomes.

1.2.2.6 Quantification du phénomène autophagique

Nous avons abordé au début de cette introduction les différentes étapes de la formation de l'autophagosome. C'est un processus dynamique qui fait intervenir plusieurs structures, à savoir, dans l'ordre chronologique, le phagophore, l'autophagosome, l'amphisome et/ou l'autolysosome. Le dynamisme même de l'autophagie est un processus complexe à décrire. En effet, il peut être modulé à plusieurs niveaux de manière positive ou négative. L'accumulation d'autophagosomes peut être mesurée principalement par trois techniques : la microscopie électronique à transmission (TEM), la

microscopie photonique à fluorescence ou l'immuno-empreinte (Klionsky *et al.*, 2012). La combinaison de ces techniques est souvent nécessaire pour décrire précisément le déroulement de l'autophagie. Ainsi, on peut en mesurer les variations d'activité dues à un différentiel d'induction, une réduction du recyclage des autophagosomes ou une augmentation de leur nombre, liée à une absence de dégradation.

La protéine LC3 est le marqueur couramment utilisé permettant de bien décrire le processus autophagique. En effet, la protéine LC3 est la seule protéine qui reste présente de la formation de l'autophagosome jusqu'au stade autolysosome. Il existe maintenant plusieurs manières de quantifier l'autophagie ; je décrirai ici brièvement le principe de trois techniques, la technique de microscopie optique, de microscopie électronique et la technique d'immuno-empreinte, que j'ai utilisé au cours de mes travaux de thèse.

La protéine LC3 peut être visualisée grâce à une étiquette qui exprimera une protéine fluorescente verte (GFP) en position N-terminale. Elle est utilisée pour suivre l'activité autophagique par mesure du nombre de structures ponctiformes de protéines LC3-GFP. La détection de la protéine LC3-GFP est souvent utilisée dans des expériences réalisées *in vivo* dans des organismes transgéniques ou *in vitro* sur des lignées cellulaires. Il est également possible d'utiliser des anticorps anti-LC3 afin de réaliser des expériences d'immunohistochimie ou immunofluorescence et de marquages sur lignées cellulaires ou cellules primaires *ex vivo*. Cette procédure présente l'avantage de ne détecter que les protéines endogènes cytoplasmiques. Cela permet d'éviter les approches par transfection ou la génération d'animaux transgéniques, impliquant de possibles observations artefactuelles dues à une surexpression de la protéine LC3-GFP.

La microscopie électronique est la première technique ayant permis de visualiser un autophagosome dans les années 1960. La microscopie électronique est une méthode qualitative et quantitative. En effet, elle peut distinguer les différents stades des vésicules autophagiques, le phagophore, l'autophagosome et l'autolysosome. Les critères d'identification de ces vésicules sont stricts (Hubbard *et al.*, 2010; Klionsky *et al.*, 2012). Pour cela, une vésicule est dite « autophagosome » lorsqu'elle remplit au moins deux de ces caractéristiques : avoir une double membrane (complète ou au moins partiellement visible), pas de ribosome associé sur la face cytosolique de la membrane, densité de la lumière de la vésicule similaire au cytosol, organelle ou portion d'organelle présent à l'intérieur de la lumière de la vésicule. Toutes les vésicules qui ont une taille similaire mais qui ont une simple membrane, avec une densité de la lumière de la vésicule plus faible que le cytosol, sont classées comme étant des autolysosomes.

La technique d'immuno-empreinte permet de détecter la protéine LC3 endogène (Mizushima and Yoshimori, 2007) mais également des protéines chimères LC3-GFP. La protéine LC3 est initialement synthétisée dans sa forme entière, dite pro-LC3. Cette protéine est convertie grâce à un processus de

protéolyse mené par la protéine autophagique ATG4, en une protéine plus courte où il manque plusieurs acides aminés de la partie C-terminale afin de former la protéine LC3 I. La protéine pro-LC3 est rarement détectable en condition normale car elle est rapidement clivée. Au contraire, la protéine LC3 est détectée, par immuno-empreinte, sous forme de deux bandes, l'une représentative de la forme appelée LC3-I qui est cytosolique et l'autre correspondant à la forme conjuguée à une PE nommée LC3-II. Cette dernière est présente sur la membrane du phagophore, de l'autophagosome et de l'autolysosome. Bien que la MM de la protéine LC3-II soit plus élevée que celle de la protéine LC3-I à cause de l'ajout d'une PE, la protéine LC3-II migre plus loin que la protéine LC3-I de par son hydrophobicité accrue. LC3-I est détectée sur le gel à une taille de 16kDa alors que LC3-II est détectée à une taille de 14kDa. La quantité de protéine LC3-II présente dans la cellule est corrélée à la quantité de membranes autophagiques. De plus, on sait maintenant que la protéine LC3 peut être associée à des structures non-autophagiques comme par exemple dans la « LC3 associated phagocytosis » (LAP) qui sera abordée plus loin dans mon manuscrit. On sait aussi que la protéine LC3 II est dégradée lors de la formation de l'autolysosome. En effet, la protéine LC3-II est présente à la fois à l'intérieur et à l'extérieur de la membrane de l'autophagosome. Lors de la formation de l'autolysosome, la protéine LC3-II, à l'intérieur de la membrane, est dégradée par les protéases lysosomiales et une partie de la protéine sur la membrane externe est recyclée via l'action d'ATG4. De ce fait, une diminution de la quantité de protéine LC3-II peut-être interprétée à tort comme une diminution de l'activité autophagique. Pour pallier à ce biais, des inhibiteurs de protéases lysosomiales sont couramment utilisés, telles que l'E64D et la pepstatine A, le NH₄Cl ou la chloroquine et ses dérivés. La dégradation de la protéine LC3-II est ainsi partiellement inhibée, bien que la protéine LC3-I ne soit pas affectée. Ainsi la comparaison des bandes correspondant à la protéine LC3 II en présence ou absence d'inhibiteur, permet de mesurer le flux autophagique.

1.2.2.7 Autophagie non canonique

Chacune des quatre étapes de la formation de l'autophagosome nécessite l'activation des protéines ATGs décrites précédemment. Il est également décrit qu'il est possible que la formation d'un autophagosome puisse être observée en absence de certains des composants canoniques de la machinerie autophagique.

Les complexes Beclin1-PI3K en association avec la protéine ATG14 permettent la formation de l'autophagosome ou régulent sa maturation par interaction avec UVRAG ou Rubicon. Il a été montré que la voie de signalisation qui mène à la formation de l'autolysosome ne nécessite pas toujours le complexe Beclin1-PI3K. Cela peut dépendre de la stimulation qu'il reçoit. Une forme d'autophagie non-canonique, indépendante de Beclin1, a été décrite dans des cellules qui avaient subi des

traitements pro-apoptotiques. L'autophagie indépendante de Beclin1 activée par une neurotoxine, induit une mort cellulaire neuronale. De plus, l'autophagie activée par le resveratrol (molécule anti-oxydante utilisée pour ses propriétés anti-tumorales), est corrélée avec la mort cellulaire de certains types de lignées tumorales humaines. Ce processus est indépendant de Beclin1 mais dépendant d'ATG7 et du conjugué ATG12-ATG5. Il est donc suggéré que des composants pro-apoptotiques induisent l'autophagie indépendamment de Beclin1 (Scarlati *et al.*, 2008).

Une initiation de l'autophagosome, sans intervention du complexe ULK a également été avancée. Ce phénomène a été observé dans des conditions de carence en glucose dans des fibroblastes embryonnaires murins (MEF) (Cheong *et al.*, 2011). Plusieurs équipes ont mis en évidence que la formation de l'autophagosome en réponse à un stress métabolique n'implique pas toujours l'activation de l'AMPK, dont l'activité inhibe mTORC1. Cette découverte suggère que l'initiation, par l'autophagie non canonique, peut être activée sans le « triptyque » AMPK/mTORC1/ULK1. Cela nous indique que la voie autophagique peut être induite par des voies multiples.

La formation de la protéine LC3-II n'est pas observée dans des cellules qui sont déficientes pour le gène *ATG5*. Par contre, si l'on traite ces cellules par l'étoposide, un agent pro-apoptotique, sur une longue période, il y a formation de phagophores et d'autophagosomes en absence d'*ATG5* (Nishida *et al.*, 2009). Ce phénomène serait basé sur une forme non-conventionnelle de lamination où les membranes autophagiques qui servent à la formation de l'autophagosome, proviendraient de l'appareil de Golgi. L'autophagie ne serait pas, dans ce cas, initiée par l'axe AMPK/mTORC1/ULK1, la formation du phagophore ne se ferait pas par l'intervention de la protéine *ATG9* mais par une GTPase monomérique, *RAB9*. En effet, la protéine *RAB9*, qui est impliquée dans le trafic vésiculaire entre l'appareil de Golgi et les endosomes tardifs, joue un rôle dans l'élongation de la membrane autophagique. Il résulte de ce mécanisme autophagique non canonique, une double membrane qui pourra à terme fusionner avec les lysosomes et dégrader son contenu. Cette forme d'autophagie est cruciale dans le tissu embryonnaire et a pour rôle de dégrader les mitochondries dans les érythrocytes *in vivo* (Nishida *et al.*, 2009). Les mitochondries érythroblastiques sont par ailleurs également dégradées par l'autophagie dépendante d'*ATG5* et *ATG7* (Mortensen *et al.*, 2010). Cela suggère qu'à la fois les autophagies canonique et non canonique contribuent à l'élimination des mitochondries durant la différenciation érythroblastique. Certains partenaires des *RAB*, comme les *SNARE*, ont été récemment montrés comme étant impliqués dans les étapes de fusion précoce de la formation de l'autophagosome (Moreau *et al.*, 2011; Nair *et al.*, 2011). Ceci suggère un mécanisme où *RAB9* est nécessaire à l'élongation de la membrane autophagique en absence d'*ATG5*. Par exemple, des cellules MEF déficientes pour *ATG5*, présentent des structures similaires aux autophagosomes et ces vésicules semblent être efficaces et opérationnelles pour dégrader des agrégats protéiques.

Réorganisation des membranes lors de la réplication de bactéries

La nature des protéines qui constituent la membrane autophagique peut varier lors de la séquestration d'un pathogène. Elle a été étudiée dans le cas d'une infection par la bactérie *Brucella abortus* qui cause la brucellose (Starr *et al.*, 2012). Cette bactérie se localise dans une vacuole endocytique appelée « brucella-containing vacuole » (BVC), mobile grâce aux protéines Sar1 et Rab2. La bactérie est alors dirigée vers le RE où elle pourra se répliquer. Lors de l'étape de post-réplication en cours d'infection dans des macrophages, la vacuole contenant la bactérie acquiert des propriétés de vésicules autophagiques. Ainsi, la formation de la BVC nécessite la machinerie d'initiation de l'autophagie et dépend d'ULK1, de Beclin1, d'ATG14L et de l'activité PI3K. Elle est en revanche indépendante de l'activité d'ATG5, d'ATG16L1, d'ATG7 et de LC3. Ce mécanisme n'est pas encore bien compris, mais des formes d'autophagie non canonique pourraient être impliquées dans ce mécanisme (Duran *et al.*, 2010; Kinseth *et al.*, 2007; Manjithaya *et al.*, 2010a).

2 Fonctions de l'autophagie dans l'homéostasie cellulaire

L'autophagie induite par une carence en acides aminés active une autophagie dite « non sélective ». En effet, dans ce cas, le contenu cytoplasmique de l'autophagosome qui sera ensuite dégradé n'est pas contrôlé par les molécules de sélection de la machinerie autophagique (Kopitz *et al.*, 1990). Elle sert essentiellement à dégrader des nutriments pour créer une source d'énergie pour la cellule.

L'autophagie peut impliquer une reconnaissance et un ciblage spécifique des organelles endommagées afin de les éliminer. Ainsi se multiplient les informations sur les différents signaux nécessaires à la reconnaissance de ces organelles par le mécanisme autophagique. Je focaliserai ce chapitre sur l'autophagie dite « sélective ».

2.1 Dégradation des agrégats protéiques par l'autophagie

2.1.1 Nature et organisation des agrégats protéiques

L'apparition d'agrégats protéiques perturbe le bon fonctionnement de la cellule. Le contrôle de la quantité de ces agrégats est un phénomène conservé dans l'évolution, de la bactérie à l'Homme. La séquestration et la dégradation de ces protéines partiellement dénaturées protège de la mort cellulaire et favorise le bon fonctionnement de la cellule. Plusieurs mécanismes aboutissent à la formation de protéines non fonctionnelles.

Certaines mutations détectées dans des pathologies humaines affectent directement le repliement des protéines comme par exemple l'atrophine ou la synucléine. Ces mutations peuvent participer à la physiopathologie de certaines maladies comme le diabète de type 2 (TIID) et certaines maladies neurologiques comme les maladies de Huntington, Parkinson et Alzheimer (Ross and Poirier, 2004). Des altérations dans le contrôle du repliement de ces protéines peuvent entraîner leur agrégation. Nous pouvons également citer l'exemple de la mutation dans le gène qui code pour la protéine de choc thermique α -crystalline, qui entraîne la formation de la cataracte, ou une mutation liée au gène qui code pour l'ubiquitine ligase Parkin E3, favorisant la maladie de Parkinson (Chin *et al.*, 2010; Olzmann *et al.*, 2007).

D'autres mutations aboutissent à des erreurs dans la traduction de certaines protéines, entraînant l'incorporation d'acides aminés erronés par rapport à la séquence de l'ARNm initial. Dans certains cas est également observé un mauvais assemblage de complexes protéiques. Ces deux phénomènes participent également de l'agrégation des protéines (Drummond and Wilke, 2008).

Les protéines sont soumises à divers stress environnementaux. Des variations de température peuvent entraîner, dans certains types cellulaires, la formation d'agrégats de protéines qui sont mal conformées, ces modifications étant réversibles. Le stress oxydatif en revanche induit des modifications de manière irréversible. Dans ce cas, la formation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) aboutit à la formation de radicaux libres, oxydant les protéines, favorisant leur mauvais repliement et leur agrégation.

Enfin, la senescence cellulaire est un facteur entraînant l'accumulation de protéines mal repliées. Par exemple, l'agrégation de protéines polyglutaminées dans le modèle *C. elegans* et la mutation de la superoxyde dismutase chez la souris mènent toutes deux à une forte agrégation de protéines, observée majoritairement durant le vieillissement de ces organismes (Morley *et al.*, 2002; Munch and Bertolotti, 2010; Wang *et al.*, 2009). Cela indique que lors de la senescence, le système de contrôle qualité des protéines, dirigé par des protéines chaperonnes devient partiellement déficient. De plus, les protéines carbonylées s'accumulent de façon progressive en formant des agrégats protéiques lors du vieillissement des levures (Erjavec *et al.*, 2007). Cela suggère que les cellules sénescents voient une réduction de leur capacité à dégrader ces protéines non fonctionnelles. Le vieillissement des individus est d'ailleurs corrélé avec le développement de maladies telles que la maladie d'Alzheimer, Huntington et Parkinson, maladies caractérisées par un défaut majeur dans la dégradation d'agrégats protéiques, comme il est dit plus haut.

Une accumulation d'agrégats protéiques dans une région du cytoplasme est appelée agrésome. La taille minimale d'un agrésome est de 1 μm (Garcia-Mata *et al.*, 1999; Johnston *et al.*, 1998). L'agrésome n'est pas permanent dans la cellule (Garcia-Mata *et al.*, 2002). L'agrésome est situé en retrait de l'enveloppe nucléaire, près du centre organisateur des microtubules (MTOC). Il est composé de vimentine mais sa structure et sa taille varient suivant le type cellulaire et les composants protéiques qui la composent. La formation de l'agrésome commence par le regroupement de petits agrégats en périphérie de la cellule. Ces petits agrégats peuvent se rassembler grâce à la dynéine se déplaçant le long des microtubules. Ce transport est réalisé grâce à l'enzyme « histone deacetylase 6 » HDAC6. Cette dernière permet le lien entre les chaînes polyubiquitinylées du substrat et la dynéine qui sert de moteur au déplacement le long du microtubule. Il est suggéré que la protéine Parkin, qui permet la dégradation de certains substrats, est la protéine qui reconnaît directement les protéines mal formées. HDAC6 est impliquée dans la réponse au stress énergétique en participant au complexe HDAC6-HSF1-HSP90, dont l'action limite le stress énergétique. (Kopito, 2000).

2.1.2 L'agrégation

La séquestration de protéines mal repliées, polyubiquitinylées formant un agrégat protège la cellule car elle mène à la dégradation de ces protéines devenues potentiellement toxiques. La dégradation des plus gros agrégats peut s'effectuer grâce à l'autophagie alors qu'au contraire, le protéasome permet l'élimination des protéines ubiquitinylées de petite taille, comme expliqué dans le paragraphe 1.1.2. Les gros agrégats vont d'abord être regroupés dans l'agrésome via le transport vers le MTOC. L'agrésome forme un regroupement de protéines à dégrader par le mécanisme autophagique. La protéine HDAC6 participe à la formation de l'agrésome et à sa destruction par l'autophagie. Si l'on supprime la protéine HDAC6 dans une lignée cellulaire A549 par des siRNA, la formation de l'agrésome est compromise (Kawaguchi *et al.*, 2003). HDAC6 est capable de lier les protéines ubiquitinylées en train de s'agréger et nécessaire pour leur formation. Le motif BUZ localisé dans le domaine N-terminal de l'ubiquitine (Olzmann *et al.*, 2007). Cette protéine interagit directement avec la dynéine qui est nécessaire au transport des protéines à dégrader le long du MTOC. Le transport, le long du microtubule, est une étape incontournable pour la formation de l'agrésome. Les protéines cibles sont transportées le long des microtubules vers la zone concentrée en lysosome en vue de leur dégradation (Fass *et al.*, 2006). HDAC6 est particulièrement requis pour la dégradation via l'autophagie en situation d'inhibition conjointe du protéasome. Cette protéine est nécessaire à la fois pour recruter les agrégats protéiques qui seront dégradés par l'autophagie et pour le transport des lysosomes (Iwata *et al.*, 2005; Pandey *et al.*, 2007). La dégradation sélective des protéines agrégées par l'autophagie est appelée agrégation. L'autophagie sélective des protéines agrégées émerge comme un contrôle qualité des plus importants dans une cellule.

A l'origine, l'excès d'agrégats protéiques a été impliqué dans les maladies dégénératives (Iwata *et al.*, 2005; Ravikumar *et al.*, 2004; Webb *et al.*, 2003). De façon intéressante, HDAC6, contrôle également une étape de la formation de l'autophagosome. Cette étape est la fusion de l'autophagosome et des lysosomes ainsi que dans la mobilisation de l'actine, nécessaire à la fusion vésiculaire (Lee *et al.*, 2010b). La preuve du rôle de l'autophagie dans la dégradation des protéines non fonctionnelles vient de l'observation que la délétion des gènes *Atg5* ou *Atg7* dans les cellules hépatiques ou du cerveau, mène respectivement à un dysfonctionnement hépatique ou à une neurodégénération. En effet, les souris déficientes pour ces gènes accumulent des agrégats protéiques (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2006; Komatsu *et al.*, 2005). L'autophagie est dans ce cas importante pour la prévention de neurodégénérescences car elle permet l'élimination de protéines non fonctionnelles potentiellement toxiques pour la cellule (Korolchuk *et al.*, 2009). Les dégradations des protéines non fonctionnelles

par l'autophagie et le protéasome sont interconnectées. Si le protéasome est non fonctionnel, un mécanisme compensatoire via l'autophagie est mis en place (Iwata *et al.*, 2005; Pandey *et al.*, 2007). Le premier récepteur de l'autophagie sélective identifié est la protéine SQSTM1/p62 (Bjorkoy *et al.*, 2005; Komatsu *et al.*, 2007; Pankiv *et al.*, 2007). La protéine SQSTM1/p62 sert de protéine cargo entre les protéines ubiquitinylées non fonctionnelles et l'autophagie (Figure 11). En effet, la protéine p62/SQSTM1 peut lier d'une part les protéines ubiquitinylées, grâce à son domaine « ubiquitine associated » (UBA) et d'autre part l'autophagosome, via à la protéine LC3, grâce à son domaine « LC3-interacting region » (LIR) (Bjorkoy *et al.*, 2005; Pankiv *et al.*, 2007). Ce récepteur de l'autophagie sélective a besoin de se lier de manière spécifique à un cargo mais également d'être associé au phagophore. De ce fait, il va pouvoir attirer le cargo à l'intérieur de l'autophagosome pour le dégrader.

On observe une accumulation de cette protéine contenant un domaine ubiquitine, dans des agrégats protéiques caractéristiques des maladies d'Alzheimer et de Parkinson. Il apparaît maintenant clair que p62 est utilisé comme substrat pour l'autophagie sélective, mais également comme récepteur des différents cargos que composent les agrégats protéiques du cytoplasme qui seront dégradés par l'autophagie. Il a été montré, dans une souris incompétente pour l'autophagie spécifiquement dans les hépatocytes, que la protéine p62 régule la formation d'agrégats protéiques, et est éliminée par l'autophagie (Komatsu *et al.*, 2007). Les agrégats protéiques s'accumulent et participent au développement de sévères hépatomégalies et diverses dysfonctions dans le foie (Komatsu *et al.*, 2007).

La protéine p62 est constituée de 440 résidus d'acides aminés et d'un domaine PB1 dans son domaine N-terminal, suivi d'un motif en doigt de zinc. Elle contient un domaine UBA en C-terminal. C'est grâce aux avancées dans le domaine de la cristallographie que le site de liaison entre p62 et LC3 a été découvert. Le motif des domaines protéiques se liant à la protéine LC3 est nommé « motif interagissant avec Atg8 » , AIM, chez la levure et LIR chez les mammifères (Noda *et al.*, 2010). Ce domaine est composé de résidu W-x-x-L (x=possible avec tout autre acide aminé) ; (Ichimura *et al.*, 2008; Noda *et al.*, 2008). Le motif LIR de p62 possède une extension en hélice β et forme ainsi un repliement intermoléculaire avec l'hélice β 2 de la protéine LC3-II. Les protéines de la famille LC3 présentent en partie C-terminale un domaine Ubl, caractérisé par un repliement ubiquitine et un bras additionnel en partie N-terminale avec deux hélices α fermant le domaine Ubl. Le peptide qui contient le domaine LIR est localisé à l'interface du bras N-terminal et du domaine Ubl. On observe deux poches hydrophobes, HP1 et HP2, dans le domaine Ubl de la protéine LC3, qui accueille les chaînes des résidus W et L présent dans le site du domaine LIR (Ichimura *et al.*, 2008; Noda *et al.*, 2010). Ces deux poches sont localisées du côté opposé du site hydrophobe. Des interactions

électrostatiques, qui impliquent deux des trois résidus D du motif LIR, les résidus basiques en N-terminal et le domaine Ubl de la protéine LC3, permettent l'interaction entre la protéine p62 et LC3 (Shvets *et al.*, 2014; Shvets *et al.*, 2008). p62 est constitutivement associée à LC3 *in cellulo* et est continuellement dégradée par l'autophagie. De ce fait p62 est un bon marqueur pour suivre le flux autophagique. Cette protéine est ancrée dans la membrane de l'autophagosome et est dégradée dans l'autolysosome. L'inhibition du flux autophagique est corrélée à une augmentation de la quantité de protéine p62. Au contraire, une diminution de la quantité de protéine p62 est associée à une activité autophagique accrue.

Plus récemment, une autre protéine a été identifiée comme étant impliquée dans un mécanisme similaire. Cette protéine récemment identifiée « neighbor of BRCA1 gene 1 » (NBR1), a été à l'origine clonée à partir d'un gène candidat pour l'antigène CA125 présent dans le cancer des ovaires. Etant donné qu'il présentait une similarité avec p62 et une liaison directe sur la protéine LC3, NBR1 a été étudié comme étant en relation avec le mécanisme autophagique. Au même titre que p62, NBR1 peut lier simultanément les protéines ubiquitinylées et la protéine LC3. Le transport des vésicules vers les compartiments lysosomaux nécessite à la fois SQSTM1/p62 et NBR1. Cela montre l'importance du rôle de l'autophagie dans la dégradation sélective des différents agrégats protéiques (Kirkin *et al.*, 2009b; Mizushima *et al.*, 2008; Nakatogawa *et al.*, 2009).

Plusieurs études montrent que la protéine NBR1 contient un domaine LIR fonctionnel en N-terminal capable de lier la protéine LC3. La présence de ce motif fait que, même en absence de p62, NBR1 interagit avec l'autophagosome et est également dégradé par l'autolysosome. L'inhibition de l'autophagie aboutit à une accumulation de la protéine NBR1 *in vivo* (Kirkin *et al.*, 2009a). NBR1 est capable de lier l'ubiquitine grâce à son domaine UBA. Comme p62, NBR1 joue un rôle de la liaison de protéines ubiquitinylées et mal repliées, afin de les regrouper avant dégradation par l'autophagie.

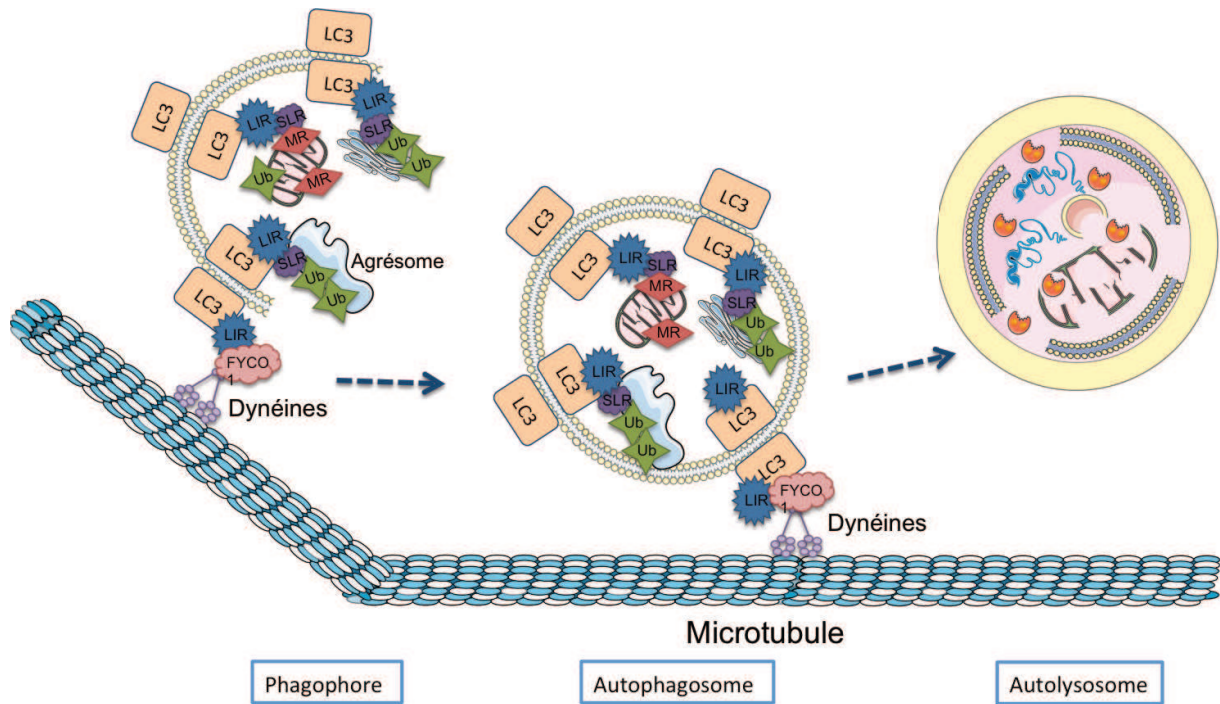


Figure 11 : Autophagie sélective

Le recrutement sélectif de protéines ou d'organelles qui seront dégradées par l'autophagie est piloté par l'interaction entre les motifs LIR des SLRs et la protéine LC3 lipidée. Le transport de l'autophagosome fait intervenir les microtubules grâce à l'interaction de la protéine LC3 lipidée et du motif LIR de la protéine FYCO, qui est une protéine Rab effectrice. La sélection se fait grâce à l'intervention des SLRs qui reconnaissent les chaînes polyubiquitinylées et servent d'intermédiaire entre les protéines ou organelles à dégrader et les protéines de la machinerie autophagique.

LIRs, « LC3-Interacting Receptors » ; SLRs, « Sequestosome 1/p62 Like Receptors »

2.2 L'organellophagie

Les protéines ancrées dans la membrane des différents cargos sont ubiquitinylées par une ubiquitine-ligase E3 spécifique. Cette suite d'adduits ubiquitine, qui marque ce cargo comme cible pour la dégradation, est reconnue par les protéines p62 et NBR1. Ces deux protéines peuvent alors se lier à la protéine LC3 et ainsi relier les agrégats de protéines à dégrader à l'autophagosome. L'autophagie sélective peut aussi cibler pour destruction des organelles endommagées. Par exemple, la mitophagie est une forme d'autophagie sélective des mitochondries. Elle existe chez les mammifères, mais pas chez la levure. Au-delà de la mitophagie, il est maintenant décrit que l'autophagie améliore l'élimination des peroxysomes, des lysosomes, du RE, des ribosomes et de certains composants nucléaires.

2.2.1 La mitophagie

Les mitochondries sont des organelles centrales de la cellule, elles participent à la conversion d'énergie pour la cellule, l'homéostasie du calcium et la programmation de la mort cellulaire (Nunnari and Suomalainen, 2012). Cette organelle produit des ROS dans le cytoplasme, sous-produit de l'activité respiratoire. L'accumulation de ROS peut être due à des dysfonctionnements de la mitochondrie et les accentuer. Les ROS cytoplasmiques peuvent induire des dommages à l'ADN ou modifier les protéines synthétisées par la cellule. De ce fait, un système d'élimination des mitochondries non-fonctionnelles est indispensable à l'homéostasie cellulaire (Okamoto and Kondo-Okamoto, 2012). Les mitochondries sont également capitales pour réguler la balance entre l'offre et la demande quant à la production d'ATP. Lors d'un passage d'un milieu riche en énergie à pauvre en énergie, les mitochondries non-indispensables sont la cible de la dégradation. La fission et la fusion mitochondriale sont des mécanismes qui permettent le maintien et la fonctionnalité des mitochondries lorsque la cellule subit un stress environnemental ou métabolique. La fusion aide à atténuer le stress de la cellule par association de plusieurs mitochondries partiellement endommagées en vue de complémentation. La fission est nécessaire à la création de nouvelles mitochondries. Elle facilite l'apoptose en cas d'un fort niveau de stress cellulaire. Ainsi la régulation de l'homéostasie mitochondriale est nécessaire au bon fonctionnement de la cellule. Des dysfonctionnements des mitochondries sont associés à certaines maladies neurodégénératives, musculaires et métaboliques.

Il est maintenant admis que la mitophagie permet le contrôle qualitatif et quantitatif de la population mitochondriale contenue dans la cellule. Ce processus commun à toutes les cellules eucaryotes supérieures est un mécanisme d'autophagie sélective (Ashrafi and Schwarz, 2013; Feng *et al.*, 2013; Jin and Youle, 2012; Youle and Narendra, 2011).

Chez les mammifères, ils existent trois récepteurs, « Bcl2 : adenovirus E1B 19kDa protein-interacting protein » (BNIP3), BNIP3L (NIX) et FUNDC1, qui participent à la dégradation spécifique de la mitochondrie par l'autophagie (Liu *et al.*, 2012; Sandoval *et al.*, 2008; Schweers *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2008). Ces trois protéines contiennent un domaine LIR (Novak *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2013), important pour la dégradation sélective via l'autophagie comme mentionné précédemment.

NIX est induite pendant la maturation des réticulocytes et interagit avec la protéine LC3. De ce fait NIX est impliquée dans l'élimination des mitochondries préalable à la formation des hématies.

BNIP3 est quant à elle exprimée lors d'une réoxygénation de la cellule suivant un stress hypoxique. La phosphorylation du résidu sérine près du domaine LIR de BNIP3 est cruciale pour la liaison à LC3 et est essentielle pour la mitophagie. La kinase permettant cette phosphorylation n'est pas encore connue.

Le récepteur FUNDC1 est par contre exprimé lors d'épisodes de normoxie, situation où la quantité de dioxygène est normale dans le sang. Dans ce cas, le résidu LIR est phosphorylé par les kinases de la famille des Src. Cela permet sa liaison avec la protéine LC3 et l'activation de la mitophagie (Chen *et al.*, 2014a). Récemment, il a été montré que la protéine ULK1, cible la mitochondrie via son interaction à FUNDC1, phosphoryle ce récepteur afin de stabiliser l'interaction FUNDC1-LC3 (Wu *et al.*, 2014).

En plus de ces trois récepteurs, la cellule est capable d'impliquer l'ubiquitine afin de participer à la dégradation des mitochondries. Les mécanismes les plus connus dépendent des protéines kinases mitochondriales PINK1 et de l'ubiquitine-ligase E3 Parkin. Cette dernière protéine a été identifiée à partir de l'étude génétique de patients atteints de parkinsonisme juvénile présentant des mutations sur le gène correspondant (Kitada *et al.*, 1998; Valente *et al.*, 2004)

Lorsque le fonctionnement des mitochondries est optimal, PINK1 est localisée à la fois à l'intérieur et à l'extérieur de la membrane mitochondriale. PINK1 peut être clivée par plusieurs enzymes, à l'extérieur de la membrane par les peptidases MPP, à l'intérieur de la membrane par des protéases PARL (Greene *et al.*, 2012; Jin *et al.*, 2010; Matsuda *et al.*, 2010; Narendra *et al.*, 2010; Shi *et al.*, 2011; Yamano and Youle, 2013). PINK1, dans le cytosol, est rapidement dégradée par le protéasome. Dans cette situation, Parkin est répartie dans le cytosol sous une forme inactive et non associée de manière stable à la mitochondrie (Chaugule *et al.*, 2011; Chew *et al.*, 2011; Matsuda *et al.*, 2010; Narendra *et al.*, 2008). En revanche, lorsque les mitochondries sont fonctionnelles, la mitophagie n'est pas activée. Mais, lorsqu'intervient une dépolarisation du potentiel de membrane mitochondriale, PINK1 devient liée de manière stable à la surface extérieure de la membrane de la mitochondrie (Kawajiri *et al.*, 2010; Matsuda *et al.*, 2010; Narendra *et al.*, 2008; Rakovic *et al.*, 2010). PINK1 forme alors un complexe qui est capable de s'autophosphoryler. Ce complexe rendu stable est alors capable de lier Parkin et permettre le signalement du dysfonctionnement de la mitochondrie (Okatsu *et al.*, 2012; Okatsu *et al.*, 2013). Dans ce contexte, PINK1 est active, capable de phosphoryler le résidu sérine du domaine « ubiquitin-like » de Parkin (Iguchi *et al.*, 2013; Kondapalli *et al.*, 2012; Shiba-Fukushima *et al.*, 2012). Cette phosphorylation induit un changement de conformation. Il en résulte une liaison entre Parkin et RING2, indispensable pour son activité ubiquitine ligase E3 (Chaugule *et al.*, 2011; Iguchi *et al.*, 2013; Lazarou *et al.*, 2012; Spratt *et al.*, 2013; Zheng and Hunter, 2013).

L'identité de la cible exacte de Parkin étant essentielle au cours de la mitophagie est controversée (Geisler *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 2010c; Narendra *et al.*, 2010). Il existe en effet, plusieurs analyses qui montrent que les protéines ubiquitylées dépendantes de Parkin correspondent à des protéines impliquées dans la dépolarisation de la membrane des mitochondries, comme par exemple la mitofusine (Mfns). Dans ce cas, Parkin est capable d'ubiquityniler la Mfn par exemple. La Mfn,

GTPase requise pour la fusion mitochondriale (Sarraf *et al.*, 2013) ciblée par Parkin, sera dégradée en Mfns, prévenant de ce fait la fusion de mitochondries endommagées. Ce mécanisme assiste donc indirectement la mitophagie (Gegg *et al.*, 2010; Rakovic *et al.*, 2010; Tanaka *et al.*, 2010). Il a été montré que l'isoforme Mfns2 est un récepteur à Parkin améliorant la dégradation des mitochondries dans les cardiomyocytes de souris. De plus, il ressort des expériences de criblage d'ARN à interférence sur génome entier, réalisées sur les régulateurs de Parkin lors de dommages des mitochondries, qu'il existe d'autres facteurs impliqués dans la voie PINK1-Parkin, notamment TOMM7. Cette dernière protéine est un composant du complexe TOM, essentiel à la stabilité de PINK1 lors de sa liaison à la membrane externe de la mitochondrie (Hasson *et al.*, 2013). De plus l'activité des protéines Rab-GTPase dans ce contexte a récemment été montrée lors de leur interaction avec les protéines Fis1 impliquées dans la balance fission/fusion mitochondriale et les membres de la famille LC3/GABARAP. Cette interaction a lieu à la surface des mitochondries favorisant la formation de l'autophagosome régulée par l'activité de Rab7 durant la mitophagie. Ce mécanisme est contrôlé par la voie PINK1-Parkin (Yamano *et al.*, 2014).

Bien que la liaison ubiquitin-LC3 par des adaptateurs, tels que SQSTM1/p62 et NBR1, soit nécessaire pour la voie PINK1-Parkin, les modalités de recrutement des protéines ATGs par les mitochondries endommagées reste inconnues. SQSTM1/p62 et NBR1, comme décrit plus haut, sont capables de lier directement la protéine LC3 mais également les protéines ubiquitinylées. De ce fait, lorsque la mitochondrie devient non fonctionnelle, Parkin joue son rôle ubiquitine ligase et peut ainsi recruter les protéines SQSTM1/p62 et NBR1. Celles-ci peuvent ainsi se lier à la protéine LC3 et dégrader la mitochondrie via l'autophagie. Cela montre l'importance du rôle de l'autophagie dans la dégradation des mitochondries.

En condition basale, la protéine AMBRA1, un régulateur en amont de l'autophagie et pouvant se lier à PARKIN, est présente sur la membrane de la mitochondrie, où son activité pro-autophagique est inhibée par Bcl2. Lorsque la mitophagie est induite, AMBRA1 lie la protéine autophagique LC3 grâce à son domaine LIR et peut ainsi participer à la clairance des mitochondries (Strappazon *et al.*, 2015).

2.2.2 La pexophagie

En réponse aux changements d'environnements intra et extra cellulaires, le nombre de peroxysome augmente ou diminue afin de maintenir le niveau approprié de réaction des métabolites. Cela inclut la détoxification de l' H_2O_2 et l'oxydation des acides gras (Smith and Aitchison, 2013). Par exemple, les levures considérées comme méthylotrophiques peuvent augmenter le nombre de peroxysomes quand elles se développent dans un milieu contenant du méthanol comme seule source de carbone

(van der Klei *et al.*, 2006). Les peroxysomes peuvent déclencher un changement dans le milieu en passant du méthanol au glucose ou à l'éthanol. Dans ce cas, le métabolisme des peroxysomes est vital pour la croissance cellulaire (Manjithaya *et al.*, 2010b; Oku and Sakai, 2010).

La pexophagie a été découverte chez la levure ; elle permet la dégradation des peroxisomes trop abondants dans la cellule par l'autophagie. Chez les eucaryotes supérieurs, des études menées sur des cellules ovariennes de hamster chinois (CHO) ont montré que la pexophagie peut être induite par un changement d'environnement, comme le passage d'un environnement pauvre à un environnement riche en nutriment. Dans ces conditions, Pex14 interagit avec LC3 (Hara-Kuge and Fujiki, 2008). On sait également que la diminution de la quantité des protéines SQSTM1/p62 ou NBR1 peut induire la suppression de la dégradation des peroxysomes dans les cellules HeLa. La surexpression de NBR1 mais pas de SQSTM1/p62, peut au contraire faciliter la pexophagie (Deosaran *et al.*, 2013). Un mutant de NBR1 qui ne peut pas lier SQSTM1/p62 compromet la pexophagie. Ainsi SQSTM1p62 reste une protéine importante, mais non-suffisante, pour compléter le processus de pexophagie. Son action nécessite une collaboration avec la protéine NBR1. On sait également que l'ubiquitinylation des protéines péroxysomales permet le recrutement de la protéine LC3 vers le peroxysome grâce aux protéines SQSTM1/p62 et NBR1. C'est ce mécanisme qui permet de mettre en place la pexophagie.

2.2.3 La lipophagie

Les lipides intracellulaires sont une source essentielle d'énergie pour la cellule et de composants pour les membranes. La cellule conserve une quantité de lipides constante tout au long de sa vie. Des études récentes ont montré que les stocks de lipides peuvent être sélectivement dégradés par les lysosomes grâce à l'autophagie. Ce processus est appelé lipophagie (Martin and Parton, 2006; Thiele and Spandl, 2008).

Les triglycérides et le cholestérol sont stockés dans des organelles intracellulaires appelées gouttelettes lipidiques. Jusqu'à présent, la dégradation des triglycérides contenus dans les gouttelettes lipidiques était connue pour être effectuée par des enzymes hydrolitiques ou lipases cytosoliques. On sait désormais que la dégradation des gouttelettes lipidiques peut être réalisée par la voie autophagique. La lipophagie a été initialement décrite dans les hépatocytes, constituant un site anatomique majeur de stockage de lipides, accentué en situation d'obésité ou lors du syndrome métabolique (Marchesini *et al.*, 2001). L'inhibition de l'autophagie par des molécules pharmacologiques dans des hépatocytes en culture induit une augmentation de la quantité et de la taille des triglycérides contenus dans les gouttelettes lipidiques. De ce fait, la β -oxydation

mitochondriale est diminuée à cause d'une diminution d'acides gras libres de par l'inhibition de la dégradation des gouttelettes lipidiques. Afin de palier au manque d'acide gras libres altérant la production d'ATP produite par la β -oxydation, la lipophagie peut réguler l'homéostasie énergétique de la cellule et son contenu en lipides. L'inhibition génétique de l'autophagie par une délétion conditionnelle du gène *atg7* dans les hépatocytes de souris mène également à une augmentation du taux de triglycérides et de cholestérol hépatique. De manière intéressante, on observe également une augmentation de la colocalisation entre la protéine LC3 et les gouttelettes lipidiques lorsque ces cellules subissent une carence en acides aminés. Cela nous indique que la lipophagie, au même titre que l'autophagie, est augmentée de façon sélective en réponse à un signal de stress énergétique (Johansen and Lamark, 2014). La lipophagie est un mécanisme actif dans un grand nombre de cellules ; notamment dans les hépatocytes, dans les neurones (Kaushik *et al.*, 2011; Martinez-Vicente *et al.*, 2010) ou dans les fibroblastes. Les facteurs de sélectivité permettant à la machinerie autophagique de cibler les gouttelettes lipidiques ne sont pas encore tous connus, mais on sait que les protéines SNARE, impliquées dans la fusion des gouttelettes lipidiques (Bostrom *et al.*, 2007), sont également nécessaires dans la fusion autophagosome/lysosome. Les deux voies pourraient ainsi être étroitement liées. Une autre possibilité est la localisation de la protéine LC3 à la membrane des gouttelettes lipidiques pouvant ainsi faire le lien avec les autophagosomes. L'autophagie est donc impliquée dans la dégradation des lipides.

ATG5 et ATG7, hormis leur rôle strictement autophagique, sont nécessaires pour l'adipogénèse chez la souris (Baerga *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2009). Les souris déficientes pour l'une de ces protéines, présentent des dépôts de tissus adipeux plus petits en masse que les souris contrôles et une concentration moindre en acide gras. De ce fait ces animaux ont une diminution de triglycérides et de cholestérol dans le sang.

2.2.4 La nucléophagie

Certains composés dérivés du noyau sont dégradés par l'autophagie sélective qui est alors appelée nucléophagie. Ce processus peut être induit en cas de carence en acides aminés ou d'autres formes de stress comme par exemple des dommages de l'ADN. Certaines vésicules dont la formation et le trafic sont régulés par les protéines ATG, entre autres par LC3, contiennent des composants nucléaires à proximité de l'enveloppe nucléaire (Park *et al.*, 2014). De plus, des petites structures contenant des fragments de chromosomes, générés la plupart du temps par des stress génotoxiques, sont dégradées par l'autophagie (Rello-Varona *et al.*, 2012). Ces types de vésicules contiennent la protéine p62, des composants de la membrane nucléaire ou de l'ADN endommagé. Il est maintenant

supposé que ces vésicules, positives pour la protéine LC3, jouent un rôle dans la dégradation de l'ADN (Erenpreisa *et al.*, 2014). On ne connaît pas à ce jour les modalités de sélection des composants nucléaires qui sont dégradés par l'autophagie.

2.2.5 La lysophagie

Lors d'une rupture de membrane du lysosome, son contenu est libéré à l'intérieur du cytosol de la cellule et peut provoquer des dommages aux organelles intracellulaires. Certaines expériences montrent que les lysosomes endommagés sont dégradés de manière spécifique par l'autophagie (Maejima *et al.*, 2013), prévenant l'effet toxique de la rupture lysosomale. La lysophagie émerge comme un processus contrôlé par l'ubiquitine et implique les protéines LC3 et p62. Ces protéines contribuent au recouvrement de l'activité lysosomale. La sélectivité de l'ubiquitine et des protéines ATGs pour cibler les lysosomes endommagés n'est pas encore comprise.

2.2.6 La réticulophagie

Le stress causé par une accumulation de protéines mal repliées dans le RE active sa dégradation sélective via l'autophagie (Bernales *et al.*, 2006; Ding *et al.*, 2007; Ogata *et al.*, 2006; Yorimitsu *et al.*, 2006). Ce processus est accompagné par l'activation de la kinase ULK1. Il est également possible que l'activité de la kinase mTOR soit réduite dans ces conditions (Yorimitsu and Klionsky, 2007). La protéine « C/EBP homologous protein » (CHOP), un facteur de transcription induit pendant le stress du RE et activé par la voie de signalisation p38, a une fonction de modulateur de mort cellulaire. Elle participe au contrôle de l'apoptose et cible en aval les protéines « eukaryotic translation initiation factor 2 α kinase 3 » (PERK) et « activating transcription factor 4 » (ATF4). La délétion de CHOP mène à une atténuation de la mort cellulaire induite lors d'un stress du RE. L'induction de CHOP par la voie UPR contribue à l'initiation de l'autophagie via la diminution de l'expression de Bcl-2. Les gènes *ATF4* et *CHOP* participent chacun à l'activation de l'autophagie, ATF4 lie le promoteur du gène codant pour LC3 et CHOP active la transcription d'*ATG5*.

2.2.7 La ribophagie

Chez la levure, en condition de carence en acides aminés, l'autophagie non-sélective est activée et enferme dans la lumière de ses vésicules un grand nombre de ribosomes. De plus, dans les mêmes conditions, les sous-unités ribosomales sont rapidement dégradées comme d'autres protéines cytosoliques (Kraft *et al.*, 2008). De manière intéressante, les ubiquitine-ligases Rsp5 et Ubp/Bre5 sont impliquées dans le recyclage des ribosomes par l'autophagie mais non dans la dégradation d'autres organelles par l'autophagie. Cela peut laisser penser qu'il existe bien une autophagie dédiée à la dégradation des ribosomes, la ribophagie. Le complexe Ubp/Bre5 interagit avec la GTPase Cdc48. Cdc48 peut alors lier l'adaptateur Ufd3 qui est requise pour la ribophagie (Ossareh-Nazari *et al.*, 2010) (Ossareh-Nazari *et al.*, 2014). Même si les ribosomes sont sujets à la dégradation par l'autophagie, la régulation de ce processus n'est pas connue.

2.3 Les autres fonctions des protéines ATGs

Jusqu'à présent, nous nous sommes focalisés sur le rôle des protéines ATGs dans la formation de l'autophagosome et des processus de dégradation qui y sont liés. De nombreuses études montrent néanmoins que ces protéines, seules ou associées, sont impliquées dans des mécanismes intracellulaires non-autophagiques.

2.3.1 Rôle non-autophagique de la protéine LC3

Plusieurs analyses des partenaires de la protéine LC3 via le domaine LIR, révèlent des interactions avec des acteurs impliqués dans d'autres fonctions que la dégradation autophagique. LC3 interagit avec plus de 60 protéines. La plupart sont des interactants directs, comme démontré par des expériences de co-immunoprécipitations et visualisé par des techniques d'imagerie.

2.3.1.1 Interaction de la protéine LC3 avec les GTPases

La famille des Rho GTPases régule des voies de signalisation et de trafic variées. Ces GTPases existent sous deux états, un état activé lorsqu'elles sont liées au GTP et un état inactivé lorsqu'elles sont associées à la forme GDP. La voie de dégradation par le protéasome régule plusieurs Rho. Plusieurs Rab GTPases sont connues pour réguler l'autophagie (Pankiv *et al.*, 2010). Parmi les protéines interagissant avec LC3, ont été identifiées des GTPases comme Rab22 et Rab33. A travers ces interactions n'induisant pas le mécanisme autophagique, la protéine LC3 peut réguler de manière

indirecte la réponse cellulaire face au stress (Popovic *et al.*, 2012). L'interaction directe entre les GTPases et la protéine LC3 permet de réguler et reprogrammer le trafic endosomal. Les familles de protéines qui contiennent un domaine TBC (Tre2, Bub2 et Cdc16) affectent le trafic membranaire par l'action des « RAB-GTPase-activating protéin » (Rab-GAP) qui inhibe les Rab-GTPase. En fait, 14 Rab-GAPs qui appartiennent à la famille de protéines qui contiennent un domaine TBC, interagissent avec le domaine LIR de la protéine LC3 (Popovic *et al.*, 2012). Un de ces membres est la protéine TBC1D5 qui interagit avec la protéine Vps29 ancrée dans la membrane de l'endosome.

2.3.1.2 La forme LC3 non lipidée intervient dans la réplication virale

Les coronavirus, incluant le virus responsable du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS) et le virus hépatiques de la souris (MHV), sont des virus enveloppés à ARN qui utilisent la formation de vésicules à double membrane pour leur réplication. Le MHV utilise la machinerie de la cellule hôte pour produire la membrane nécessaire à sa réplication. La diminution de l'expression de la protéine LC3, mais pas l'inhibition de l'autophagie de la cellule hôte, inhibe l'infection par les CoV *in vitro* (Reggiori *et al.*, 2010). Le nidovirus et le rotavirus se répliquent également dans des vésicules à double membrane qui contient la protéine LC3. Lors d'une infection par ces virus, des composants viraux co-localisent avec la protéine LC3.

2.3.1.3 La forme non lipidée d'Atg8 régule la fusion de la vacuole chez la levure

Chez la levure *Picha pastoris*, la forme non lipidée de la protéine Atg8 (orthologue de LC3) est importante pour la fusion de plusieurs petites vésicules afin de former une vacuole unique (Tamura *et al.*, 2010). Atg8 est nécessaire pour la fusion de la vacuole lors de son adaptation à un changement dans son environnement (Tableau 1). Cette dépendance est observée lorsque le méthanol doit être utilisé comme source de carbone (Nakatogawa *et al.*, 2007). Dans ce cas, la lipodation d'Atg8 n'est pas nécessaire. Cette fusion requière en revanche plusieurs protéines SNARE. Il est alors probable que la localisation de la protéine Atg8 près de la membrane de la vacuole permette le recrutement des protéines SNARE, mais Atg8 ne servirait pas directement de protéine de fusion.

	Réorganisation de la membrane autophagique	Signalisation	Processus de sécrétion	Endocytose	Survie/Mort cellulaire
ATG5		Modulation de la production d'IFN <i>Séquestration des protéines à domaines CARD par Atg5-Atg12</i> (Jounai et al., 2007)	Polarisation de la sécrétion <i>Sécrétion des cathepsines K par les ostéoclastes</i> (DeSelm et al., 2011)		Activation de l'apoptose <i>Rôle pro-apoptotique d'ATG5 clivée par la calpaïne</i> (Hou et al., 2008; Norman et al., 2014)
Atg8/LC3	Formation de la vacuole chez la levure <i>Rôle d'Atg8 non lipidée</i> (Tamura et al., 2010)			Trafic endocytique <i>LAP, endocytose avec LC3</i> <i>Facilite la fusion avec les lysosomes</i> (Martinez et al., 2011)	
ATG16L1			Exocytose <i>Sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth</i> (Cadwell et al., 2008)		
Beclin1					Activation de l'apoptose <i>Rôle pro-apoptotique de la Beclin1 clivée par la caspase 3</i> (Wirawan et al., 2010; Zhu et al., 2010; Wirawan et al., 2010; Zhu et al., 2010)

Tableau 1 : Rôles non-autophagiques des protéines ATG

2.3.2 Les rôles non-autophagiques d'ATG5 et du complexe ATG5-ATG12

Le complexe ATG5-ATG12 limite la réponse antivirale

L'infection de cellules mammifères par des virus à ARN produit des structures immunostimulantes dérivées de l'ARN viral. Dans des cellules de mammifères infectées par le virus « vesicular stomatitis virus » (VSV) ou par le virus de la grippe, l'ARN triphosphorylé en 5' pendant son cycle de réplication est reconnu par une protéine hélicase à ARN dans le cytoplasme, « retinoic acid-inducible gene 1 » RIG-I. D'autres virus à ARN, comme le virus de l'encéphalomyocarde, génèrent des ARN double brin qui sont reconnus par l'hélicase « melanoma differentiation associated protein 5 » MDA5. Ces hélicases ont un domaine de recrutement des caspases en N-terminaux (CARD) qui interagit avec d'autres protéines à domaine CARD, comme la protéine de signalisation « interferon B promoter stimulator 1 » (IPS1). L'interaction homotypique entre les domaines CARD de la protéine IPS1 avec ceux des protéines RIG-I ou MDA5, est cruciale pour la transmission du signal. La stimulation de RIG-I et MDA-5 active les facteurs de transcription NF- κ B, IRF3, et IRF7, aboutissent à leur translocation dans le noyau. La production d'interféron de type I (IFN-I) et la transcription de gènes codant pour des molécules pro-inflammatoires sont alors induites. La sécrétion de l'IFN-I agit de manière autocrine induisant la dégradation de l'ARN viral en activant la RNase L. De plus la synthèse des protéines virales est inhibée par l'activité du facteur d'initiation de translation eucaryotique 2. Enfin,

les IFN de type I peuvent activer de manière paracrine les cellules du SI comme les cellules NK et les CPAs afin de déclencher une réponse antivirale. Le complexe ATG5-ATG12 (Jounai *et al.*, 2007) interagit avec RIG-I et MDA5, interférant avec la capacité de ces hélicases à engager l'interaction homotypique entre leurs domaines CARD et celui de IPS1 (Tableau 1). De ce fait, la production d'IFN-I est réduite. Ceci explique l'augmentation de la production d'IFN-I et la réduction de la réplication virale, dans les fibroblastes déficients pour ATG5 et infectés par le virus VSV. A l'inverse, une surexpression des gènes *ATG5* ou *ATG12* dans des cellules HEK293 augmente l'association du complexe ATG5-ATG12 et supprime le signal normalement induit par les protéine RIG-I et MDA5 menant à une diminution de la production d'IFN-I.

2.3.3 Rôle des protéines ATGs dans les mécanismes de sécrétion

Les cellules eucaryotes sécrètent des protéines dans le milieu extracellulaire de deux différentes manières. La première forme de sécrétion, dite conventionnelle, est réalisée pour les protéines qui sont synthétisées dans le RE. Un système de transport orchestré par les vésicules d'exocytose bourgeonnant à partir de l'appareil de Golgi permet l'export en dehors de la cellule. De nombreuses protéines comme l'insuline, les neurotransmetteurs ou certaines hormones suivent cette voie de transport. La seconde voie est la sécrétion, dite non-conventionnelle. Dans cette voie, les protéines ne transitent pas par la voie classique entre le RE et l'appareil de Golgi. C'est le cas pour l'« Acyl-CoA binding phosphate », le facteur de croissance 2 des fibroblastes, l'interleukine-1 β (IL-1 β). Le mécanisme de sécrétion non-conventionnelle de protéine n'est pas encore très bien compris, mais il est suspecté que Acb1 et IL-1 β soient sécrétés par l'intermédiaire de vésicules qui seraient similaires aux autophagosomes sans requérir toutes les protéines autophagiques (Bruns *et al.*, 2011; Cabral *et al.*, 2010; Kinseth *et al.*, 2007; Manjithaya *et al.*, 2010a). Contrairement à l'autophagie, ces vésicules capturent des cargos cytosoliques et les délivrent à l'extérieur de la cellule. Ces cargos ne sont pas dégradés par le processus normal de l'autophagosome qui fusionne avec le lysosome (Dupont *et al.*, 2011).

Plusieurs protéines ATGs semblent impliquées dans les mécanismes de sécrétion. Dans les cellules neuroendocriniennes PC12, ATG16L1 colocalise avec la protéine Rab33A dans des vésicules à corps dense qui contiennent certaines hormones. La délétion de la protéine ATG16L1 cause une diminution de la sécrétion d'hormones des cellules PC12, et ce indépendamment de l'autophagie (Ishibashi *et al.*, 2012).

Le rôle d'ATG16L1 dans les mécanismes de sécrétion a également été mis en évidence lors d'études réalisées sur la maladie de Crohn. Certains variants alléliques du gène *ATG16L1* sont liés à une

susceptibilité à développer la maladie de Crohn (Barrett *et al.*, 2008; Hampe *et al.*, 2007; Rioux *et al.*, 2007). Cette pathologie inflammatoire chronique du tractus intestinal est, entre autres, liée à un défaut de contrôle de la flore commensale. Les cellules de Paneth, présentes dans les cryptes intestinales jouent un rôle primordial dans le contrôle des bactéries intestinales de par leurs sécrétions de peptides antimicrobiens. La délétion des gènes *Atg5* et *Atg16L1* chez la souris mène à une exocytose anormale des granules de sécrétion par les cellules de Paneth. Ces vésicules contiennent des peptides antimicrobiens (Cadwell *et al.*, 2008). Un tel phénotype des cellules de Paneth est retrouvé chez les patients qui développent la maladie de Crohn et qui sont homozygotes pour l'allèle à risque *ATG16L1* prédisposant ces individus à la maladie (Cadwell *et al.*, 2009).

Certains composants de la machinerie autophagique sont également impliqués dans la sécrétion d'enzymes dégradatives. Dans les ostéoclastes, les protéines autophagiques participent à la sécrétion polarisée du contenu lysosomal. Les ostéoclastes sécrètent ainsi des enzymes lysosomales telles que les cathepsines K et les acides hydrochloriques dans le milieu extracellulaire. Lorsqu'ils sont attachés à l'os, les ostéoclastes sont polarisés. Leurs sécrétions permettant la déminéralisation sont confinées dans un espace appelé lacune (DeSelm *et al.*, 2011). La résorption de l'os cause la formation de cavités. *ATG5* et *ATG7* sont requises pour orienter la sécrétion des lysosomes pour la résorption de l'os mais pas pour son développement (Tableau 1). Ceci a été démontré par l'étude de modèles de souris, déficients conditionnels des gènes *Atg5* et *Atg7* spécifiquement dans les ostéoclastes (promoteur *LyzM* contrôlant l'expression de la recombinaison CRE). Ce processus implique également la protéine LC3 et sa conversion en LC3-II. Il est maintenant clair que la machinerie autophagique joue un rôle dans la sécrétion du contenu des lysosomes dans le milieu extracellulaire mais le mécanisme de sécrétion qui est mis en place n'est pas encore totalement compris. L'autophagosome peut se former à partir de diverses sources de membranes comme mentionnées plus haut. La membrane plasmique contribue à la formation de phagophores contenant les protéines *ATG5-ATG12/ATG16L1* mais dépourvus de LC3. Il a été montré que ces vésicules formées à partir de la membrane plasmique, pouvaient maturer en un phagophore contenant à la fois *ATG5-ATG12/ATG16L1* et LC3 en fusionnant grâce aux protéines SNARE. C'est la protéine SNARE *Vamp7* qui est à l'origine de ces fusions. La protéine LC3 peut être localisée dans plusieurs membranes cellulaires afin d'orchestrer la formation de l'autophagosome (Moreau and Rubinsztein, 2012). Dans les ostéoclastes, la signification de la localisation de LC3 à la membrane plasmique où s'effectue la fusion des lysosomes n'est pas encore claire. La protéine LC3 pourrait favoriser le recrutement des protéines SNARE qui sont des protéines de fusion membranaire (Tableau 1). Les protéines SNARE, telles que v-SNARE et *VAMP7*, sont connues pour intervenir dans l'exocytose des lysosomes en permettant leur fusion avec la membrane plasmique (Moreau *et al.*, 2011). Ce mécanisme permet la

sécrétion de la cathepsin K et la résorption de l'os. Cela suggère que la protéine LC3 et d'autres protéines ATGs sont impliquées dans ces différents phénomènes. Elles pourraient de fait également intervenir dans la restauration de l'intégrité de la membrane plasmique.

2.3.4 Les protéines ATGs et la régulation de l'apoptose

Des preuves expérimentales obtenues *in vitro* et *in vivo* impliquent les caspases et les calpaïnes dans le clivage et l'inactivation des protéines ATG, liant ainsi les régulations de l'autophagie et de l'apoptose (Hou *et al.*, 2008; Norman *et al.*, 2014). L'activation de l'apoptose pourrait alors inhiber l'activité autophagique. Cet effet anti-autophagique de l'apoptose a été suggéré par le clivage d'ATG5 via la calpaïne en cours d'apoptose (Tableau 1). Ce clivage limitant l'autophagie peut en retour favoriser l'apoptose. En effet, une forme tronquée d'ATG5 est alors générée en cours d'apoptose et est transloquée du cytosol vers la mitochondrie. ATG5 séquestre alors la molécule anti-apoptotique Bcl-xL l'empêchant de jouer son rôle. Le cytochrome c est alors libéré dans le cytosol et la voie intrinsèque des caspases est activée (Yousefi *et al.*, 2006). La surexpression d'ATG5 dans des cellules tumorales les sensibilise ainsi à l'apoptose. ATG5 joue donc ici un rôle pro-apoptotique indépendant de l'autophagie. Au-delà d'ATG5, plusieurs protéines de l'autophagosome permettent une régulation croisée des voies de l'autophagie et de l'apoptose. Le clivage de la protéine ATG4 par la caspase 3 ou le clivage de Beclin1 par les caspases 3 ou 8 (Tableau 1), entraînent une stimulation de l'apoptose et une inhibition de l'autophagie (Wirawan *et al.*, 2010; Zhu *et al.*, 2010).

Les protéines de la machinerie autophagique peuvent également servir de support à la mise en place de l'apoptose induite par la voie extrinsèque. Dans cette voie de mort cellulaire programmée, un signal extracellulaire active les récepteurs de mort de la famille du « tumor necrosis factor receptor » (TNFR) exprimés à la membrane plasmique. Ces récepteurs sont alors oligomérisés permettant le recrutement de « Fas associated protein with death domain » (FADD) et de la caspase 8. L'association de ces molécules forme le complexe de signalisation de l'induction de la mort cellulaire (DISC). Dans une lignée cellulaire MEF, la formation du complexe DISC dépend de la présence d'ATG5 et de la formation de la membrane de l'autophagosome via LC3 et ATG16L1. La caspase 8 est recrutée par la membrane de l'autophagosome grâce à l'association d'ATG5 avec FADD. Dans ce cas, les protéines ATGs et la membrane de l'autophagosome fonctionnent comme une plateforme nécessaire pour la mise en place du processus apoptotique.

2.3.5 Contrôle de la transcription de gènes

Récemment, il a été montré que l'autophagie et le cycle cellulaire étaient coordonnés lors d'une carence en acides aminés. Dans des cellules MEF placées dans cette situation, ATG7 (indépendamment de son activité E1), ATG5 et Beclin1 interagissent avec p53 afin d'activer l'inhibiteur du cycle cellulaire p21 (Lee *et al.*, 2012a). Ainsi l'expression de molécules de la machinerie autophagique limiterait l'induction du cycle cellulaire.

3 L'autophagie et l'immunité

L'autophagie joue un rôle dans l'homéostasie cellulaire en dégradant des macromolécules en condition de stress énergétique. Elle permet d'éliminer les agrégats protéiques toxiques pour la cellule et les organelles non-fonctionnelles. Nous savons aujourd'hui, en plus, que l'autophagie joue un rôle primordial dans plusieurs mécanismes et voies de signalisation de l'immunité innée et adaptative. Ainsi l'autophagie intervient dans la destruction des microorganismes, dans la régulation de l'inflammation et elle module l'immunité adaptative par son impact sur la présentation antigénique, et sur l'homéostasie des lymphocytes.

3.1 Autophagie, immunité innée et inflammation

3.1.1 Autophagie et élimination des microorganismes

3.1.1.1 La xénophagie

La première observation de l'induction de l'autophagie en condition d'infection a été publiée il y a trente ans (Rikihisa, 1984). Aujourd'hui, il est clair que l'autophagie joue un rôle crucial dans l'élimination directe des pathogènes (Gutierrez *et al.*, 2004a; Nakagawa *et al.*, 2004). La réponse de l'autophagie contre les pathogènes intracellulaires (bactérie, virus, champignon, parasites) se nomme xénophagie (Figure 12). Comme tout autre type d'autophagie sélective, la xénophagie repose sur les protéines de la machinerie autophagique. La capacité de l'autophagie à éliminer une bactérie a été initialement démontrée dans le cas de *Streptococcus pyogenes*, connue sous le nom de *Streptococcus* de groupe A (GAS). Après infection de cellules non-phagocytaires, via une endocytose induite par le pathogène, la bactérie pénètre dans le cytosol et est enfermée dans une structure de type autophagosomale appelée vacuole contenant une bactérie GAS (GsAVs) (Nakagawa *et al.*, 2004). Cette vacuole n'est pas un autophagosome conventionnel ; elle a un diamètre pouvant aller de 1µm à 10µm et peut n'être formée que d'une seule membrane. Cette vésicule ne dépend pas seulement de la présence de protéines autophagiques mais également de la protéine d'adressage RAB7, aussi connue pour participer à la formation des étapes précoces des autophagosomes canoniques (Yamaguchi *et al.*, 2009).

L'équipe de Maximilliano Gutierrez a montré que l'induction de l'autophagie limite la survie intracellulaire des bactéries *Mycobacterium tuberculosis* (Gutierrez *et al.*, 2004a). Lors d'une

infection de macrophages, *M. tuberculosis* bloque la maturation des phagosomes, empêchant sa dégradation. L'induction de l'autophagie va permettre la fusion du phagosome non fonctionnel contenant la mycobactérie avec les lysosomes, facilitant ainsi sa dégradation. Ainsi, l'autophagie est impliquée dans la dégradation d'un grand nombre de pathogènes, tels que la bactérie *Lysteria flexneri* (Rich et al., 2003), le parasite *Toxoplasma gondii* (Andrade et al., 2006) et le virus Sindbis (Orvedahl et al., 2010).

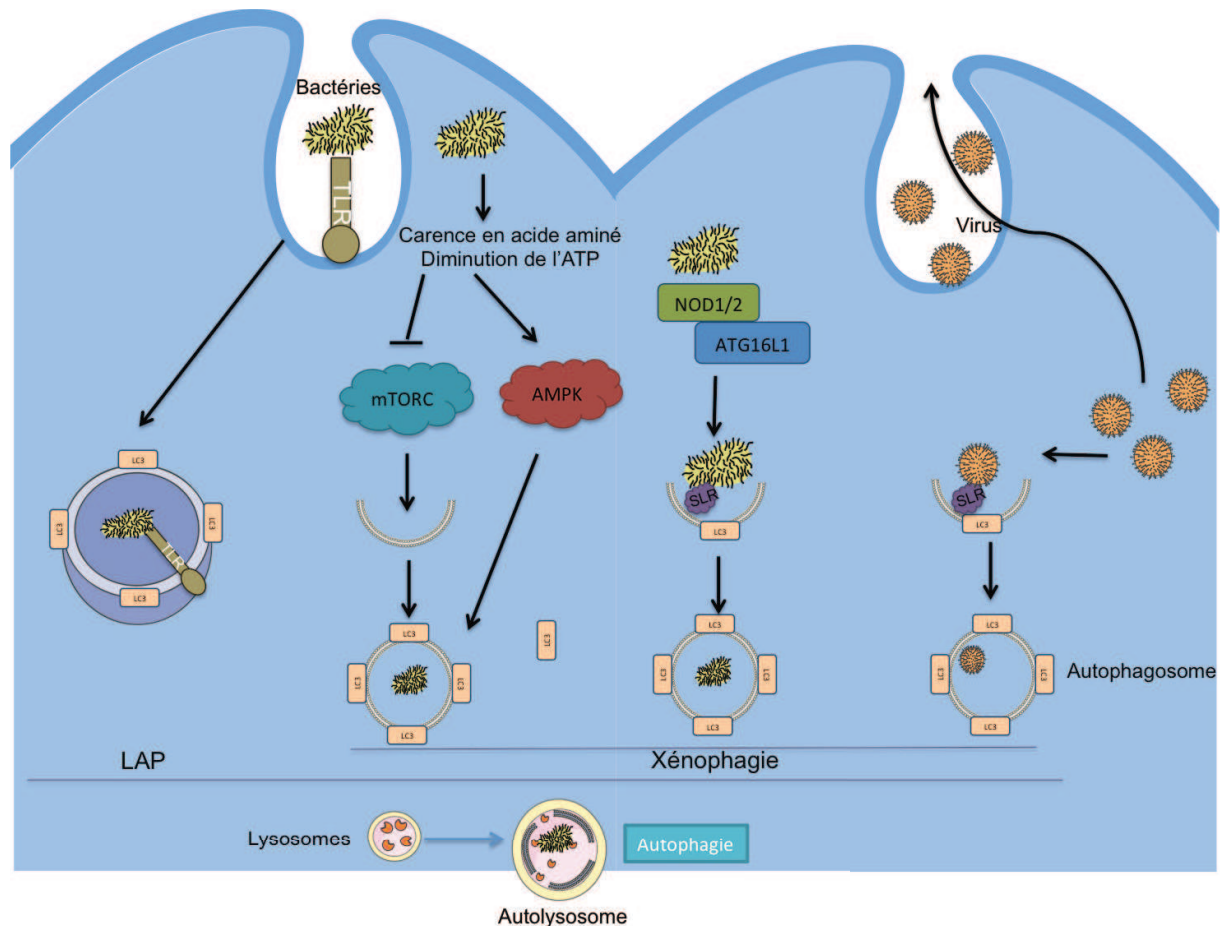


Figure 12 : Elimination des microorganismes par la machinerie autophagique : la LAP et la xénophagie

L'internalisation de microorganismes peut induire l'autophagie en entrant en compétition avec les nutriments présents dans la cellule ainsi que par stimulation des récepteurs de l'immunité innée, tels que les TLRs ou les récepteurs NOD. L'internalisation de microorganismes par phagocytose, aidée par la LAP, facilite la maturation des phagosomes en phagolysosomes. La xénophagie peut éliminer les microorganismes via la formation d'autolysosomes conventionnels utilisant toute la machinerie autophagique. Les microorganismes peuvent être adressés vers les autophagosomes par des protéines SLRs.

LAP, « LC3-associated protein » ; NOD, « Nucleotide Oligomerization Domain receptor » ; TLR, « Toll-Like Receptor »

3.1.1.2 La xénophagie et les SLRs

Comme décrit précédemment, l'élimination sélective par l'autophagie n'est pas restreinte aux pathogènes. Elle concerne également des agrégats protéiques et des organelles endommagées qui sont reconnues et capturées par les protéines adaptatrices de l'autophagie (Kraft *et al.*, 2010). Cette famille d'adaptateurs est nommée « sequestosome 1/p62-like receptors » (SLR). Les SLRs possèdent un domaine de liaison LIR avec la protéine LC3 et reconnaissent les cibles ubiquitinylées. La surface des microorganismes peut dans certaines conditions être ubiquitinylée. Dans ce cas, le domaine de liaison à l'ubiquitine contenu dans les SLRs permet de créer un lien avec la machinerie autophagique grâce à son domaine LIR (Deretic, 2012). Les microorganismes ubiquitinylés peuvent alors être adressés vers les autolysosomes où ils seront dégradés (Deretic *et al.*, 2013).

La protéine p62 peut cibler *Shigella flexneri* après ubiquitinylation de la surface de la vacuole qui la contient. Une fois que la bactérie est internalisée, elle perce la membrane de la vacuole la contenant ; c'est à ce moment que la membrane endommagée de la vacuole est ubiquitinylée. La membrane polyubiquitinylée contenant *Shigella* interagit avec la protéine autophagique p62. Ainsi, celle-ci recrute la protéine LC3 facilitant la dégradation de la bactérie via l'autophagie. (Mostowy *et al.*, 2011; Zheng *et al.*, 2009).

D'autres adaptateurs sont capables de reconnaître des bactéries ubiquitinylées, telles que NDP52 (Ivanov and Roy, 2009; Pilli *et al.*, 2012; Thurston *et al.*, 2009). NDP52 est l'adaptateur qui est utilisé pour la reconnaissance de la bactérie *Salmonella enterica*. Suivant le même processus que la bactérie précédente, la vésicule qui contient *Salmonella* est percée, puis ubiquitinylée pour enfin être détectée par la protéine autophagique LC3 grâce à NDP52. Lors d'une infection par *Salmonella* de cellules invalidées pour NDP52, la croissance bactérienne est accélérée.

3.1.1.3 L'autophagie et la phagocytose

Les macrophages et les polynucléaires neutrophiles éliminent les bactéries extracellulaires entre autres par phagocytose. Cette endocytose spécialisée permet l'internalisation de particules, débris cellulaires, cellules apoptotiques et pathogènes (Sarantis and Grinstein, 2012). Le contenu d'un phagosome peut être dégradé par la fusion du phagosome avec des endosomes tardifs ou des lysosomes. LC3 peut être recrutée par le phagosome. (Gong *et al.*, 2012). La phagocytose faisant intervenir la protéine LC3 est nommée LAP (Figure 12). La LAP dépend d'une forte activité de la PI3K et d'un recrutement initial de Beclin1 au niveau du phagosome. Par la suite, la protéine LC3 peut se lier au phagosome et favoriser son acidification par fusion avec les lysosomes. La localisation de la protéine LC3 sur la membrane du phagosome a été documentée par des études protéomiques afin de déterminer la composition de la membrane du phagosome (Shui *et al.*, 2008). Le recrutement de

la protéine LC3 peut-être induite par les « Toll-like receptors » TLRs. Dans ce cas, sa localisation à la membrane du phagosome ne dépend pas de l'induction de l'autophagie canonique. Même si, ATG5 et ATG7 sont requis pour le relocalisation de la protéine LC3 sur la membrane du phagosome à la suite d'une stimulation par les TLRs, ULK1, ne joue aucun rôle dans la LAP. La LAP aide le macrophage à dégrader les microorganismes, ainsi que les cellules apoptotiques et nécrotiques (Martinez *et al.*, 2011).

3.1.1.4 L'autophagie et la reconnaissance via les PRRs

Tous les organismes métazoaires possèdent des récepteurs appelés PRRs codés par l'information génétique germinale (Janeway, 1989). Ces PRRs reconnaissent des signaux de danger d'origine microbienne (MAMP) ou endogènes (DAMP). Ils permettent d'initier la dégradation des pathogènes par l'induction de la phagocytose, par la production de molécules antimicrobiennes, ou par l'initiation du processus inflammatoire. Ces récepteurs permettent de détecter une menace liée à l'infection et/ou au dommage tissulaire par reconnaissance d'un nombre fini, quoique très diversifié, de structures moléculaires (Beutler, 2004). Les PRRs sont exprimés à la fois sur les cellules immunitaires et non immunitaires. Ils reconnaissent des composants de la paroi ou de la membrane des bactéries, champignons et parasites mais aussi des acides nucléiques ou des composants intracellulaires libérés lors de dommages cellulaires. Chez les vertébrés, les cellules du SI inné jouent un rôle prépondérant dans la reconnaissance des signaux de danger. Leur activation permet de contribuer directement à l'élimination des microorganismes, à la réparation tissulaire et à l'activation de l'immunité adaptative chez les vertébrés (Joffre *et al.*, 2009). L'activation des PRRs mène à une réponse inflammatoire dont le profil est largement orienté par la nature de l'agent infectieux.

On classe de manière courante les PRRs en trois catégories. La première inclut les protéines transmembranaires, telles que les TLRs, les récepteurs lectine de type C (CLR) et les « cytosolic DNA sensors » (CDS) (Takeuchi and Akira, 2010). Le second groupe est composé de protéines cytosoliques, telles que les « nucleotide oligomerization domain receptors » (NOD)-like receptors (NLR), Retinoic acid-inducible gene (RIG)-I-like receptors (RLR) et les membres de la famille pyrin, HIN domain-containing (PYHIN) (Cerboni *et al.*, 2013). La plupart des PRRs active les mécanismes de défense par sollicitation de trois facteurs de transcription très conservés tout au long de l'évolution à savoir les facteurs NF- κ B, AP1 et IRF. La famille des NLRs comprend de plus des protéines formant un complexe appelé *inflammasome*. Ce complexe active la caspase 1 nécessaire à la maturation des cytokines pro-inflammatoires l'IL-1 β et IL-18 (Franchi *et al.*, 2012). La production des précurseurs de l'IL-1 β et de l'IL-18 nécessite également l'activation de NF- κ B.

L'autophagie et les TLRs (Medzhitov et al., 1997; Poltorak et al., 1998)

Les TLRs reconnaissent des ligands microbiens ou endogènes variés. Les TLRs sont historiquement la première classe de PRR à avoir été intimement liée à l'autophagie (Deretic, 2011). L'autophagie est induite par certains signaux TLR (Deretic, 2011; Levine *et al.*, 2011; Saitoh and Akira, 2010).

Xu *et al.* ont été les premiers à montrer que la stimulation du TLR4 dans des macrophages activait l'autophagie (Xu *et al.*, 2007), *ex vitro* et *in vitro* dans la lignée cellulaire RAW264.7 de macrophages murins. L'autophagie induite par du LPS permet la colocalisation de mycobactéries intracellulaires et des autophagosomes, facilitant leur élimination. Cette voie de signalisation active les acteurs de la voie de signalisation TRIF-p38. Dans cette étude, Xu *et al.* démontrent une étroite collaboration entre l'autophagie et l'immunité innée liée aux TLRs. En plus de l'activation de l'autophagie par le LPS, les ARN ligands des molécules TLR3 et TLR7 activent également l'autophagie. Deux différents ligands du TLR7, l'ARN simple brin (sbARN) et l'imiquimod (amine amidaziquinoline), induisent la formation d'autophagosomes (Delgado *et al.*, 2008). Ce processus est dépendant de la protéine intermédiaire MyD88 et favorise l'élimination de mycobactéries intracellulaires. Plusieurs études récentes montrent que la stimulation du TLR2 par des pathogènes stimule l'autophagie (Anand *et al.*, 2011; Fang *et al.*, 2014). En réponse à *Listeria monocytogenes*, les macrophages déficients en TLR2 et NOD2 montrent un défaut dans l'activation de l'autophagie et de la colocalisation entre les autophagosomes et les bactéries (Figure 12) (Anand *et al.*, 2011). L'induction de l'autophagie a été démontrée comme dépendante de la voie de signalisation qui implique ERK. Shi et Kehrl ont montré qu'une variété d'agonistes des TLR, incluant les TLR1, TLR3, TLR5, TLR6 et TLR7, permet l'induction de l'autophagie via les molécules MyD88 et TRIF. Ils ont de plus décrit qu'à la fois MyD88 et TRIF co-immunoprécipitent avec la protéine autophagique Beclin1 (Shi and Kehrl, 2008). L'interaction entre Beclin1 et les adaptateurs de la voie de signalisation des TLRs inhibe partiellement sa liaison avec Bcl-2, favorisant ainsi l'initiation de l'autophagie.

L'induction de l'autophagie par les TLRs permet la dégradation directe de pathogènes (Figure 12). L'autophagie participe également à la défense antivirale en facilitant le transport des PAMPs viraux cytosoliques vers les endosomes contenant des TLRs. Après endocytose, les acides nucléiques viraux peuvent être reconnus par les cellules hôtes via les récepteurs TLR3, TLR7 et TLR9. Après reconnaissance, la signalisation via NF- κ B et IRF7 permet d'induire la production de protéines pro-inflammatoires et d'IFN de type I respectivement. Par exemple, en réponse à l'infection par le VSV dans des DC plasmacytoides (pDCs), le TLR7 endosomal détecte la réplication virale ayant paradoxalement lieu dans le cytosol. Des travaux démontrent que l'autophagie facilite la délivrance de PAMP cytosoliques vers les lysosomes/endosomes, permettant d'activer le TLR7 (Lee *et al.*, 2007a). Par conséquent, les pDCs ayant une expression diminuée d'ATG5 produisent moins d'IFN- α ou d'IL-12 après infection par le VSV. Enfin, il a été montré que des complexes immuns, contenant de

l'ADN, stimulent les pDCs via une interaction coopérative entre le TLR9 et les récepteurs Fc. Cette interaction découle d'une voie dans laquelle les récepteurs Fc sont capables de délivrer après endocytose des complexes immuns contenant de l'ADN aux vésicules de type lysosomale contenant des TLR9. Cette voie participe à l'activation des pDCs et nécessite la machinerie autophagique (Henault *et al.*, 2012). De manière intéressante, des complexes immuns contenant de l'ADN isolé de sérum de patients atteints du lupus érythémateux disséminé (LED) activent le SI inné (Means *et al.*, 2005). La machinerie autophagique pourrait contribuer à ce phénomène.

L'autophagie et les RLR

La reconnaissance des ARN viraux dans le cytosol des cellules est réalisée par des récepteurs connus sous les noms de RIG-I et MDA-5. Ces deux protéines, toutes deux des RLRs, utilisent la voie de signalisation IPS-1 en activant les facteurs de transcription NF- κ B et IRF3, menant à la production de cytokines pro-inflammatoires et antivirales. Plusieurs études ont révélé que les voies de signalisation impliquant les RLR peuvent être contrôlées par l'autophagie ou par des composants de sa machinerie (Jounai *et al.*, 2007; Tal *et al.*, 2009). Tal et ses collègues ont montré que des cellules déficientes en *Atg5* surproduisent de l'IFN-I par la voie de signalisation impliquant les RLRs en réponse à une infection par le VSV (Tal *et al.*, 2009). Les auteurs expliquent que les mitochondries non-fonctionnelles s'accumulent en l'absence d'autophagie. Sachant que la production de ROS est associée aux mitochondries non-fonctionnelles, ce phénomène représente le premier signal de cette réponse. L'autophagie, dans ce cas, pourrait contribuer à réguler négativement cette amplification grâce à l'élimination de mitochondries non-fonctionnelles comme je l'évoquais dans le paragraphe 2.2.1 dédié à la mitophagie. Ainsi l'autophagie ou tout du moins la machinerie autophagique, contribue à réguler la signalisation des RLR (Tal *et al.*, 2009).

Autophagie et signalisation des TLRs et des RLRs : lien avec les I κ B kinases

Plusieurs voies de signalisation, telles que la voie des TLRs et des RLR, importantes dans l'immunité innée, impliquent les membres de la famille des I κ B kinases (IKK). Elles sont divisées en deux grandes familles : les premières, canoniques, telles que IKK α et IKK β ; les secondes, kinases proches de la famille des I κ B, telles que IKK ϵ et TBK-1, un régulateur clé de la réponse IFN de type I lors d'infection virale. Cette famille de kinase peut induire l'autophagie (Wild *et al.*, 2011). Dans ce cas, TBK1 phosphoryle l'optineurine, analogue de NEMO (IKK γ , qui sert de plateforme pour le complexe canonique d'IKK). L'optineurine phosphorylée qui joue un rôle de SLR via son domaine d'interaction LIR avec la protéine LC3, facilite la dégradation de pathogènes tels que *Salmonella* (Wild *et al.*, 2011). Les kinases IKK, IKK α et IKK β sont décrites comme participant à la voie classique d'induction de l'autophagie lors de carence en acides aminés (Comb *et al.*, 2011; Criollo *et al.*, 2010). Cette

activation est indépendante de NF- κ B (Comb *et al.*, 2011; Criollo *et al.*, 2010). Elles engagent plusieurs voies de signalisation.

La première est la déplétion de la protéine p53 cytosolique, décrite comme inhibant l'autophagie (Criollo *et al.*, 2010).

La deuxième voie consiste en l'activation de l'AMPK qui est associée aux voies de signalisation IKK, probablement via l'activation de « TGF- β -activated kinase 1 » (TAK1). On sait en effet que TAK1 peut activer l'AMPK (Herrero-Martin *et al.*, 2009), pouvant à son tour activer ULK1 (Egan *et al.*, 2011). En parallèle, le complexe mTOR1 est inhibé via Raptor et TCS2.

La troisième voie est l'implication d'IKK dans l'activation de la voie JNK-1. Même si le mécanisme n'est pas encore totalement décrit, JNK serait capable de phosphoryler Bcl-2 et de rendre disponible la protéine autophagique Beclin1 pour initier l'autophagie (He and Levine, 2010). Ainsi les liens entre autophagie et PRR sont à nouveau soulignés par les régulations décrites ci-dessus via les protéines IKK.

L'autophagie et STING

L'une des protéines permettant indirectement la reconnaissance d'ADN cytosolique est la protéine « stimulator of interferon genes » (STING). Il existe un lien entre activité autophagique et action de STING. La reconnaissance directe de l'ADN microbien, est exécutée via des senseurs cytosoliques tels que la GMP-AMP (cGAMP) synthetase qui produit un second messenger cGAMP afin d'initier la voie de signalisation STING. Liang et ses collègues ont montré, dans un premier temps, que l'interaction directe entre cGAS et Beclin1 supprime la synthèse de cGAMP (Figure 13), limitant ainsi la production d'IFN-I en réponse à de l'ADN double brin, par exemple lors d'une infection par le HSV-1 (Liang *et al.*, 2014). Dans un deuxième temps, ils ont montré que cette interaction permettait la dégradation via l'autophagie de pathogènes cytosoliques afin de prévenir l'activation de cGAS et la persistance de la réponse du SI. Dans une étude visant à déterminer le mécanisme de dégradation des mycobactéries, l'autophagie sélective ciblant *M. tuberculosis* a été montrée comme étant activée par la voie de signalisation cytosolique dépendante de STING (Watson *et al.*, 2012). Dans ce cas, l'ADN mycobactérien peut être transféré par perméabilisation à travers la membrane phagosomale de l'hôte et de ce fait, être reconnu par la voie cytosolique de signalisation de STING. La bactérie est par conséquent entourée d'ubiquitine, et celle-ci, peut être reconnue par l'adaptateur autophagique p62 qui pourra se lier à LC3 et engager l'initiation de la xénophagie. D'autres études de modèles d'infection par les virus à ADN double brin tel que HSV-1 ou le cytomegalovirus humain, révèlent que STING joue un rôle dans l'induction de l'autophagie (McFarlane *et al.*, 2011; Rasmussen *et al.*, 2011). D'autre part, l'autophagie, ou du moins sa machinerie, régule de façon négative la réponse IFN-I dépendante de STING. En effet, après une stimulation d'ADN double brin, ATG9a colocalise avec

STING dans l'appareil de Golgi, où est contrôlé l'assemblage de STING. La perte de fonction d'ATG9a, mais pas celle d'ATG7, permet la translocation de STING vers l'appareil de Golgi ce qui induit une activation aberrante de la réponse de l'IFN de type 1. Tous ces arguments démontrent une action réciproque entre la régulation de l'autophagie et la voie de signalisation cytosolique dépendante de STING (Saitoh *et al.*, 2009).

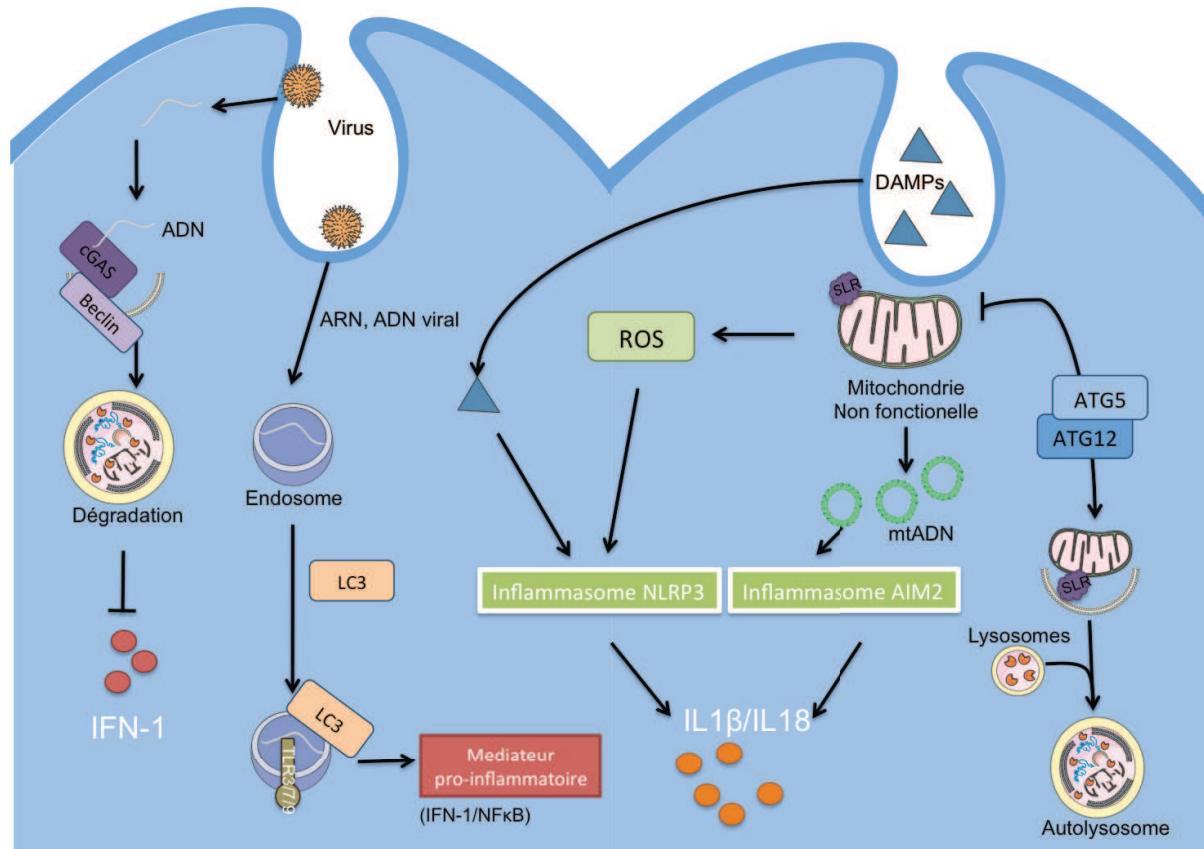


Figure 13 : Modulation du signal pro-inflammatoire par l'autophagie

L'interaction directe entre cGAS et Beclin1 permet la suppression de la sécrétion de cGAMP et de ce fait, la production d'IFN lors d'une infection virale ainsi que la dégradation du pathogène cytosolique par l'autophagie. La machinerie autophagique favorise la délivrance des PAMPs aux TLRs endosomaux. L'activation de l'inflammasome est régulée par l'autophagie. L'autophagie, via ATG5-ATG12 permet la régulation de l'inflammasome en dégradant les mitochondries non fonctionnelles, qui relarguent une grande quantité de ROS et de mtADN.

mtADN, ADN mitochondrial

Autophagie et NLR

Les récepteurs NOD qui reconnaissent des composants de la paroi des cellules bactériennes dans le cytosol, jouent un rôle important dans l'induction de l'autophagie. Plusieurs études ont montré que NOD1 et NOD2 activent l'autophagie en réponse à l'invasion bactérienne par reconnaissance de leurs ligands (Cooney *et al.*, 2010; Travassos *et al.*, 2010). Dans les cellules fibroblastiques MEF, NOD2

recrute ATG16L1 à la membrane plasmique au niveau de la zone d'entrée de la bactérie. Cela facilite le trafic de la bactérie vers les autophagosomes et leur fusion avec les lysosomes (Figures 12, 13). La dégradation de la bactérie est alors induite ainsi que la présentation d'antigènes bactériens via le CMH II par les DCs (Travassos *et al.*, 2010) ; (Cooney *et al.*, 2010). Dans ce processus, les protéines autophagiques telles qu'ATG5, ATG7, ATG16L1 et le récepteur qui interagit avec la sérine-thréonine kinase 2 (RIPK2), permettant la signalisation par NOD2, sont requis (Cooney *et al.*, 2010). Les senseurs bactériens NOD1 et NOD2 intracellulaires interagissent directement avec ATG16L1, favorisant à terme la dégradation des bactéries. ATG16L1 permet également de réguler l'inflammation induite par l'engagement des récepteurs NOD. Une étude récente démontre qu'ATG16L1 diminue la réponse inflammatoire induite par les senseurs NOD et ce, de manière indépendante de l'autophagie (Sorbara *et al.*, 2013). ATG16L1 bloque l'activation de RIP2 en limitant sa polyubiquitylation et en diminuant son incorporation dans le complexe de signalisation de NOD. Ce processus apparaît comme étant spécifique d'ATG16L1 étant donné que la délétion d'ATG5 et d'ATG9a n'affecte pas la réponse NOD, suggérant un mécanisme non-autophagique. L'importance de la régulation de l'inflammation et de la réponse antibactérienne par NOD2 et ATG16L1 est reflétée par les fortes associations entre des polymorphismes sur ces deux gènes et la maladie de Crohn. L'autophagie régule également l'activité d'autres membres de la famille des NLRs, pouvant former l'inflammasome. Ceci sera discuté ultérieurement.

3.1.2 Relation entre inflammation et autophagie

L'inflammation est un processus physiologique partagé par tous les eucaryotes supérieurs. Cet état résulte de plusieurs signaux de stress, seuls ou combinés. Premièrement, une perturbation de la composition de la flore commensale peut engendrer une inflammation des tissus. Des dommages tissulaires mécaniques seuls peuvent entraîner une inflammation de par la sécrétion de signaux de danger. Dans certains cas, des microorganismes peuvent pénétrer au niveau du site de lésion et participer au phénomène inflammatoire. Dans tous les cas, l'inflammation a pour but de permettre l'entrée dans les tissus de cellules du SI, de les activer et de favoriser la réponse immunitaire adaptative afin de réparer les tissus lésés à la fin du processus. L'inflammation est induite par des cytokines, en réponse à des signaux microbiens, MAMP ou à des signaux de danger codés par le génome du soi, DAMP pouvant être constitués de composants intracellulaires libérés dans le milieu extracellulaire. Le stress oxydatif induit par les ROS intra ou extracellulaires est également un stimulant potentiel de l'inflammation. La réponse immunitaire induite lors de l'inflammation doit être contrôlée et stoppée à la fin de la réaction. Sans cela, il peut se mettre en place une inflammation chronique qui mène à

un excès de mort cellulaire et de dommages tissulaires, amplifiant encore le phénomène inflammatoire. L'inflammation est donc régulée par un spectre large de phénomènes allant du stress métabolique, au contrôle et à l'élimination de pathogènes, à la réponse immunitaire et à l'homéostasie tissulaire.

L'autophagie est décrite comme un mécanisme catabolique impliqué dans la réponse au stress métabolique. Il est maintenant de plus en plus clair que le mécanisme autophagique est impliqué dans d'autres réponses au stress comme par exemple l'hypoxie (Goda and Kanai, 2012), la réponse à la production de ROS, la réponse au défaut de synthèse des protéines pouvant être lié au stress du RE (Deegan *et al.*, 2013), la réponse au stress génotoxique (Vessoni *et al.*, 2013) et à la reconnaissance et l'élimination des pathogènes (Tang *et al.*, 2012). Toutes ces réponses sont des acteurs du processus inflammatoire et sont impliquées dans la réponse immunitaire.

3.1.2.1 *L'autophagie et l'inflammation liée aux mitochondries*

L'autophagie régule probablement l'inflammation de manière ancestrale. En effet, comme il a été détaillé plus haut, en plus de sa fonction de senseur du stress énergétique, elle permet l'élimination de pathogènes, en particulier intracellulaires. Comme également évoqué précédemment, la xénophagie permet de séquestrer des pathogènes afin de les diriger vers la dégradation lysosomale (Gomes and Dikic, 2014). L'autophagie est induite dans ce cas par le stress métabolique résultant de l'invasion du pathogène ou par la reconnaissance des MAMPs par les PRRs. L'autophagie permet alors la réduction du phénomène d'inflammation en éliminant le pathogène. De manière intéressante, l'autophagie est également liée à l'homéostasie mitochondriale comme décrit dans le paragraphe 2.2.1. La mitochondrie est issue d'une protéobactérie ancestrale qui s'est adaptée à une vie intracellulaire eucaryote. Il apparaît possible qu'au cours de l'évolution, l'autophagie, initialement dédiée à la dégradation des pathogènes invasifs, permette encore chez les eucaryotes l'élimination des mitochondries, devenues organelles symbiotiques. Dans la régulation de l'inflammation, le maintien d'une population de mitochondries fonctionnelles est fondamental. Premièrement, l'autophagie limite la production de ROS par les mitochondries endommagées (Figures 13, 14) (Zhou *et al.*, 2011a). Deuxièmement, comme souligné précédemment, la dégradation des mitochondries entraîne la dégradation conjointe de certains PRR qui sont associés à la membrane de celle-ci, comme RIG-I et MDA5. D'ailleurs, l'inhibition de l'autophagie mène à une hyper réactivité face aux ARN double brin en terme de sécrétion d'IFN-I (Jounai *et al.*, 2007). L'autophagie est également nécessaire à la reconnaissance de l'ADN cytosolique. Dans certaines circonstances, l'ADN mitochondrial peut être libéré dans le cytosol, stimulant les PRRs appelés CDS, notamment dans les

macrophages (Nakahira *et al.*, 2011). Dans cette publication, il est rapporté qu'un senseur d'ADN encore non identifié mène à l'activation de l'inflammasome par la protéine 3 contenant le domaine NACHT, LRR et PYD (NALP3). Il s'en suit une production des cytokines pro-inflammatoires IL-1 β et IL-18. Une autre étude rapporte une contribution du TLR9 dans ce phénomène (Oka *et al.*, 2012). A ce jour, nous pouvons suspecter l'inflammasome AIM comme étant impliqué dans la reconnaissance d'ADN cytosolique. Un rôle non-autophagique des protéines ATGs régule également l'inflammation en réponse aux ADN cytosoliques. Saitoh montre dans son étude que la perte d'expression de la protéine ATG9, mais non de la protéine ATG7, améliore l'assemblage de STING lors de son induction par de l'ADN double brin, ce qui mène à une activation aberrante de l'immunité innée (Saitoh *et al.*, 2009). Une étude plus récente a montré que lors d'une infection virale par le virus de la grippe, NOD2 contrôle la dégradation des mitochondries endommagées par l'autophagie, limitant ainsi l'activation de l'inflammasome NLRP3 (Lupfer *et al.*, 2013).

3.1.2.2 L'autophagie et l'inflammasome

Au-delà de son rôle dans la réponse inflammatoire liée à l'accumulation de mitochondries endommagées, l'autophagie régule directement la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, spécialement dans les cellules phagocytaires. L'une des premières preuves expérimentales de ce rôle a été apportée par Saitoh et ses collègues (Saitoh *et al.*, 2008). Ils montrent que des macrophages déficients en protéine ATG16L1 sécrètent une grande quantité d'IL-1 β après stimulation par les TLRs. Ils démontrent que cette dérégulation de la sécrétion cytokinique est liée à une forte activité de l'inflammasome. L'inflammasome est un complexe protéique dans lesquelles des membres de la famille des NLRs servent de protéines senseurs. L'inflammasome participe à l'immunité innée en permettant la maturation de la pro-IL-1 β et de la pro-IL-18 en cytokines actives, grâce à l'activation de la caspase-1. L'un des mécanismes régulant négativement l'activation de l'inflammasome passe par la dégradation de la pro-IL1 β en réponse à une stimulation par des TLRs. Plus précisément, il a été montré que la pro-IL-1 β est séquestrée dans des vésicules positives pour la protéine LC3 lors d'une stimulation par le TLR4 (Figure 13, 14) (Saitoh *et al.*, 2008). De plus, la quantité de pro-IL-1 β est diminuée lors d'une stimulation de l'autophagie par de la rapamycine. Ceci suggère que lors d'une stimulation par les TLRs, la pro-IL-1 β est dégradée par l'autophagie, permettant de réduire la quantité de cette interleukine en absence de stimulation du NLR. Le groupe de Kehrl a quant à lui, démontré que l'assemblage de l'inflammasome résulte d'ubiquitylations. De ce fait, l'inflammasome peut être directement dégradé après liaison de la protéine autophagique p62 (Shi *et al.*, 2012). Les sécrétions d'IL-1 β et d'IL-18 sont alors limitées. On sait de plus que l'activité

d'ATG16L1 peut agir indirectement sur l'action de l'IL-1 β . Dans ce cas, ATG16L1 contrôle la quantité de TRAF6 via p62, diminuant l'expression du récepteur à l'IL-1 β (Lee *et al.*, 2012b). Comme mentionné précédemment, l'autophagie limite également l'activité de l'inflammasome indirectement en dégradant les mitochondries non fonctionnelles qui produisent des ROS (Lupfer *et al.*, 2013; Zhou *et al.*, 2011a).

Certains NLRs pouvant faire partie des inflammasomes, servent à l'inverse à réguler de manière négative l'autophagie. NLR4, NLRP3, NLRP4 et NLRP10 possèdent un domaine d'interaction avec la protéine Beclin1. Lors de l'invasion de la bactérie GAS, NLRP4, normalement associée avec la protéine Beclin1, recrute le phagosome contenant la GAS, tout en se dissociant de la protéine Beclin1 (Oh and Lee, 2014). Cette dernière peut participer à l'initiation de l'autophagie. De plus, NLRP4 peut interagir avec le complexe de protéine vacuolaire de classe C, ce qui résulte en l'inhibition de la maturation d'un autophagosome ou d'un endosome (Jounai *et al.*, 2011). Ces études nous indiquent qu'une balance fine co-régule l'activation des NLRs liée aux inflammasomes et à l'autophagie (Figure 14).

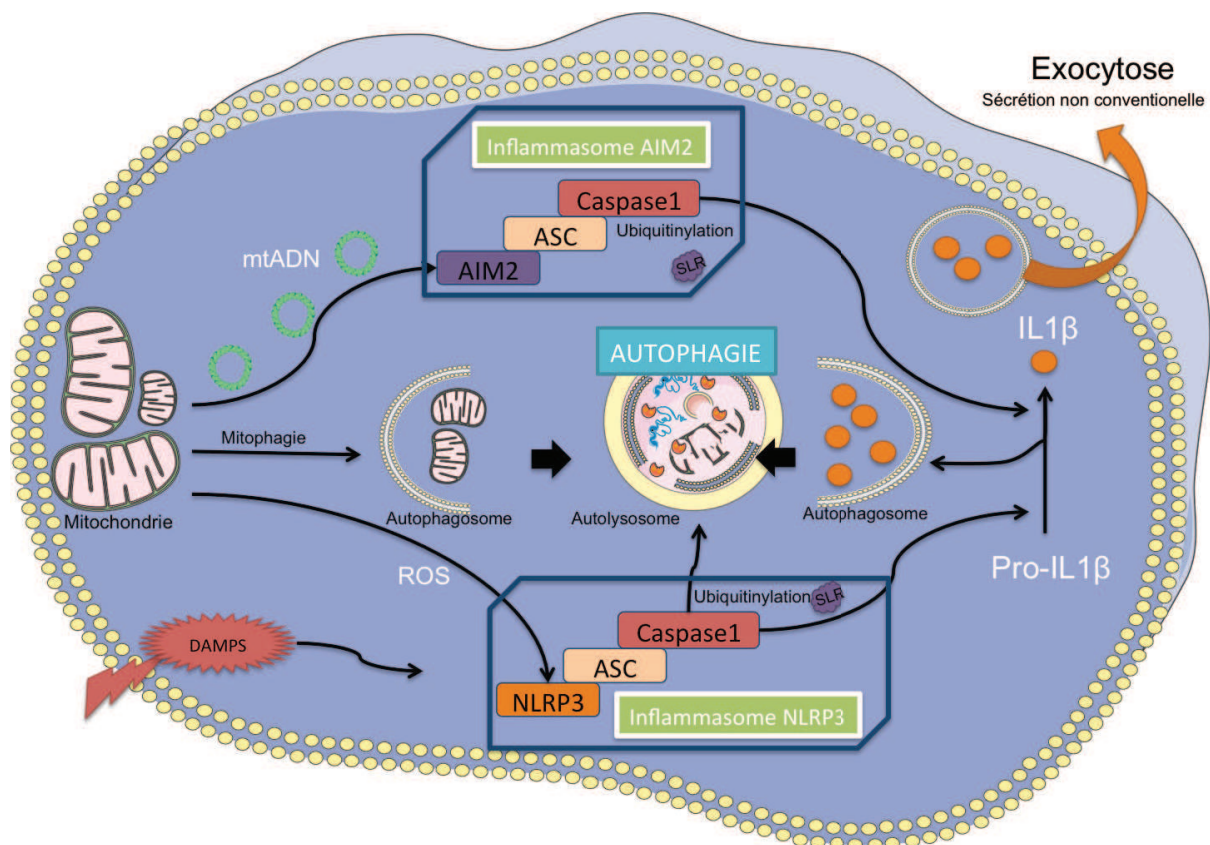


Figure 14 : Autophagie et inflammasome

L'inflammasome est une plateforme activée en réponse aux DAMPs ou aux PAMPs. L'autophagie joue un rôle double dans le processus pro-inflammatoire basé sur la régulation de l'activation de l'inflammasome et sur la sécrétion des cytokines induites. La stimulation de l'inflammasome permet l'activation de la caspase 1 et de la sécrétion de la cytokine IL-1 β . L'inflammasome AIM2 peut être activé par la présence d'ADN microbien ou mitochondrial intracellulaire alors que l'inflammasome NALP3 peut être activé par divers DAMPs dont des ROS. L'autophagie régule de façon négative l'inflammasome NLRP3 par la dégradation directe de ses composants. L'autophagie inhibe l'activation des inflammasomes NLRP3 et AIM en dégradant les mitochondries non fonctionnelles contribuant à l'activation de l'inflammasome. L'IL-1 β néosynthétisée peut également être dégradée par l'autophagie. Enfin, la machinerie autophagique intervient dans la sécrétion non-conventionnelle des cytokines induites par l'inflammasome telles que l'IL-1 β .

mtADN, ADN mitochondrial ; SLRs, « Sequestosome 1/p62 Like Receptors »

3.1.2.3 Cytokines et régulation de l'autophagie

L'autophagie est induite par de nombreuses cytokines, comme l'IFN- γ le TNF α , l'IL-1 α et β , comme montré principalement dans les macrophages. De plus, l'IL-6 est capable d'activer l'autophagie dans les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC) et le TGF β dans des lignées cellulaires d'hépatocarcinome. L'induction de l'autophagie par le TNF α a été démontrée comme dépendante de la génération de ROS et de la voie de signalisation de JNK et ERK. L'induction de l'autophagie par l'IFN γ chez la souris est quant à elle dépendante de la protéine « immunity-related GTPase family M protein » (IRGM) (Gutierrez *et al.*, 2004a). Il est à noter qu'à la différence de la souris, l'expression d'IRGM chez l'Homme est indépendante de la quantité d'IFN γ . A l'inverse, l'IL-4 et l'IL-13 sont des cytokines qui inhibent l'autophagie, dans ce cas, l'inhibition de l'autophagie est dépendante de la voie de signalisation STAT6 et Akt qui activera mTOR. L'IL-10 enfin inhibe l'autophagie par les voies de signalisation STAT3 et Akt (Ni Cheallaigh *et al.*, 2011).

L'autophagie peut également exercer un impact sur la sécrétion de cytokines. Comme décrit précédemment, l'autophagie permet de réguler de façon négative la sécrétion des cytokines dépendantes de l'inflammasome, IL-1 β et IL-18. L'autophagie peut aussi inhiber la sécrétion de l'IL-1 α dans les DCs et les macrophages (Harris, 2013). L'IL-1 α est synthétisée sous une pro-forme dans le cytoplasme, puis clivée par la protéase calpaïne avant d'être sécrétée par la cellule. Il a été montré dans un modèle de souris déficiente pour l'autophagie spécifiquement dans les cellules myéloïdes, que les macrophages sécrétaient un taux important d'IL-1 α . La dégradation de la pro-IL-1 α par la calpaïne est induite par la génération de ROS, elle-même consécutive de l'augmentation du nombre de mitochondries non fonctionnelles dans les cellules sans autophagie (Castillo *et al.*, 2012). A l'opposé, l'autophagie permet une régulation positive de la transcription et la sécrétion de TNF α , IL-8 et IL-6 (Harris, 2011).

3.1.3 L'autophagie et l'inflammation chronique

3.1.3.1 Maladie de Crohn

La première identification d'un gène candidat de la voie autophagique concernant l'auto-inflammation a été réalisée au début des années 2000. Une des premières pathologies humaines liant une dérégulation de l'autophagie à l'inflammation, est la maladie de Crohn dont nous avons déjà parlé précédemment. Cette maladie s'apparente à une maladie inflammatoire de l'intestin. Le patient peut présenter une inflammation tout au long du tractus intestinal, de la bouche à l'anus. Cette maladie inclut une multitude de symptômes, douleur intestinale, diarrhée, vomissement, perte de poids et grande fatigue. L'hypothèse de l'association de défauts dans la régulation de l'autophagie et le développement de la maladie résulte d'étude par des GWAS. L'un des premiers gènes décrits comme associé à la maladie est le gène NOD2, dont certaines variantes génétiques prédisposent à la maladie (Hugot *et al.*, 2001). Ces mutations ont d'abord été identifiées par des études de déséquilibre de liaison génétique puis confirmée par les GWAS. Un décalage du cadre de lecture et deux mutations non sens, qui altèrent un domaine répété riche en résidus leucine de ce gène, ont été validées (Ogura *et al.*, 2001). La maladie de Crohn est liée à une hyper inflammation causée par des facteurs environnementaux comme une flore commensale anormale et une réaction immunitaire anormale contre cette flore (Netea and Joosten, 2010). Les prédispositions génétiques participent au processus inflammatoire. La perte de fonction due à une des mutations de NOD2 mène à la diminution de production d'IL-6, IL-8 et TNF α lors d'infections cytosolique par des pathogènes au niveau de l'épithélium. Cette diminution de sécrétion mène à un déficit de dégradation des pathogènes. Ce déficit de réponse inflammatoire participe à terme, de façon paradoxale, à l'induction d'une réponse immunitaire chronique contre les microorganismes. La perte de fonction du mutant NOD2 dans les PBMCs de patient atteints d'une maladie de Crohn, entraîne une diminution de la production de la cytokine régulatrice IL-10. Nous pouvons donc penser que NOD2 participe, de manière plus globale, à une régulation négative de l'activité du SI, en particulier des LTs (Netea and Joosten, 2010). La réduction du nombre et de la survie des lymphocytes Treg a été observée chez les patients présentant l'allèle « perte de fonction » de NOD2 (Rahman *et al.*, 2010). NOD2 est surexprimé dans la population de lymphocytes innés de l'intestin. Ces cellules contribuent à l'homéostasie, via leur activité cytolytique contre les cellules infectées mais aussi par leur production d'IL-22, connue pour diminuer les symptômes inflammatoires dans les modèles de souris développant une colite. Finalement, la mutation de NOD2 est liée à une diminution de la sécrétion de peptides antimicrobiens par les cellules de Paneth en réponse à l'invasion de bactérie

(Wehkamp *et al.*, 2004). La diminution de production de défensines contribue à augmenter la quantité de bactéries dans l'intestin et favorise l'inflammation.

Les expériences récentes de GWAS ont contribué à identifier de nouveaux gènes candidats impliqués dans les maladies inflammatoires. C'est lors de ces études que la participation de la machinerie autophagique a été suggérée ; comme par exemple pour la maladie de Crohn. Ces études confirment NOD2 comme gène candidat pour le développement de cette maladie et identifie un nouveau « single nucleotide polymorphism » (SNP) dans la partie codante du gène ATG16L1, fortement corrélé avec le développement de cette maladie (Barrett *et al.*, 2008; Hampe *et al.*, 2007; Rioux *et al.*, 2007). Plusieurs études successives montrent une relation commune potentielle entre les polymorphismes d'ATG16L et la perte de fonction de NOD2 (en sachant que l'autophagie est directement liée à l'élimination de pathogènes). La première étude qui montre un lien entre le récepteur NOD et l'autophagie a été effectuée par l'équipe de Leonardo Travassos (Travassos *et al.*, 2010). Dans cette étude, les auteurs montrent que le muryldipeptide (MDP), ligand du récepteur NOD2, est capable d'induire l'activité autophagique. De plus, pendant une infection bactérienne, NOD1 est recruté à la membrane plasmique avec ATG16L1. Les auteurs ont également démontré que les cellules exprimant la protéine mutante la plus commune de NOD2 ne permettent pas de localiser ATG16L1 à la membrane plasmique. Dans ce cas, il n'y a pas d'induction de l'autophagie, ce qui diminue l'efficacité de dégradation du pathogène. De manière intéressante, le mutant T300A de la protéine ATG16L1 est également inefficace pour induire le recrutement de la protéine LC3 et initier l'autophagie en réponse au MDP. L'autophagie observée après traitement à la rapamycine n'est en revanche pas altérée. Ceci suggère un effet sélectif du mutant sur la xénophagie au regard des autres formes d'autophagie, probablement via l'incapacité à recruter NOD2, comme souligné plus loin.

Un autre point d'intérêt qui lie les protéines NOD2 et ATG16L1 dans la pathogénicité de la maladie de Crohn est leur rôle décrit dans l'homéostasie des cellules de l'épithélium intestinal et les cellules de Paneth. L'équipe du Pr Virgin a généré des souris avec des allèles hypomorphiques (HM) d'ATG16L1 (Cadwell *et al.*, 2008). Comme la délétion totale d'ATG16L1 est létale chez la souris, ce nouveau modèle permet une étude *in vivo* d'une déficience en ATG16L1. Les auteurs ont comparé une souris ATG16L1^{HM} avec une souris transgénique ayant une délétion conditionnelle d'ATG5 dans les cellules qui contiennent la CRE recombinase, sous le contrôle du promoteur Villin, qui restreint la délétion de l'autophagie aux cellules de Paneth. Ce travail a montré qu'à la fois ATG5 et ATG16L1 sont nécessaires à l'exocytose de granules par les cellules de Paneth. Cette même étude a validé la production de granules anormaux chez les patients présentant l'allèle à risque T300A d'ATG16L1. L'inhibition des cytokines TNF- α et IFN- γ , qui sont considérées comme les acteurs majeurs de l'inflammation dans la maladie de Crohn, suffit à réduire le dommage des tissus. D'autres stimulations comme le stress du RE semblent être capables d'induire une inflammation intestinale.

L'équipe de Richard Blumberg a montré que dans des souris déficientes pour *Xbp1* spécifiquement dans les cellules de l'épithélium intestinal, le stress du RE était accru. L'autophagie est alors induite (Adolph *et al.*, 2013) et est nécessaire à l'homéostasie du tissu. Il y a, à ce jour, deux publications qui montrent en détail l'activité autophagique dans les cellules de Paneth chez les patients qui développent une maladie de Crohn (Ciccia *et al.*, 2014; Thachil *et al.*, 2012). Les auteurs démontrent paradoxalement une augmentation de l'autophagie dans les cellules de Paneth. Une distribution aberrante des granules dans le cytoplasme est pourtant confirmée et est associée à une activité crinophagique, mécanisme qui cible les granules sécrétoires vers les autolysosomes. D'après ces études, on peut penser que la dérégulation de l'autophagie, plutôt que sa simple diminution, contribue à une sécrétion anormale des granules d'exocytoses dans la maladie de Crohn.

Le rôle de l'inflammasome dans le développement de la maladie de Crohn est quant à lui controversé, au même titre que les sécrétions d'IL-1 β qui sont nécessaires à la réparation des tissus. La colite induite par du Sulfate de Sodium Dextran (DSS), dépendante de l'activation de l'inflammasome, ne récapitule donc pas complètement le développement de l'inflammation existant dans la maladie de Crohn. Il est possible que la sécrétion d'IL-1 β contribue à l'inflammation liée à la maladie quand l'autophagie est non fonctionnelle. Le groupe de Mihai Netea a montré que les PBMCs de patients portant un allèle ATG16L^{T300A}, expriment une grande quantité d'IL-1 β après stimulation de NOD2 (Plantinga *et al.*, 2011). Cette augmentation de la production n'est pas corrélée avec une augmentation du clivage de la pro-IL-1 β par la caspase 1, suggérant dans ce cas une absence d'effet direct sur l'inflammasome. Kara Lassen et ses collègues ont montré qu'une souris « knock-in » pour le variant ATG16L^{T300A} déclenchait une réponse inflammatoire plus forte en terme de production d'IL-1 β lors d'une invasion bactérienne (Lassen *et al.*, 2014). Cela suggère un rôle de l'activation de l'inflammasome dans la régulation de la réponse au pathogène intestinal ou à la flore commensale. La publication la plus récente sur ce sujet montre que l'allèle T300A peut moduler l'expression d'ATG16L1 rendant cette protéine plus susceptible à la dégradation par la caspase 3. Cette perte de stabilité pourrait participer à l'augmentation des cytokines pro-inflammatoires par les macrophages et créer un défaut de dégradation de certaines bactéries.

Comme évoqué précédemment, ATG16L1 qui fait partie du premier complexe de conjugaison ATG12-ATG5/ATG16L1 favorisant la lipidation de la protéine LC3 (Mizushima *et al.*, 1999). Des études récentes ont montré une interaction entre ATG16L1 et FIP200 (Nishimura *et al.*, 2013). Cette interaction est importante lors de la localisation du complexe ATG12-ATG5/ATG16L1 à proximité du lieu de formation de l'autophagosome. La protéine ATG16L1 est composée d'un domaine répété WD en position C-terminale. La mutation de cette séquence est caractéristique de la variante allélique associée à la maladie de Crohn. D'ailleurs, la mutation T300A se trouve dans la région répétée WD.

Par conséquent, il est important de clarifier la manière dont la mutation, « T300A » d'ATG16L1 substituant un résidu alanine à un résidu thréonine en position 300 de la séquence consensus, participe au développement de la maladie de Crohn chez l'Homme. Il apparaît que sa contribution ne soit pas seulement liée à la dérégulation de l'autophagie canonique. Dans ce cas, c'est l'association avec NOD2 qui est compromise et non sa fonction pro-autophagique (**Publication 4, Figure 1**).

3.1.3.2 *Le rôle de l'autophagie dans l'inflammation associée au syndrome métabolique*

Le syndrome métabolique humain consiste en la combinaison de plusieurs facteurs cliniques liés à la dérégulation du métabolisme cellulaire. Cela inclut l'obésité, un niveau plus élevé d'insuline, l'hypertension et un fort taux de cholestérol. Ces paramètres mènent à des pathologies à composante inflammatoire. Nous pouvons citer comme exemple le TIID, l'athérosclérose et d'autres maladies cardiovasculaires (maladie coronarienne, accidents vasculaires cérébraux). Comme énoncé précédemment, l'autophagie joue un rôle prépondérant dans le métabolisme et la régulation de l'inflammation et a été soupçonnée assez tôt de jouer un rôle dans le syndrome métabolique. En effet, l'autophagie est régulée négativement lors d'un régime riche en calories, associé au développement du syndrome métabolique. De plus, le risque de développer ce groupe de symptômes augmente avec l'âge, alors que le niveau global d'autophagie décroît.

Les premières études liant l'autophagie et le syndrome métabolique se sont intéressées au TIID. Ils ont montré que les cellules β du pancréas de rats ayant suivi un régime riche en graisse (HFD), comportaient des agrégats aberrants de protéines ubiquitinylées (Kaniuk *et al.*, 2007). Ces agrégats peuvent être observés dans des lignées cellulaires de pancréas *in vitro* grâce à un traitement par un taux élevé de glucose. Ils augmentent après traitement de ces cellules avec de la 3-méthyladénine, un inhibiteur de l'autophagie. L'autophagie doit donc être impliquée dans la clairance de ces agrégats et de ce fait, protège également la cellule de la mort cellulaire et de l'inflammation qui pourrait en résulter. Ce rôle protecteur de l'autophagie sur les cellules β du pancréas a été confirmé dans d'autres modèles de souris. Des souris C57BL/6 sous HFD et des souris db/db, modèle de souris utilisée pour étudier le TIID, voient une augmentation de l'activité autophagique dans les cellules β du pancréas (Ebato *et al.*, 2008). Ces études sont corrélées avec les résultats obtenus dans les travaux de Changyou Li et collaborateurs (Li *et al.*, 2006a). C. Li décrivent également des autophagosomes dans les cellules β provenant de rat développant un diabète de type gras. Ceci compromet la structure et la survie des cellules qui forment les îlots (Jung *et al.*, 2008). Cela mène à une perte de tolérance au glucose et de sécrétion de l'insuline. Ces études ont été confirmées par

une autre étude, où l'autophagie est déficiente dans les cellules β , menant ainsi à un stress du RE, amplifiant la progression de l'obésité chez ces souris (Quan *et al.*, 2012). Cette progression diminue l'activité protectrice de l'autophagie face au TIID et augmente le dépôt de peptides amyloïdes dans les îlots (IAPP), comme montré par le groupe de Costes (Rivera *et al.*, 2014). Des agrégats d'IAPP, co-exprimés avec l'insuline, sont associés à l'obésité et au blocage du flux autophagique. Le lien direct, *in vivo*, entre l'accumulation d'IAPP et la réduction de l'activité autophagique, a été récemment démontré dans un modèle de souris, exprimant de façon spécifique l'IAPP dans les cellules β et en même temps déficiente pour la protéine ATG7 dans ces mêmes cellules. Ils démontrent que l'autophagie permet la dégradation d'agrégats d'IAPP, diminue l'apoptose des cellules β et l'apparition du TIID (Kim *et al.*, 2014). De manière intéressante, l'augmentation de l'autophagie par l'administration de tréhalose dans des souris HFD améliore la tolérance au glucose. Cela laisse penser que l'autophagie serait une cible thérapeutique séduisante pour le traitement du TIID.

L'autophagie est importante dans la régulation du métabolisme lipidique de par la lipophagie (voir plus haut, paragraphe 2.2.3). Ce mécanisme est important dans le contrôle de la quantité de gouttelettes lipidiques dans le tissu adipeux. L'équipe de Maria Rosa Ciriolo a montré que le facteur de transcription « forkhead homeobox type protein O1 » (FoxO1) est activé lors d'une restriction en nutriments dans une lignée cellulaire d'adipocytes (Lettieri Barbato *et al.*, 2013). L'activité de FoxO1 est liée à la régulation des processus lysosomaux en général et à l'autophagie en particulier. Dans ce contexte, l'activation de FoxO1 mène à accroître la dégradation des gouttelettes lipidiques via la lipophagie. La metformine, utilisée dans le traitement du TIID, est connue pour activer l'autophagie et mène au même résultat. Cet ensemble d'arguments suggère que l'autophagie régule la masse grasseuse, le métabolisme lipidique et le relargage des acides gras libres (FFA) par les adipocytes.

L'importance de l'autophagie dans le diabète n'est pas restreinte aux adipocytes et aux îlots de Langerhans du pancréas. La dérégulation de la mobilisation de l'énergie par les cellules musculaires peut également participer au développement du TIID. L'autophagie a dans ce cas un rôle de régulateur. Le groupe de Beth Levine a démontré qu'en absence d'autophagie induite par la protéine Beclin1 lors d'une carence en acides aminés ou d'un exercice physique, le métabolisme du glucose est compromis dans les muscles cardiaques et squelettiques, ce qui prédispose à l'intolérance au glucose (He *et al.*, 2012a).

Ainsi l'autophagie régule le métabolisme via son rôle direct sur l'homéostasie des cellules pancréatiques, musculaires et adipeuses. L'autophagie joue également un rôle indirect sur le développement du syndrome métabolique via la régulation de l'inflammation. En effet, plusieurs publications démontrent un lien direct entre la baisse de l'activité autophagique et l'inflammation chronique caractéristique du TIID. L'IL-1 β est connue pour participer à la résistance à l'insuline en

inhibant directement la voie de signalisation Akt après stimulation par le récepteur de l'insuline. Le TNF- α est lui aussi connu pour limiter l'effet de l'insuline. L'incorporation de l'acide gras saturé palmitate permet l'activation de l'inflammasome via NALP3 dans les macrophages grâce à l'activation des NADPH oxydases et à la génération de ROS (Wen *et al.*, 2011). L'activation de l'inflammasome lors de HFD a été démontrée comme induisant une résistance à l'insuline *in vivo*. Dans les conditions normales, l'activité de l'AMPK peut limiter la production de ROS en favorisant la β -oxydation de FFA. De manière intéressante, le traitement par le palmitate en plus d'une stimulation par le LPS mène à une diminution de l'activité AMPK et de l'activité autophagique. Cette diminution est suspectée de porter atteinte à la mitophagie, en favorisant le relargage de ROS par les mitochondries. Ce processus participe à la surexpression de l'IL-1 β et à l'entretien du phénotype diabétique lié à l'inflammation.

La majorité des précédentes publications se sont focalisées sur un type cellulaire spécifique, immunitaire ou non. Une publication récente montre qu'une baisse globale de l'activité autophagique dans des souris ATG7^{-/-}, mène à une inflammation associée à un TIID après leur croisement avec des souris ob/ob (Lim *et al.*, 2014). Cela peut expliquer pourquoi le risque de développer un TIID augmente avec l'âge lorsque l'autophagie décline et valide l'utilisation de l'autophagie comme cible thérapeutique.

Une autre manifestation du syndrome métabolique liée à l'inflammation est l'athérosclérose. L'HFD peut mener à une accumulation de lipides dans l'intima des artères. Cette région peut s'étendre lors de l'activation de l'épithélium et ainsi participer à la sécrétion de cytokines inflammatoires. Ce processus sert au recrutement des monocytes qui pourront par la suite se différencier en macrophages. Lipides natifs ou oxydés, lipoprotéines à faible densité (LDL) sont alors internalisés via les récepteurs « scavengers » des macrophages. L'accumulation et l'activation de ces macrophages perpétuent alors l'inflammation par la sécrétion de cytokines ou la génération de ROS. Dans certains cas, les macrophages peuvent alors se différencier en cellules spumeuses qui contiennent un fort taux de lipide. Ces cellules sont sujettes à l'apoptose et à la nécrose qui génèrent des débris cellulaires induisant à leur tour l'inflammation.

L'autophagie participe à l'instabilité des plaques d'athérome en contribuant au stress et à la mort cellulaire. La formation de l'autophagosome est détectée dans les cellules de l'intima de la plaque (Martinet *et al.*, 2004; Martinet and De Meyer, 2009). Afin de déterminer le rôle que joue l'activation de l'autophagie dans la plaque, deux études ont été menées. Elles décrivent deux modèles de souris déficientes pour la protéine ATG5 spécifiquement dans les macrophages, sur un fond génétique développant une athérosclérose (souris déficientes pour l'apolipoprotéine ou pour le récepteur LDL) (Liao *et al.*, 2012; Razani *et al.*, 2012). On observe chez ces souris une augmentation de l'apoptose et

du stress oxydatif dans les macrophages présents dans les plaques. Comme suspecté, les macrophages déficients pour la protéine ATG5 sécrètent une grande quantité d'IL-1 β après avoir été stimulés par du LPS. Si l'on co-incube ces cellules avec des cristaux de cholestérol, composant abondant de la plaque, on active alors l'inflammasome. Cette activation est due au manque de dégradation lysosomale des cristaux, liée à la déficience en autophagie. L'inflammation est alors induite par les cytokines libérées par les macrophages activés. Ce processus attire les cellules du SI créant des dommages cellulaires et perpétuant l'inflammation.

L'efferocytose, processus phagocytaire dédié à l'élimination de débris cellulaires, est également souvent décrite comme déficiente dans les plaques d'athérosclérose. L'inhibition de l'autophagie, dans le travail de Liao et ses collègues, induit une sensibilisation des macrophages à la mort cellulaire après traitement à l'oxisterol, composant des plaques athérosclérotiques et connu pour activer le stress du RE. Dans un même temps, le stress oxydatif est augmenté dans les macrophages déficients en autophagie, ce qui les rend moins compétents à la clairance des débris cellulaires. Ce phénomène aboutit ainsi donc également au maintien de l'inflammation. L'autophagie dans les cellules phagocytaires contribue donc à l'efferocytose. Sa défaillance ou peut-être plus précisément celle du phénomène de LAP (Martinez *et al.*, 2011) pourrait participer à la formation de plaque.

Une meilleure compréhension du rôle de l'autophagie dans le syndrome métabolique en général, mis en regard du mode alimentaire et des phénomènes de sénescence, pourrait améliorer les traitements existant pour limiter l'inflammation chronique (**Publication 4, Figure 2**).

3.2 Autophagie et présentation antigénique

La présentation antigénique est une étape clé dans la transmission d'information entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Elle est également impliquée dans l'éducation des LTs. De nombreuses études démontrent un rôle de l'autophagie ou de sa machinerie dans la présentation antigénique via le CMH I et II.

3.2.1 L'autophagie et la présentation par le CMH I

Les LTs conventionnels peuvent reconnaître via leur TCR des antigènes peptidiques présentés par les molécules du CMH. Les LTs CD8⁺ reconnaissent des peptides présentés par les molécules du CMH I, molécules exprimées par toute cellule nucléée. Les molécules de CMH I présentent des antigènes provenant de plusieurs sources cytosoliques. Ces antigènes peuvent être des peptides du soi, des peptides issus de microorganismes intracellulaires, ou encore des antigènes tumoraux (Crotzer and

Blum, 2010). Certaines DCs sont également capables de présenter des antigènes d'origine exogène à leur surface sur des molécules du CMH I. Ce phénomène est appelé présentation croisée (Joffre *et al.*, 2012) . Les molécules du CMH I présentent des peptides de 8 à 12 résidus d'acides aminés générés pour la plupart par le protéasome. Les peptides générés dans le cytosol sont transportés vers la lumière du RE via le transporteur TAP. Le peptide est alors chargé grâce à l'aide de plusieurs molécules chaperonnes sur les molécules du CMH I synthétisées dans le RE. La voie d'exocytose permet d'exporter les molécules du CMH I à la surface cellulaire, après passage par l'appareil de Golgi. Peu d'études suggèrent une implication directe de l'autophagie dans la présentation « classique » d'antigènes par les molécules du CMH I. Dorothee Schmid et ses collègues n'ont pas réussi à montrer l'implication de la présentation par les molécules de CMH I d'un épitope viral lorsque celui ci était conjugué à la protéine LC3, un mécanisme qui est par contre bien mieux décrit et démontré dans la présentation par les molécules du CMH II (Schmid *et al.*, 2007). D'autres études font le même constat en montrant que l'autophagie ne serait pas impliquée dans la présentation par les molécules de CMH I. Toutefois, il a été décrit que la suppression de l'autophagie diminue l'expression des molécules du CMH I à la surface de cellules tumorales de type carcinome, (Li *et al.*, 2010). En revanche, d'autres études argumentent en faveur d'un rôle de l'autophagie dans la voie de présentation croisée.

Via la présentation croisée, les LTs CD8+ sont en effet capables de répondre à des antigènes d'origine extracellulaire après leur internalisation. Li *et al.* ont démontré que la présentation croisée des DC est induite et plus élevée lors d'une augmentation de l'autophagie dans une lignée cellulaire tumorale, alors qu'elle peut être réduite lors de l'inhibition de l'autophagie dans ces mêmes cellules (Li *et al.*, 2008). L'équipe de Guido Kroemer a montré plus tard que l'immunisation de souris avec des cellules dont l'autophagie était augmentée avant leur mort, facilitait la présentation croisée par les DCs aux LTs CD8+ (Uhl *et al.*, 2009). Il a également été montré que la présentation croisée de nanoparticules $\alpha\text{Al}_2\text{O}_3$ requiert la voie autophagique (Li *et al.*, 2011), tout comme la présentation d'antigènes associés au virus de la fièvre jaune (Ravindran *et al.*, 2014) ou des antigènes fongiques (De Luca *et al.*, 2012). Ainsi, bien que la machinerie autophagique semble être impliquée dans le trafic de la voie de présentation croisée, le mécanisme exact n'est pas encore clair. La machinerie autophagique pourrait être requise pour le trafic des antigènes vers les compartiments nécessaires à la présentation croisée. Il est aussi possible que des cellules à forte activité autophagique génèrent des structures facilement captées par la voie de présentation croisée dans les DCs. Cette observation pourrait offrir des perspectives intéressantes en terme de vaccination.

3.2.2 La présentation antigénique par les molécules du CMH II

Les cellules exprimant des molécules du CMH II sont appelées « CPA professionnelles ». Elles comprennent des phagocytes comme les macrophages et les DCs mais également les LBs. Les cellules épithéliales thymiques expriment également les molécules du CMH II, permettant ainsi l'éducation des LTs CD4+ dont le TCR est restreint à la reconnaissance de l'antigène dans le contexte de cette classe de CMH. Initialement, la présentation antigénique par les molécules du CMH II était décrite comme spécialisée dans la dégradation et la présentation d'antigènes à travers le trafic des endosomes. Les antigènes peuvent être captés à partir de l'espace extracellulaire. L'antigène est alors pris en charge par la voie endosomale où il sera dégradé par des protéases et gagnera l'accès aux molécules du CMH II dans un compartiment spécialisé, le compartiment des molécules du CMH II (CIIM) (Figure 15).

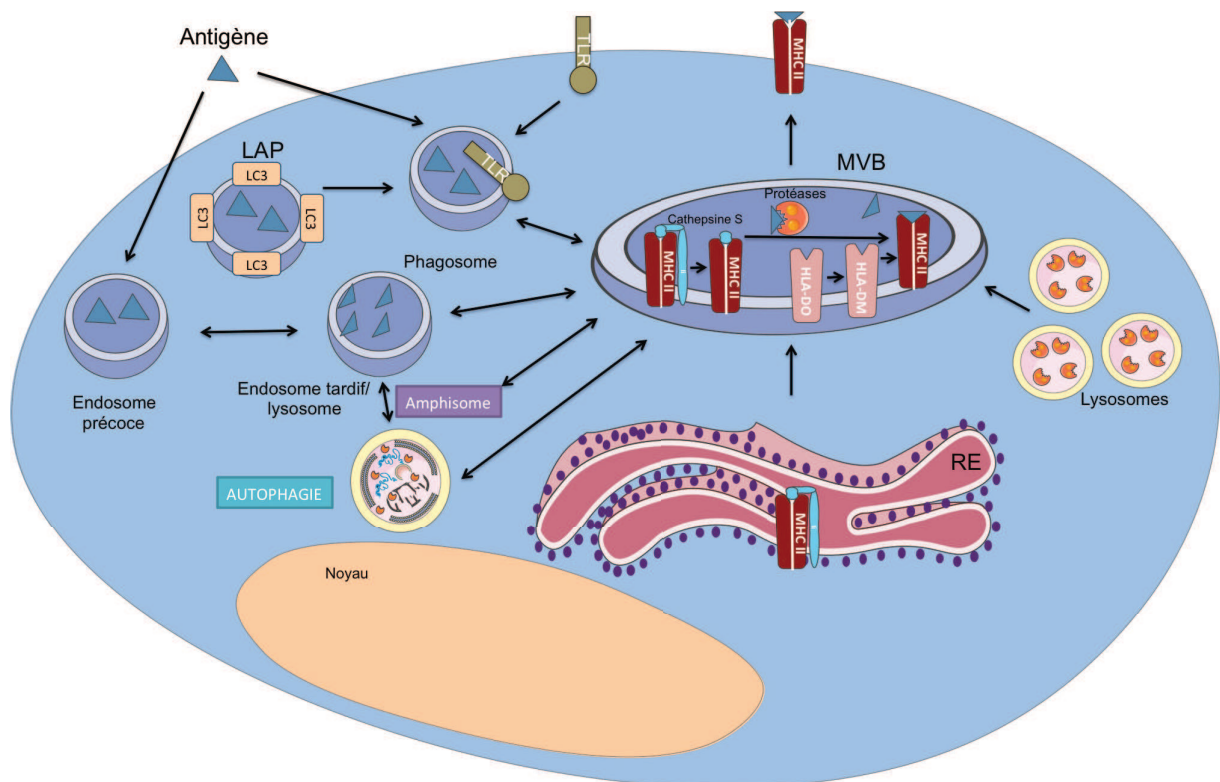


Figure 15 : Apprêtement et présentation de l'antigène sur les molécules du CMH de classe II

La présentation antigénique via les molécules du CMH II implique un trafic de l'antigène des endosomes précoces vers les endosomes tardifs/lysosomes où l'antigène pourra être dégradé. L'antigène peut être internalisé par la phagocytose. L'internalisation de l'antigène dans des phagosomes peut être facilitée par l'activation des TLRs, de plus décrite comme induisant la LAP. La machinerie autophagique contribue à la dégradation et au chargement de l'antigène sur les molécules du CMH II grâce au phénomène de LAP. De plus, l'autophagie peut capter des antigènes cytosoliques et les acheminer vers le compartiment des molécules du CMH II où ils seront apprêtés. Le CIIM est un corps de nature multivésiculaire. Ce compartiment contient les éléments nécessaires pour que l'antigène puisse être apprêté, à savoir les molécules du CMH II, HLA-DM, HLA-DO, et des protéases. Lorsque les molécules du CMH II sont nouvellement synthétisées, elles sont liées à une chaîne invariante. La chaîne invariante est dégradée dans le CIIM par la cathepsine S et s'en suit un échange entre le peptide CLIP et l'antigène qui sera présenté sur les molécules du CMH II, grâce à l'intervention des molécules HLA-DM/DO. Les molécules du CMH de classe II ainsi chargées du peptide à présenter peuvent se diriger vers la membrane plasmique où ils pourront présenter l'antigène.

LAP, « LC3-Associated Protein » ; MVB, Corps MultiVésiculaires ; CIIM, Compartiment du Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II

Les molécules du CMH II nouvellement synthétisées dans le RE sont liées à une protéine non polymorphique appelée chaîne invariante (Ii) (Cresswell, 1996). Le schéma classique implique que cette vésicule se dirige directement vers les endosomes tardifs/lysosomes. Mais deux études montrent que cette vésicule, transite d'abord de la voie du trans-golgi vers la membrane plasmique, puis le complexe Ii/molécule du CMH II est ensuite endocyté par la voie des clathrines (Dugast *et al.*, 2005; McCormick *et al.*, 2005). Suivant l'endocytose (Roche *et al.*, 1993), le complexe Ii/molécule du CMH II transite vers les endosomes précoces puis tardifs, ces derniers ayant reçu l'apport du contenu lysosomal. Afin de pouvoir lier et présenter un antigène, les molécules du CMH II doivent se dissocier de la protéine Ii (Roche and Cresswell, 1990). Cet événement aura lieu dans le CIIM. Le CIIM est caractérisé par un environnement acide, par l'activité de protéases et par la présence de molécules accessoires HLA-DM et HLA-DO chez l'Homme ou H-2M et H-2O chez la souris. Ce compartiment multiple forme le MVB. Ii est dégradée par protéolyse dans ce compartiment en un petit fragment qui reste associé à la poche peptidique des molécules du CMH II nommé CLIP. Ainsi, ce fragment doit encore être relargué préalablement à l'association avec l'antigène. La dégradation de CLIP se fait par l'enzyme HLA-DM codée par un gène situé dans la région du CMH. HLA-DO est une autre protéine similaire aux molécules du CMH II qui supprime l'activité d'HLA-DM lorsque ce compartiment devient suffisamment acide (Blum *et al.*, 2013; Neefjes, 1999). Après la suppression de la protéine CLIP, les molécules du CMH II peuvent se lier à l'antigène à présenter, quittent le MVB et se dirigent vers la membrane plasmique par exocytose afin de permettre une reconnaissance éventuelle par les LTs CD4+ (Figure 15).

A la différence des macrophages et des DCs, les LBs comportent peu de molécule du CMH II dans les compartiments endosomaux tardifs. Dans les LBs, le trafic des molécules du CMH II vers le CIIM est

induit par la signalisation du BCR. Ce mécanisme unique permet la convergence des molécules du CMH II et de l'antigène associé au BCR dans un même compartiment, favorisant la présentation des antigènes captés par le BCR.

Comme suggéré précédemment, la source la mieux décrite d'antigènes peptidiques s'associant avec le CMH II est extracellulaire. Elle suit la voie d'endocytose, de pinocytose ou de phagocytose dans les phagocytes professionnels. Dans ce dernier cas, la stimulation de PRR de surface, de récepteurs « scavengers », ou de récepteurs au fragment constant (Fc) des Ig induit la formation d'un phagosome puis la formation d'un phagolysosome après fusion avec les lysosomes (Blander and Medzhitov, 2004). Dans certaines circonstances, lors de phagocytose par les DCs, la protéine autophagique LC3 est recrutée au niveau des phagosomes. Ceci a été particulièrement démontré lorsque la particule phagocytée contient des ligands pour les TLRs. C'est le phénomène de LAP décrit ci-dessus (Sanjuan *et al.*, 2007). La LAP induit dans les DCs une meilleure stabilité de l'antigène dans le temps sur les molécules du CMH II (Romao *et al.*, 2013b). Dans les macrophages, la LAP est associée à une augmentation de l'efficacité de dégradation d'antigènes (Martinez *et al.*, 2011; Sanjuan *et al.*, 2007).

Les antigènes endogènes présents dans la cellule provenant du cytosol ou du noyau peuvent également être présentés via les molécules du CMH II. L'accès pour la présentation aux antigènes endogènes est grandement facilité par l'autophagie. Classiquement, les LTs CD4+ reconnaissent des antigènes qui sont endocytés et dégradés dans les compartiments acides afin d'être présentés par les molécules du CMH II. L'équipe de Christian Münz a montré pour la première fois que la présentation d'antigènes endogènes, tels que la protéine virale EBNA1, est dépendante de la machinerie autophagique. Lors d'une inhibition de l'acidification des lysosomes, EBNA1, un antigène latent dominant lors de l'infection par le virus Epstein-Barr (EBV) des LBs, s'accumule dans les autophagosomes. De plus, l'inhibition de l'autophagie diminue la reconnaissance des clones T CD4+ de l'antigène spécifique EBNA1 présenté par les LBs infectés. Ainsi, l'autophagie contribue à la présentation antigénique des antigènes endogènes via les molécules du CMH II (Paludan *et al.*, 2005). De manière intéressante, l'autophagie peut être exploitée comme une voie de chargement d'antigènes endogènes vers la voie de la présentation antigénique des molécules de CMH II (Münz, 2009; Schmid *et al.*, 2007). Schmid *et al.* ont montré dans les DC primaires que, dans la plupart des cas, les autophagosomes fusionnent avec les compartiments CIIM. Plus de 50% des compartiments CIIM sont formés après la fusion d'autophagosomes et d'endosomes (Schmid *et al.*, 2007). De manière intéressante, il a été montré que dans une lignée de LBs lymphoblastiques, les antigènes présentés sur les molécules du CMH II proviennent du compartiment cytoplasmique de la cellule. L'autophagie induite dans ces cellules par la carence en acides aminés augmente la proportion de ces antigènes intracellulaires présentés par les molécules du CMH II (Dengjel *et al.*, 2005). Lors d'une

stimulation de l'autophagie, par cette même carence en acides aminés ou lors d'ajout de rapamycine, il y a une augmentation de la présentation antigénique mycobactériennes via les molécules du CMH II à la suite d'une infection intracellulaire par le BCG dans les macrophages et les DCs (Jagannath *et al.*, 2009). Une autre étude montre que l'antigène d'une mycobactérie, Ag85B, colocalise avec la protéine autophagique, LC3. Cela suggère que l'autophagie peut capturer des antigènes qui s'échapperaient des phagosomes et permettrait leur transfert vers les CIIM où ils seront dégradés puis présentés aux LTs CD4+ après apprêtement sur le CMH II. L'immunisation de souris avec des DCs traitées à la rapamycine et infectées par des mycobactérie peut améliorer la réponse des LTs CD4+ spécifiques de cette mycobactérie. De plus, la fusion de protéine spécifique du virus de la grippe avec la protéine LC3, ciblant l'antigène vers les autophagosomes, améliore la réponse T CD4+ spécifique face à un épitope viral de cette protéine (Jagannath *et al.*, 2009). Lee et ses collègues ont montré qu'ATG5 était requis pour la présentation antigénique par les DCs *in vivo*. L'autophagie est connue pour jouer un rôle dans la présentation d'antigène cytosoliques via les molécules du CMH II. Des souris qui sont déficientes pour l'autophagie dans les DCs montrent une diminution de la réponse CD4+ après une infection par le virus herpes simplex (HSV). Dans cette même étude il apparaît qu'ATG5 soit aussi impliquée dans la présentation d'antigènes d'origine extracellulaire lorsque ceux-ci contiennent des ligands des TLRs. Dans ce cas, cette forme de LAP permet d'optimiser la fusion du phagosome vers le lysosome et de ce fait d'augmenter la dégradation de l'antigène pour son chargement sur les molécules du CMH II (Lee *et al.*, 2010a). Une étude récente a montré que, dans les DCs, certains autophagosomes émergeraient en fait des CIIM. Ces compartiments contiennent à la fois la machinerie nécessaire à la présentation antigénique mais également les protéines impliquées dans l'autophagie, à savoir LC3 et ATG16L1 (Kondylis *et al.*, 2013). Ainsi, l'autophagie ou sa machinerie participent à la génération d'épitopes d'origine endogène mais aussi exogène (LAP) pour être présentés aux LTs CD4+ via les molécules du CMH II. Ce processus intervient dans l'éducation et l'activation de l'immunité adaptative. D'autres formes d'autophagie, comme la CMA pourraient contribuer à la complète dégradation de certaines protéines, la plupart du temps dans les CPAs afin d'aider celles-ci dans leur rôle de cellules présentatrices d'antigènes (Crotzer and Blum, 2008).

3.3 Autophagie et Immunité adaptative

3.3.1 L'autophagie et la différenciation des précurseurs lymphocytaires

L'autophagie est cruciale pour la production d'un nombre normal de lymphocytes en régulant la quantité de ROS générés par les mitochondries dans les cellules souches hématopoïétiques (HSC) et leur différenciation en précurseurs lymphoïdes communs (CLP). Afin de contrôler le niveau de ROS, les HSC maintiennent un taux élevé des protéines autophagiques LC3-II et ATG5 (Gurumurthy *et al.*, 2010; Salemi *et al.*, 2012). L'inhibition ou la délétion de l'autophagie, à la fois *in vivo* et *in vitro*, résulte en une perte des HSC devenant non-renouvelables. Il en résulte une diminution importante du nombre de cellules différenciées en aval telles que les cellules de la lignée myéloïde, les LBs, les LTs (Liu *et al.*, 2010; Mortensen *et al.*, 2010; Mortensen *et al.*, 2011). Au-delà de son rôle dans la survie et le renouvellement des précurseurs des lymphocytes, l'autophagie est un acteur fondamental de la biologie des cellules immunitaires et en particulier des LBs et LTs matures comme prouvé par la génération de nombreux modèles murins (Tableau 2).

Génotype	Cellules	Commentaires
Atg5 ^{f/f} CD19cre Atg7 ^{f/f} CD19cre Chimère RAG-/- + cellules de foie foetal de souris Atg5-/-	Lymphocytes B (Miller <i>et al.</i> , 2007, Chen <i>et al.</i> , 2014, Chen <i>et al.</i> , 2015)	<ul style="list-style-type: none"> L'autophagie est nécessaire au développement des lymphocytes B1a et lors de la transition entre les stades pro et pré-B dans la moelle osseuse Survie des LB mémoire Survie des plasmocytes
Chimères Atg16L1 ^{-/-}	Macrophages (Saitoh <i>et al.</i> , 2008)	<ul style="list-style-type: none"> Production accrue d'IL-1 et d'IL-18 en réponse au LPS dû à une augmentation de l'activité de l'inflammasome
Atg5 ^{f/f} pLCKcre Atg7 ^{f/f} pLCKcre Atg3 ^{f/f} pLCKcre Beclin1 ^{f/f} pLCKcre Atg5 ^{f/f} CD4cre Vps34 ^{f/f} CD4cre Beclin1 ^{f/f} CD4cre Chimère RAG-/- + cellules de foie foetal de souris Atg5-/- Atg5 ^{f/f} Granzyme cre	Lymphocytes T (Parek <i>et al.</i> , 2013, Willinger <i>et al.</i> , 2012 Jia <i>et al.</i> , 2011 Pua <i>et al.</i> , 2007 Pua <i>et al.</i> , 2009 Stephenson <i>et al.</i> , 2009 Kovacs <i>et al.</i> , 2012)	<ul style="list-style-type: none"> Forte baisse du nombre de thymocytes, forte baisse du nombre de LT en périphérie Mort cellulaire accrue après stimulation par le TCR Prolifération compromise Charge mitochondriale et de RE élevée Survie des LT CD8+ mémoire
Atg5 ^{f/f} CD11c cre	Cellules dendritiques (Lee <i>et al.</i> , 2007)	<ul style="list-style-type: none"> Atg5 est nécessaire à la présentation antigénique par les DCs <i>in vivo</i> d'antigènes endogènes et exogènes si ces derniers comportent des ligands du TLR Présentation d'auto-antigène dans l'EAE (modèle murin de sclérose en plaque)
Atg5 ^{f/f} LysMcre Atg7 ^{f/f} LysMcre	Ostéoclastes (Deselm <i>et al.</i> , 2011)	<ul style="list-style-type: none"> La résorption de l'os cause la formation de cavités. ATG5 et ATG7 sont requis pour orienter la sécrétion des lysosomes responsables de la résorption de l'os.

Tableau 2 : Modèles de souris déficientes pour l'autophagie spécifiquement dans les cellules du système immunitaire

3.3.2 L'autophagie et la biologie des lymphocytes T

3.3.2.1 L'autophagie dans le développement des thymocytes

Les cellules épithéliales et dendritiques médullaires thymiques expriment un niveau élevé de molécules du CMH II. Cette expression est capitale pour l'éducation des LTs CD4+. De manière intéressante le thymus présente un niveau élevé d'autophagie basale si on le compare à d'autres tissus (Kuma *et al.*, 2004; Mizushima *et al.*, 2004; Nedjic *et al.*, 2008). Les cellules du thymus, que ce soit les cellules épithéliales thymiques (TEC) du cortex (cTEC) ou de la médula (mTEC), présentent une activité autophagique intense (Nedjic *et al.*, 2008). Lors de la sélection positive, les LTs initialement double positifs CD4+ CD8+ deviennent soit T CD4+, dont le TCR aura une affinité pour une molécule du CMH II, soit T CD8+ dont le TCR sera plus affin pour une molécule du CMH I. Les cellules mTEC et les DCs médullaires contrôlent la sélection négative des thymocytes (Figure 16). Les macrophages sont également présents dans le thymus, nécessaires à la dégradation des cellules apoptotiques. Les DCs et les mTEC présentent des antigènes du soi sur leurs molécules du CMH II et à ce stade, un thymocyte exprime un TCR, après réarrangement génique avec une trop forte affinité pour un peptide, il est délété ou anergisé. La source de peptides présentés par le CMH II par les TECs a longtemps fait débat étant donné le fait que ces cellules soient peu phagocytaires. L'origine des peptides du soi présentés par ces cellules semblait provenir de la seule voie de chargement des peptides via le CMH II connue à l'époque, c'est-à-dire la voie exogène. Plusieurs études ont ainsi montré que les TECs pouvaient présenter des peptides du soi d'origine endogène via la dégradation autophagique (Kasai *et al.*, 1998; Kasai *et al.*, 2009).

Les études de Nedjic et de ses collègues montrent que lors d'une greffe de thymus déficient en autophagie sur une souris *nude*, la sélection positive des thymocytes est altérée et les souris développent des colites inflammatoires auto-immunes (Nedjic *et al.*, 2008). Ainsi l'autophagie du thymus joue un rôle important dans la sélection thymique, probablement via le chargement de peptides du soi sur les molécules de CMH II exprimées par les TEC. Une étude plus récente, menée par Aichinger, montre le rôle de l'autophagie dans la sélection négative dans la partie médullaire du thymus (Aichinger *et al.*, 2013). Il utilise pour cela une souris transgénique qui exprime un antigène modèle présenté par les molécules du CMH II des mTECs. Cette expression supprime de manière spécifique les LTs exprimant un TCR reconnaissant cet antigène particulier mais seulement lorsque les mTEC sont compétentes pour l'autophagie. L'autophagie contribue de ce fait à l'induction de la tolérance centrale pour les LTs CD4+. Cela laisse à penser, qu'une déficience en autophagie pourrait contribuer au développement de maladies auto-immunes chez l'Homme. Aucune indication à ce jour ne permet de l'affirmer.

L'autophagie peut avoir un impact sur l'induction de l'immunité adaptative via son rôle dans l'inflammation et dans la présentation antigénique. Nous allons maintenant aborder les rôles de l'autophagie intrinsèques aux lymphocytes pour leur activation et leur survie.

3.3.2.2 L'autophagie et l'homéostasie des cellules T

L'autophagie a initialement été décrite comme mécanisme de survie dans des conditions de carence en acides aminés dans de nombreux types cellulaires. L'autophagie joue également un rôle dans le métabolisme des LTs à des stades variés de leur développement et maturation jusque dans leurs fonctions effectrices. Nous allons voir dans ce paragraphe consacré aux LTs, que l'implication de l'autophagie dans ces cellules est cruciale pour leur homéostasie. On sait également que l'autophagie joue un rôle dans l'activation des LTs et dans leur polarisation. Enfin, récemment, il a été montré que l'autophagie était nécessaire au maintien des LTs CD8 mémoire (Figure 16).

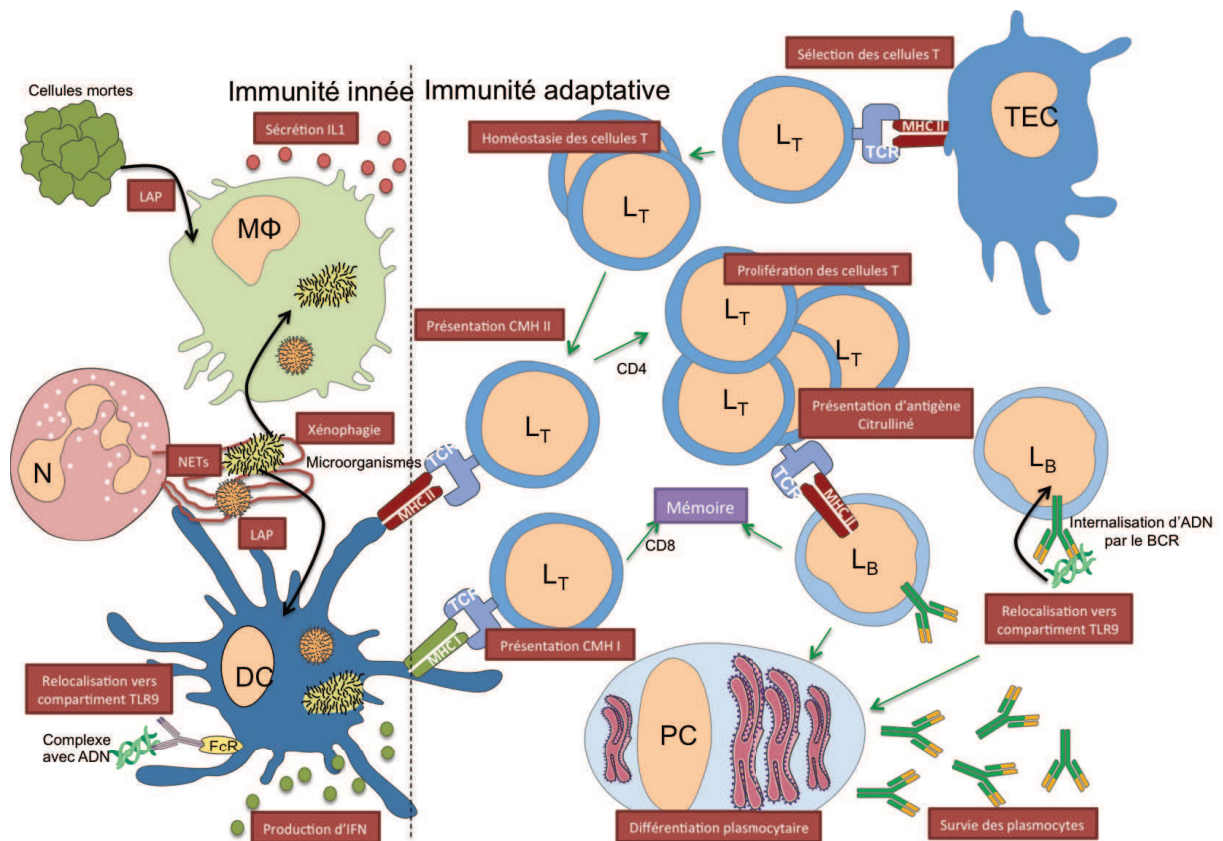


Figure 16 : Implication de l'autophagie dans le système immunitaire

L'autophagie est impliquée dans l'immunité, notamment via le phénomène de xénophagie qui facilite l'élimination des microorganismes intracellulaires ou la LAP qui contribue à la phagocytose de pathogènes extracellulaires et de débris de cellules mortes. L'autophagie permet d'une part la sécrétion d'IL-1 α et d'IL-1 β par les macrophages en régulant l'activité de la calpaïne et de l'inflammasome et d'autre part participe à la NETose des neutrophiles. De plus, l'autophagie et sa machinerie modulent l'intensité de la réponse IFN-I en régulant le trafic des PRRs mais aussi en contribuant à la relocalisation des complexes immuns contenant de l'ADN vers les compartiments TLR9 positifs.

Dans l'immunité adaptative, la machinerie autophagique contribue à la présentation antigénique aux LTs par les DCs et les LBs, d'antigènes intracellulaires ou extracellulaires.

De plus, l'autophagie est requise pour l'éducation des thymocytes, l'homéostasie des LTs périphériques, leur survie, activation et différenciation. Quant aux LBs, l'autophagie contribue à leur différenciation en cellules plasmocytaires ainsi qu'à leur survie.

DC, Cellule Dendritique ; FcR, Récepteur Fc ; L_B, Lymphocyte B ; LAP, LC3-Associated Protein ; L_T, Lymphocyte T ; M Φ , Macrophage ; N, Neutrophile ; NETs, Neutrophile Extracellular Trap ; PC, Plasmocytes ; TEC, Cellule Epithéliale Thymique

Le transfert de cellules de foie foetal de souris déficientes pour *Atg5* (qui contient des HSC) dans des souris C57BL/6 provoque en plus d'une forte perte de thymocytes, une forte baisse du nombre de LTs en périphérie (Pua *et al.*, 2007). Par opposition, les souris déficientes pour la recombinaison RAG ne sont pas capables de générer des LBs et des LTs. Dans l'étude de Benjamin Ortiz, ont été générées des souris chimères par complémentation de blastocystes de souris RAG1-/- par des cellules souches embryonnaires déficientes pour la protéine autophagique Beclin1. Ainsi la lignée lymphocytaire ne provient que de cellules déficientes pour Beclin1. On observe dans ces souris chimères une forte réduction du nombre de CLP et de thymocytes, bien que le nombre de LTs périphériques soit comparable aux souris reconstituées de cellules souches embryonnaires contrôles (Arsov *et al.*, 2011). Ainsi il semble donc que Beclin1 soit requise pour le développement précoce des LTs alors qu'ATG5 est également impliquée dans l'homéostasie des LTs matures (Figure 16).

Les thymocytes comportent une grande quantité de RE et de mitochondries en comparaison des LTs de la périphérie (Jia *et al.*, 2011; Pua *et al.*, 2009). Lors d'une délétion du gène *Atg3* dans les thymocytes, les quantités de RE (Jia and He, 2011; Jia *et al.*, 2011; Parekh *et al.*, 2013) et de mitochondries (Jia and He, 2011; Parekh *et al.*, 2013; Pua *et al.*, 2009) ne sont pas réduites dans les LTs matures en comparaison des thymocytes. Les LTs matures déficients en ATG5 ou ATG7 conservent donc une grande quantité de mitochondries générant des ROS (Pua *et al.*, 2009; Stephenson *et al.*, 2014; Willinger and Flavell, 2012), les sensibilisant à l'apoptose. De plus, le RE est alors distribué tout le long de la cellule alors qu'il devrait se localiser en un seul pôle. Un stress du RE est alors détecté (Jia *et al.*, 2011) compromettant la survie des cellules.

Plusieurs études ont montré que l'autophagie est induite dans les LTs lors de leur activation par le TCR, et celle-ci ajuste la sélection des cargos à dégrader (Hubbard *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2006a). Un LT non stimulé dégrade préférentiellement des organelles dans ses autophagosomes alors que lors de

l'activation de ces cellules, les autophagosomes dégradent préférentiellement des protéines. Comme évoqué plus haut, les LTs naïfs, déficients en autophagie lors de leur développement présentent une augmentation des masses de RE et de mitochondries. On peut donc penser qu'en absence d'autophagie les défauts de prolifération (Hubbard *et al.*, 2010; Jia *et al.*, 2011; Kovacs *et al.*, 2012; Parekh *et al.*, 2013; Willinger and Flavell, 2012) et de sécrétion de cytokine (Hubbard *et al.*, 2010; Parekh *et al.*, 2013) observés en réponse à une stimulation au TCR, sont en partie dûs à l'expansion du RE et de la masse mitochondriale. L'expansion du RE dans ces LTs favorise le stockage du calcium au détriment de sa libération cytosolique lors d'une stimulation par le TCR. Ce stock de calcium ne provoque que peu d'ouvertures de canaux calciques à la membrane plasmique. La quantité de calcium cytoplasmique dans des LTs activés délétés en autophagie est ainsi diminuée. Il en résulte une diminution de la prolifération et des fonctions effectrices (Jia *et al.*, 2011). Ces données montrent qu'une faible masse du RE dans les LTs naïfs, maintenue par la réticulophagie, est importante dans l'activation et la prolifération de ces cellules. De plus, l'autophagie est importante dans l'homéostasie mitochondriale et plus précisément dans l'élimination des mitochondries non-fonctionnelles productrices de ROS, toxiques pour la cellule. Il est à noter que, lors d'une réduction de l'autophagie spécifiquement dans les LTs, il y a également une augmentation de la quantité de pro-caspases qui s'accumulent et sensibilisent les cellules à l'apoptose (Kovacs *et al.*, 2012).

L'autophagie dans la différenciation des lymphocytes T CD4+

Il existe une grande variété de sous-populations de LTs CD4+, aux fonctionnalités bien distinctes. Les populations les plus représentées sont les lymphocytes Treg et les lymphocytes Th. Les cellules Th peuvent se différencier en plusieurs sous-types, les mieux décrits étant les cellules Th1, Th2 et Th17. Les cellules Treg possèdent un métabolisme différent des cellules Th : les Tregs ont recours à l'oxydation des acides gras alors que les Th sont plutôt dépendants de la glycolyse, du moins dans les premiers temps d'activation (Michalek *et al.*, 2011). En ce qui concerne la signalisation intracellulaire lors de la différenciation des LTs, il est admis que, si mTOR est induit dans les cellules activées, ces cellules auront tendance à se différencier en cellules Th alors que s'il y a une faible induction de mTOR et une forte induction de l'AMPK, les cellules auront tendance à se différencier en cellules Treg (Michalek *et al.*, 2011). De plus, bien que l'ensemble des cellules Th dépendent de l'induction de mTOR, les cellules Th1 et Th17 requièrent plutôt l'activation de mTORC1 et alors que les cellules Th2 requièrent plutôt celle de mTORC2. Les facteurs environnementaux, comme la présence et la production de glucose, peuvent influencer la différenciation des LTs naïfs en cellules Th ou Treg. Les premières études sur l'implication de l'autophagie dans la différenciation des LTs naïfs ont montré que les cellules Th2 ont un taux d'autophagie plus élevé que les cellules Th1 (Li *et al.*, 2006a). Cela est corrélé avec leur résistance à la mort cellulaire. Dans cette étude, l'autophagie a été quantifiée par le

comptage du nombre d'agrégats de protéine LC3. Une autre étude utilisant des LTs déficients en autophagie visait à induire la polarisation de ces cellules en Th1, Th2 ou Th17. Les auteurs ont remarqué que les sous-populations Th1 et Th2 montrent une moins bonne survie après stimulation en absence d'autophagie que les Th17. Les cellules Th17 sont donc décrites pour être plus résistantes et moins dépendantes de l'autophagie pour leur survie par rapport aux autres sous-types (Kovacs *et al.*, 2012). De manière intéressante, les souris qui ont une délétion spécifique de l'autophagie dans les LTs, par suppression de la protéine Beclin1, sont résistantes à l'induction d'encéphalopathie auto-immune expérimentale (EAE), modèle murin de la sclérose en plaques. Cette maladie auto-immune est très dépendante des cellules Th1 et Th17. Les LTs délété en autophagie n'entrent pas dans le système nerveux central et prolifèrent moins lors d'une seconde stimulation *in vitro*. Toutes ces études montrent que l'autophagie est nécessaire à l'activation et à l'orientation phénotypique des LT CD4+.

L'autophagie et la mémoire des cellules T

La plupart des modèles de délétion de l'autophagie spécifiquement dans les LTs montre un fort effet délétère sur la survie et la fonction des LTs CD8+ par rapport aux LTs CD4+. L'étude du rôle de l'autophagie dans la biologie des LTs CD8+ en d'autant compliquée.

Les LTs CD8+ sont dépendantes de la glycolyse pour leur activation et leur différenciation en cellules cytotoxiques et donc pour l'acquisition de leurs fonctions effectrices (Henson *et al.*, 2014). Lors d'une réponse immunitaire impliquant les LTs CD8+, certains d'entre eux se différencient en LTs mémoire à longue durée de vie. Ces cellules acquièrent un métabolisme différent de celui des cellules effectrices en favorisant la phosphorylation oxydative et l'oxydation des acides gras, de manière similaire aux Treg (Pearce *et al.*, 2009). Une étude a démontré que les LTs CD8+ mémoire avaient recours à la lipolyse via les lysosomes afin de subvenir à leurs besoins métaboliques (O'Sullivan *et al.*, 2014). L'équipe de Rafi Ahmed a montré que l'autophagie était importante dans la dynamique de la réponse immunitaire dépendante des LTs CD8+, mais également pour la formation des LTs CD8+ mémoire. Pour ce faire, les auteurs ont généré un modèle murin dans lequel l'autophagie n'est invalidée que lors de leur différenciation en cellules effectrices. Ces souris sont invalidées pour l'expression du gène *Atg7* grâce à l'expression d'une recombinaise cre exprimée sous contrôle du promoteur du gène codant pour les granzymes. Ainsi dans cette étude, ils s'affranchissent des problèmes de survie basale des LTs CD8+ décrits dans les modèles précédents. Ils concluent que l'autophagie joue un rôle dans l'évolution du métabolisme des LTs CD8+ effectrices lors de leur transition en cellules mémoire en situation d'infection virale. Contrairement au paradigme jusque-là admis, le flux autophagique est inhibé lors de la phase effectrice de la réponse T CD8+. En revanche,

l'activité autophagique s'active plus tardivement et est nécessaire à la survie des cellules mémoire (Xu *et al.*, 2014). L'autophagie, dans ce cas, paraît nécessaire au maintien du métabolisme lié à l'oxydation des acides gras, probablement de par le contrôle du bon fonctionnement de l'activité mitochondriale. Les auteurs montrent enfin que l'autophagie dans les LTs CD8+ est essentielle pour le contrôle de l'infection chronique par le virus LCMV. En parallèle, l'équipe d'Anna Katharina Simon confirme que l'absence d'autophagie altère de manière dramatique la réponse des LTs CD8+ mémoire suite à une infection virale. De façon intéressante, elle montre que, d'une part, le déclin de l'autophagie lié à l'âge pourrait affecter la mémoire T CD8+ (Puleston *et al.*, 2014) et d'autre part que la réponse mémoire de souris âgées peut être améliorée par stimulation de l'autophagie via un traitement par la spermidine.

3.3.3 Les lymphocytes B et l'autophagie

Comme mentionné précédemment, la déficience en autophagie précocement lors de l'hématopoïèse compromet la différenciation des lymphocytes et de leurs précurseurs (Mortensen *et al.*, 2010). En utilisant des souris chimères à partir de cellules de foie fœtal déficientes pour *Atg5*, Pua et ses collègues ont décrit une baisse sévère du nombre de LTs mais également de LBs en périphérie (Pua *et al.*, 2007). L'utilisation de souris chimères a également été rapportée dans le travail de Miller en 2008. Ces auteurs démontrent que l'autophagie est nécessaire au développement des LBs plus particulièrement lors de la transition entre les stade pro et pré-B dans la moelle osseuse (Miller *et al.*, 2008). Les auteurs de ce travail ont également développé un modèle murin de délétion d'ATG5 sous le contrôle du promoteur CD19 exprimé à partir du stade pré-B. Ces animaux ne présentent pas de défaut majeur de développement des LBs, sans doute dû au fait que la délétion d'ATG5 n'est que partielle dans ce modèle. Dans les deux cas, les auteurs ne notent en revanche pas de défaut majeur dans la proportion des différentes populations de LBs en périphérie à l'exception d'une diminution de la population de cellules B1-b du péritoine. Ainsi le rôle de l'autophagie dans les LBs en périphérie paraît marginal. Il est à noter cependant que les défauts observés lors du développement des LBs déficients en autophagie dans les souris chimères, pourraient être liés à des phénomènes plus précoces lors de la différenciation hématopoïétique. Le rôle de l'autophagie dans le développement des LBs reste donc à décrire plus précisément.

L'autophagie ou sa machinerie pourrait également participer au trafic du BCR. Le BCR internalisé transporte l'antigène vers le compartiment multivésiculaire qui contient les molécules du CMH II, mais également vers des compartiments endosomaux contenant des PRRs.

La reconnaissance de l'antigène par les LBs naïfs a lieu dans les follicules des organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions). Les antigènes de moins de 70kDa atteignent rapidement les LBs folliculaires (Rozenendaal *et al.*, 2009) par diffusion libre. En revanche, les plus gros antigènes, comme les particules virales et les complexes immuns, sont retenus et présentés par les macrophages et les DCs folliculaires. Ces cellules capturent l'antigène et sont capables de le présenter aux LBs via les récepteurs au complément (CD21 et CD35) ou par les récepteurs Fc (Carrasco and Batista, 2007; Junt *et al.*, 2007; Phan *et al.*, 2007). La présentation des antigènes de surface est reconnue par le BCR des LBs, qui formera des clusters et engagera une synapse immunologique avec les cellules présentant les antigènes particulaires (Figure 17) (Batista *et al.*, 2001).

Dans cette synapse, les LBs sécrètent des lysosomes contenant des molécules du CMH II. A ce moment, le LB est polarisé grâce à l'intervention des microtubules. La GTPase cdc42 est requise pour l'exocytose des lysosomes, qui résulte en une acidification de l'espace de la synapse immunologique ce qui facilite la protéolyse et l'internalisation de l'antigène par les LBs (Yuseff *et al.*, 2011). L'antigène est capté par le BCR pour être ensuite internalisé, puis chargé sur les molécules du CMH II (Figure 17).

Le rôle potentiel de l'autophagie dans le trafic du BCR a tout d'abord été décrit par l'équipe de Susan Pierce. Ce travail démontre que le BCR internalisé colocalise avec des structures à morphologie autophagique. Il semble dans ce contexte que l'autophagie ou sa machinerie soit requise pour la translocation de l'antigène vers des compartiments contenant le TLR9 (Chaturvedi *et al.*, 2008). Ireland et collègues, confirment que le BCR après internalisation pourrait être orienté vers des structures de type autophagique de par sa colocalisation avec LC3. De plus ce travail montre un rôle potentiel de l'autophagie pour diriger l'antigène vers des compartiments où ce dernier sera citrulliné. Même si le trafic du BCR et l'autophagie semblent liés, de nombreuses questions restent en suspens quant à sa réelle signification biologique (Ireland and Unanue, 2011).

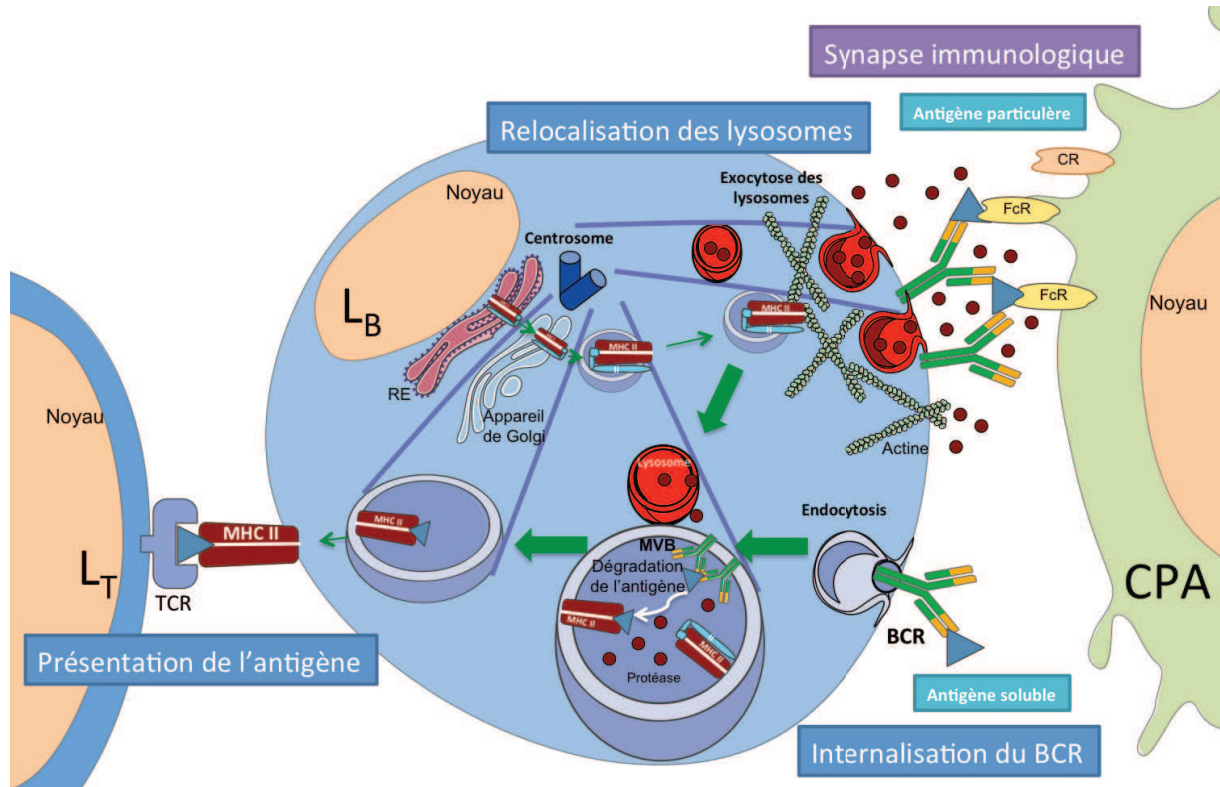


Figure 17 : Présentation de l'antigène par les LB sur les molécules du CMH de classe II

Le LB peut capturer un antigène (Ag) soluble ou particulaire par son BCR. Dans le cas d'un antigène particulaire ou à fort pouvoir agrégeant sur le BCR, le complexe Ag-BCR peut se relocaliser de manière polarisée dans le LB et être internalisé. Les vésicules enrichies en molécules du CMH II sont également polarisées avec le complexe d'internalisation. Il est à noter que le déplacement de ces vésicules nécessite l'action des microtubules. Afin de pouvoir internaliser le complexe Ag-BCR dans le cas des Ag particuliers, les lysosomes sont exocytés au niveau de la zone de contact avec l'Ag, appelée synapse. Leur contenu sera alors relargué au niveau de la synapse, permettant la dégradation de l'Ag particulaire préalablement à son internalisation. Après fusion des vésicules contenant le BCR et l'Ag avec les compartiments contenant les molécules du CMH II, l'Ag peut subir une protéolyse, permettant sa dégradation en peptides. Ceux-ci peuvent alors être présentés par le complexe du CMH II à la surface des cellules B pour une présentation aux LTs CD4⁺.

Ag, Antigène ; CPA, Cellule Présentatrice d'Antigène ; CR, Récepteur au Complément ; MVB, Corps MultiVésiculaires ; L_B, Lymphocyte B ; L_T, Lymphocyte T

L'autophagie, les plasmocytes et les cellules B mémoire.

L'activité autophagique augmente lors de la différenciation plasmocytaire, après activation des LBs, *ex vivo* et *in vivo* (Pengo *et al.*, 2013). La quantité d'ARNm du gène *Atg5* augmente en parallèle pendant la différenciation plasmocytaire. Dans un premier temps, l'utilisation de LB issus de souris transgéniques pour la protéine chimère LC3-GFP a permis de montrer une activité intense en autophagie dans les cellules plasmocytaire à longue durée de vie dans la moelle osseuse. Cette étude a également montré que lors de l'immunisation de souris B6 *Atg5^{f/f}* CD19cre par des antigènes T dépendants ou T indépendants, une diminution de la production des anticorps de sous-classes IgM et IgG était observée.

De manière étonnante, les souris dont les LBs sont délétés pour *Atg5* possèdent un nombre de plasmocytes normal dans la moelle osseuse. Les auteurs ont alors évalué la proportion d'allèles délétés pour *Atg5* par rapport à l'allèle sauvage. Ils ont montré que les plasmocytes présents, possédaient préférentiellement l'allèle sauvage, démontrant ainsi un phénomène de sélection des plasmocytes compétents pour l'autophagie. Les plasmocytes déficients en autophagie sont plus sensible au stress cellulaire, du fait d'une large expansion du RE. Ainsi, les auteurs expliquent que l'autophagie est indispensable au maintien et à la survie des plasmocytes à longue durée de vie. Par la suite, ils montrent que les souris dont les LBs sont déficients en autophagie voient une diminution de la réponse humorale à long terme. Ils constatent en effet une réduction du nombre de plasmocytes de la moelle osseuse sécrétant des anticorps spécifiques, 11 mois après immunisation par des antigènes T-dépendants. L'autophagie étant décrite comme favorisant la présentation antigénique dans certaines circonstances, les auteurs ont cherché à savoir si un défaut dans le dialogue LB-LT pouvait également expliquer la baisse de réponse humorale en absence d'autophagie dans les LBs. Les auteurs se sont alors intéressés à la formation des centres germinatifs (CGs) lors d'une immunisation par un antigène T-dépendant, le NP-CGG. La formation des CGs est essentielle pour la commutation isotypique la maturation d'affinité et la différenciation des LBs en LBs mémoire ou plasmocytes à longue durée de vie. Dans cette étude, les auteurs montrent que l'autophagie n'est pas indispensable pour la formation des CGs, après immunisation par des antigènes solubles (Pengo *et al.*, 2013). Ils en ont conclu que dans leur contexte expérimental, l'autophagie joue un rôle dans la réponse anticorps uniquement via la régulation de la survie des cellules plasmocytaires à courte et à longue durée de vie (Figure 16).

Une étude indépendante exploitant le même modèle murin aboutit aux mêmes conclusions, à savoir une diminution de la production d'anticorps en absence d'autophagie après immunisation par des antigènes modèles mais également lors d'infections parasitaires ou d'une inflammation des muqueuses (Conway *et al.*, 2013). Les auteurs montrent, de plus, l'existence d'un impact négatif de la délétion de l'autophagie dans les LBs pour l'acquisition de facteurs de transcription et de marqueurs spécifiques des plasmocytes suggérant un défaut précoce dans la différenciation plasmocytaire.

L'autophagie peut également influencer une autre voie de différenciation terminale des LBs. Ainsi, Chen et son équipe ont montré tout d'abord que l'autophagie est essentielle pour la survie des LBs mémoire et permet le maintien des anticorps protecteurs requis pour combattre une infection virale (Chen *et al.*, 2014b). Ils ont également montré que l'autophagie n'était pas requise lors de l'initiation de la génération des LBs mémoire mais nécessaire à leur persistance à long terme (Chen *et al.*, 2015).

3.4 L'autophagie et l'auto-immunité

Le SI adaptatif apparu chez les premiers vertébrés permet potentiellement la reconnaissance de tout motif antigénique quelle que soit sa provenance ou sa structure, contrairement au SI inné reposant sur la reconnaissance de motifs moléculaires conservés chez les pathogènes ou de signaux de stress codés par le soi. L'apparition du SI adaptatif est ainsi liée à un risque inhérent d'auto-immunité maîtrisé au niveau de l'organisme par des mécanismes de tolérance dits centraux ou périphériques. Lorsque ces mécanismes sont défectueux, une rupture de tolérance au soi peut apparaître et mener à l'apparition de maladies auto-immunes. La dérégulation de l'autophagie émerge comme une composante possible de l'étiologie des maladies auto-immunes. Dans mon travail de thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés au LED, qui est une maladie auto-immune systémique, c'est à dire non spécifique d'organes (Rahman and Isenberg, 2008). Je détaillerai le contexte plus loin (paragraphe 3.5)

3.4.1 Dérégulation de l'autophagie dans les cellules non-hématopoïétiques

L'autophagie a été décrite comme augmentée dans les fibroblastes de la membrane synoviale chez les patients qui sont atteints d'une polyarthrite rhumatoïde (PR) après leur stimulation par du TNF α en comparaison de fibroblastes sains (Figure 18) (Connor *et al.*, 2012). La PR est une maladie dégénérative inflammatoire auto-immune. Elle est caractérisée par une atteinte au niveau des articulations et par d'autres atteintes systémiques. L'autophagie pourrait participer dans ce cas à la prolongation anormale de la vie de ces cellules dans la synovie inflammée. Une autre étude a montré que l'autophagie était également augmentée dans les ostéoclastes de patients atteints de PR, de manière concomitante à une augmentation de l'expression des protéines autophagiques Beclin1 et ATG7. Dans ce cas, l'activation de l'autophagie est dépendante du TNF α . Grâce à l'utilisation d'un modèle murin de délétion conditionnelle d'*Atg7* spécifiquement dans les ostéoclastes, les auteurs ont observé que ces souris subissent une érosion moindre de l'os lors d'une stimulation par le TNF α (Lin *et al.*, 2013). De ce fait, l'autophagie pourrait jouer un rôle clé dans la régulation de la destruction de l'os dans la PR. On peut donc imaginer qu'un des effets bénéfiques du traitement de ces patients par des anti-TNF α passerait par une diminution de l'autophagie et donc par une moindre dégradation du cartilage.

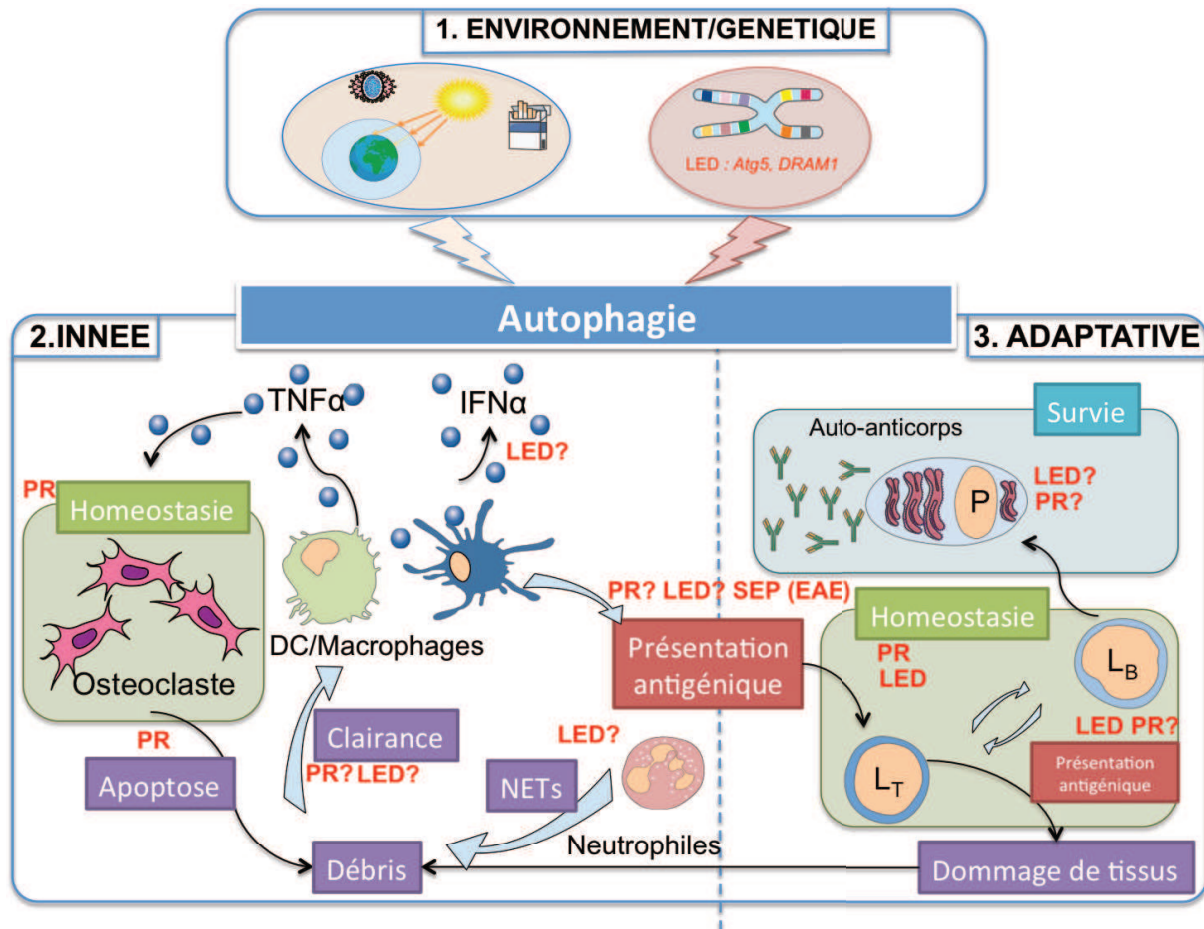


Figure 18 : Implications prouvées et potentielles de l'autophagie dans les maladies auto-immunes

Les facteurs environnementaux et la prédisposition génétique contribuent à la dérégulation de l'autophagie. Ce mécanisme peut réguler la réponse immunitaire innée et adaptative. Dans l'immunité innée, l'autophagie régule la production de cytokines ainsi que l'homéostasie des ostéoclastes. Ce processus contrôle la clairance des débris, en particulier par les macrophages. L'autophagie peut également contrôler la présentation antigénique via les DCs. Dans l'immunité adaptative, l'autophagie est impliquée dans l'homéostasie des lymphocytes T et B, la survie des plasmocytes, et dans la présentation antigénique par les LBs. Les points d'interrogations soulèvent une possible implication du mécanisme indiqué dans certaines maladies auto-immunes, mais encore non démontrée.

DC, Cellule Dendritique ; L_B , Lymphocyte B ; LED, Lupus Erythémateux Disséminé ; L_T , Lymphocyte T ; SEP, Sclérose En Plaque ; P, Plasmocytes ; PR, Polyarthrite Rhumatoïde

3.4.2 Autophagie, auto-immunité et immunité innée

L'autophagie pourrait également contrôler le développement de l'auto-immunité de par son rôle régulateur du SI inné. En effet, les cellules phagocytaires déficientes pour MAP1LC3A, une isoforme de LC3, sont moins efficaces dans la dégradation des corps apoptotiques, de par une compromission d'un mécanisme spécialisé de LAP (Martinez *et al.*, 2011). On peut donc penser que la LAP contribuerait à l'implication des macrophages dans l'élimination des cellules mortes. Ceci est

particulièrement relevant dans l'auto-immunité systémique (comme le LED) où des défauts de clairance des cellules apoptotiques, sources d'auto-antigènes, semblent fortement impliqués dans des pathologies telles que le lupus. De plus, un défaut d'autophagie pourrait participer à une dérégulation de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. Comme évoqué précédemment (paragraphe 3.1.1.4) la machinerie autophagique régule la réponse IFN-I face à la reconnaissance d'acides nucléiques via les PRRs (Liang *et al.*, 2014; Saitoh *et al.*, 2009; Tal *et al.*, 2009). De plus, le rôle de l'autophagie sur la régulation de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires IL-1 α et β pourrait amplifier la sévérité des maladies auto-immunes, telles que, le LED, la PR, la sclérose en plaques et le T1D (Figure 18) (Doria *et al.*, 2012).

3.4.3 Autophagie et tolérance immunitaire

Au regard de l'influence qu'exerce l'autophagie sur les systèmes immunitaires inné et adaptatif, il est très vraisemblable qu'une altération de l'autophagie ait un impact sur le devenir des réponses auto-immunes. L'autophagie est suspectée pour contribuer à la dérégulation du syndrome auto-inflammatoire de la maladie de Crohn. Il est également très probable que l'autophagie joue un rôle central dans l'auto-immunité *stricto sensu*, c'est-à-dire dans des pathologies où des auto-antigènes ont été clairement identifiés (Giancetti *et al.*, 2014; Gros and Muller, 2014; Pierdominici *et al.*, 2012; Zhou and Zhang, 2012). Des arguments étayés expérimentalement semblent lier l'autophagie et l'auto-immunité, à savoir, son rôle dans la régulation de l'inflammation, la régulation de la tolérance centrale et périphérique ainsi que l'homéostasie des cellules immunitaires, particulièrement les lymphocytes.

Comme évoqué précédemment, l'autophagie joue un rôle dans l'acquisition des peptides présentés par les molécules du CMH II au niveau du thymus, et ainsi dans l'éducation des LTs lors des sélections négatives et positives (Kasai *et al.*, 2009; Nedjic *et al.*, 2008). A ce jour, aucun rapport n'a pu être fait entre un défaut de tolérance centrale et une dérégulation de l'autophagie au niveau du thymus. Il est cependant possible qu'une baisse de l'activité autophagique, par exemple au cours de l'âge, puisse affecter « l'éducation » des LTs et favoriser l'apparition progressive d'une auto-immunité ou d'une auto-inflammation.

3.4.4 Autophagie des lymphocytes et auto-immunité

L'autophagie joue un rôle dans le contrôle de la tolérance périphérique via la régulation de la survie et de l'activation des lymphocytes. Il est donc possible qu'une dérégulation de l'autophagie des lymphocytes favorise l'auto-immunité. Dans une étude focalisée dans les LTs, il a été montré que

l'expression d'*ATG5* est augmentée dans les LTs infiltrant les lésions typiques détectées dans la sclérose en plaques (Alirezai *et al.*, 2014). Kovacs *et al.* ont montré que des souris dans lesquelles on induit une EAE, et dont les LTs sont déficients en autophagie, présentent des symptômes atténués de la maladie. Ainsi, une augmentation de l'autophagie des LTs pourrait favoriser la survie des cellules auto-réactives lors de sclérose en plaque mais également d'autres pathologies auto-immunes.

La PR est une maladie auto-immune dans laquelle les LTs participent au désordre de la réponse immunitaire. Il en résulte une inflammation des tissus qui cause des dommages irréversibles. Les LTs impliquées dans la PR ont un métabolisme anormal avec une consommation diminuée de glucose, ce qui baisse la concentration d'ATP, ainsi que de lactate. La phosphofructokinase contrôle le flux glycolytique et contrôle la concentration de fructose dans la cellule. Des expériences ont montré que la phosphofructokinase se situe en amont de l'activation de la machinerie autophagique et permet de la réguler (Yang *et al.*, 2014). Lors de la PR, les LTs ont ainsi une activité autophagique diminuée par rapport aux LTs de sujets sains.

L'augmentation ou la diminution de l'autophagie peut ainsi déréguler l'homéostasie des LTs, respectivement en favorisant leur survie ou en les sensibilisant à l'apoptose.

Dans les LBs, la dérégulation de l'autophagie pourrait aussi être impliquée dans le développement de l'auto-immunité. Si on prend en compte le fait que l'autophagie influence la différenciation plasmocytaire et leur survie, l'autophagie pourrait *in fine* être impliquée dans le maintien de la production d'auto-anticorps.

3.4.5 Autophagie, auto-immunité et présentation antigénique

Un point intéressant à mettre en avant est la contribution de l'autophagie dans la présentation d'auto-antigènes en périphérie. L'autophagie canonique et non-canonique participe à la présentation d'antigènes extracellulaires et cytosoliques (endogènes). Dans ce sens, une étude publiée par l'équipe d'Unanue a pu déterminer que l'autophagie favorise la présentation d'antigènes citrullinés par les DCs, macrophages et LBs (Ireland and Unanue, 2011). Etant donné la fréquence élevée d'anticorps dirigés contre des antigènes citrullinés dans la PR, une contribution de l'autophagie quant à la présentation antigénique dans cette pathologie est très probable. Dans ce contexte, rappelons que la formation de « neutrophile extracellular traps » (NETs) est une source d'antigènes citrullinés (Figure 18) (Khandpur *et al.*, 2013). Cet export de l'ADN nucléaire, contenant des peptides antimicrobiens requiert l'activité autophagique (Remijsen *et al.*, 2011). Ainsi, la machinerie autophagique pourrait contribuer à la libération d'auto-antigènes nucléaires dans l'espace extracellulaire, favorisant l'induction d'une auto-réactivité de type systémique. Une étude rapporte

que la délétion du gène *Atg7* spécifiquement dans les DC diminue le développement de l'EAE chez la souris, grâce à une diminution *in vivo* de l'amorçage de la réponse des LTs (Figure 18). De plus, dans cette étude, l'administration de chloroquine (un inhibiteur de l'autophagie) avant le développement de l'EAE retarde la progression de la maladie. Si cette administration est réalisée après le développement de la maladie, il y a une forte réduction des symptômes de la maladie. Cela suggère que l'autophagie est requise dans les DCs afin d'induire le développement de la pathologie par la présentation d'auto-antigènes (Bhattacharya *et al.*, 2014).

3.5 L'autophagie et le LED

Le LED touche majoritairement les femmes (90%) et se caractérise par la production d'auto-anticorps dirigés contre des composants du soi, en particulier d'origine nucléaire, comme l'ADN, les histones et des éléments constitutifs du spliceosome. Ces auto-anticorps peuvent induire des processus inflammatoires, notamment par formation de complexes immuns, dans de nombreux tissus comme la peau, les reins, les vaisseaux sanguins et le cerveau. Les causes initiales de la rupture de tolérance vis-à-vis du soi dans le LED sont encore mal connues même s'il est suspecté qu'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux sont nécessaires au déclenchement de la pathologie (Figure 18). Les facteurs de prédisposition génétique décrits à ce jour impliquent notamment la dérégulation de voies de signalisation de l'immunité innée et adaptative, des déficits dans l'élimination des cellules apoptotiques et des défauts d'homéostasie lymphocytaires B et T. En association avec ces causes génétiques, certains pathogènes (tels que l'EBV, le parvovirus B19 et le cytomégalovirus) pourraient favoriser le déclenchement de la pathologie. D'autres facteurs environnementaux comme la consommation de tabac ou l'exposition aux rayons ultra-violetts seraient également impliqués, de même que le contexte hormonal des individus.

Plusieurs types cellulaires interviennent dans le développement de la pathologie : des cellules de l'immunité innée telles que les DCs et les macrophages mais également les LBs et LTs constituant l'immunité adaptative (Figure 18) (Galtierotti *et al.*, 2010; Orme and Mohan, 2012).

La première publication démontrant un impact possible de l'autophagie dans le lupus rend compte paradoxalement d'un travail étudiant le rôle pro-autophagique des anticorps obtenus de patients souffrant de TIID avec des neuropathies (Townes *et al.*, 2005). Dans cette même étude, les auteurs ont montré que des auto-anticorps purifiés à partir de sérum de patients atteints d'un LED induit l'autophagie dans une lignée cellulaire de neuroblastome. Quelques années plus tard, une étude de GWAS identifie de nouveaux gènes candidats de susceptibilité au développement du LED. Certains d'entre eux sont des gènes impliqués dans l'autophagie (International Consortium for Systemic Lupus

Erythematosus *et al.*, 2008). Un des SNPs est localisé dans une région intergénique, entre les gènes *ATG5* et *PRDM1* (Figure 18), et est corrélé avec une expression plus forte de *mATG5* (Zhou *et al.*, 2011b). L'association génétique entre *ATG5* et la susceptibilité au lupus sera confirmée plus tard dans d'autres études mais aussi infirmée dans des études indépendantes s'intéressant à d'autres populations de patients (Jarvinen *et al.*, 2012). De manière intéressante, une étude récente montre une forte corrélation entre le SNP de *DRAM1* et une susceptibilité au lupus. Ce gène code pour un activateur de l'autophagie en réponse à un signal de stress génotoxique lié à p53.

Les récepteurs PRRs jouent un rôle important dans la pathologie lupique. En particulier, les complexes immuns formés par les auto-anticorps dirigés contre des complexes contenant des acides nucléiques activent les récepteurs TLR7 et TLR9 des DCs et des LBs, après internalisation via des récepteurs Fc ou du BCR. Cela aboutit à une augmentation de la sécrétion d'IFN α par les DCs et une baisse du seuil d'activation des LBs en réponse à la stimulation du BCR (Gualtierotti *et al.*, 2010). De plus, rappelons ici, qu'il a été montré que des complexes immuns contenant de l'ADN sont relocalisés dans des compartiments TLR9 positifs après leur internalisation par les récepteurs Fc de pDC, et ce de manière dépendante de la machinerie autophagique (Henault *et al.*, 2012). L'IFN α a de multiples effets sur les cellules du SI et joue un rôle notable dans la maladie lupique en participant à la maturation des DC et à l'activation des LTs. En synergie avec l'IL-6, l'IFN α favorise la différenciation des LBs en plasmocytes (Figure 18) (Ronnlom *et al.*, 2011). Toutes ces cellules participent à l'initiation, la progression et au maintien de la maladie lupique et l'autophagie participe à chacun de ces processus.

Il est à noter que les LTs jouent un rôle dans toutes ces étapes. Dans la maladie lupique, les LTs présentent de multiples défauts, notamment l'augmentation de leur état d'activations ou une forte sensibilité à l'apoptose (Fernandez and Perl, 2009; Giovannetti *et al.*, 2008; Konya *et al.*, 2014). L'activation des LTs effecteurs est suspectée dans certaines études comme étant favorisée par la réduction de l'activité des Tregs (Valencia *et al.*, 2007). D'autres travaux décrivent des sécrétions cytokiniques dérégulées des Tregs, caractérisées par une augmentation de la sécrétion d'IL-10 et une diminution de la sécrétion de TGF β et d'IL-2 (Ohl and Tenbrock, 2011).

La dérégulation de l'immunité innée participe également au développement du lupus. Un défaut de clairance des corps apoptotiques par les macrophages est suspecté comme événement favorisant l'auto-réactivité face aux composants nucléaires (Figure 18) (Baumann *et al.*, 2002; Bijl *et al.*, 2006; Gaip *et al.*, 2007). Cela mène à une persistance d'auto-antigène, ce qui peut conduire à une rupture de tolérance et induire une réponse auto-immune (Nagata *et al.*, 2010). De plus, pendant le processus d'apoptose, les protéines nucléaires peuvent subir des modifications post-traductionnelles

et être exportées à la surface cellulaire (Dumortier *et al.*, 2000; Hoffmann *et al.*, 2010; Monneaux *et al.*, 2001). Dans des conditions physiologiques, ces protéines n'induisent pas d'auto-immunité, étant rapidement éliminées par les macrophages. L'équipe de Martin Herrmann a montré, dans un contexte lupique, qu'un grand nombre de corps apoptotiques s'accumulaient dans les centres germinatifs des ganglions (Baumann *et al.*, 2002). Ceux-ci sont présentés comme des antigènes particuliers sur les FDC. Ces cellules sont alors capables de présenter des auto-antigènes aux LBs auto-réactives et ainsi participer à la réponse humorale auto-immune. Dans ce contexte, l'autophagie pourrait participer à ce phénomène pathologique car dans certains contextes, la machinerie autophagique facilite la présentation croisée. Ce phénomène pourrait être néfaste dans un contexte lupique. En effet, dans les modèles de souris développant un lupus, il y a une augmentation de la cross-présentation dans les DC, ce qui augmente considérablement la réponse T CD8+ (Münz, 2010; Peng and Elkon, 2011).

Il a été démontré que l'autophagie régule les programmes de mort cellulaire. Dans un modèle *in vitro* de morphogénèse embryonnaire de mammifère, durant le développement des corps embryonnaires, l'équipe de Beth Levine a montré que deux gènes différents de l'autophagie, *Atg5* et *Becclin1*, sont requis pour la clairance des cellules mortes durant la cavitation (creusement de la morula pour réaliser l'espace nécessaire pour le futur blastocœle). En absence de ces gènes autophagiques, la quantité de cellules mortes de l'ectoderme augmente par rapport aux corps embryonnaires contrôles. Ils font la même observation, *in vivo*, dans des embryons *Atg5*^{-/-}. Les protéines autophagiques participent à la suppression des cellules mortes par la phagocytose durant le programme de mort cellulaire aussi bien *in vitro* que *in vivo*, durant le développement de la souris. *Atg5* et *Becclin1* peuvent de ce fait contribuer à la clairance des cellules apoptotiques. De ce fait, une perte de fonction du gène *Atg5*, pourrait contribuer à la pathologie lupique en favorisant l'accumulation de débris cellulaires et donc d'auto-antigènes potentiels (Qu *et al.*, 2007). Ainsi, une dérégulation de l'autophagie pourrait favoriser le développement du lupus par plusieurs voies, allant de l'inflammation, à la clairance des corps apoptotiques, la présentation antigénique et la régulation de la survie des lymphocytes.

Enfin, plusieurs traitements du lupus utilisés comme l'hydroxychloroquine (Lee *et al.*, 2011), ou en cours d'essai clinique, comme le peptide P140, issus de notre laboratoire, modulent l'activité autophagique. Il est possible qu'une part de leur effet thérapeutique soit due à la modulation de l'autophagie (Gros and Muller, 2014).

Objectifs de la thèse

Au cours de mes travaux de thèse, je me suis intéressé au rôle de l'autophagie dans les réponses immunes humorales normales et pathologiques. Je me suis focalisé sur le rôle intrinsèque de l'autophagie des lymphocytes, ces cellules étant centrales dans l'auto-immunité et l'autophagie étant un acteur primordial dans leur biologie.

La première partie de ce travail (**publication 1**) a permis de montrer que l'autophagie était dérégulée dans les LTs de modèles murins de lupus et de patients atteints de LED. Un article publié par un autre laboratoire a quant à lui décrit une dérégulation de l'autophagie dans les LBs de patients lupiques et de modèles murins. Ainsi, il est possible que la dérégulation de l'autophagie favorise la survie de LTs et LBs autoréactifs au cours du lupus.

La seconde partie de mon travail (**publication 2**) a été de caractériser et de comparer deux nouveaux modèles transgéniques murins de délétion de l'autophagie spécifiquement dans les LBs immatures et matures (respectivement les souris $Atg5^{f/f}$ CD21cre et $Atg5^{f/f}$ Mb1cre). Nous avons montré que l'autophagie ne jouait pas de rôle majeur dans le développement précoce des LBs. Nous avons également pu définir le rôle de l'autophagie des LB périphériques dans le développement d'une réponse immune humorale dans ces souris. A court terme, il apparaît que les sécrétions d'IgG spécifiques de l'antigène soient normales, ce qui suggère que l'autophagie n'est pas impliquée dans la commutation isotypique. Nous avons alors étudié les réponses humorales à plus long terme dans un modèle auto-immun. Des résultats obtenus semblent que la survie des plasmocytes à longue durée de vie soit compromise en absence d'autophagie et ceci tout particulièrement dans un modèle auto-immun chronique de sécrétion d'auto-anticorps.

La littérature suggère que le BCR internalisé peut colocaliser avec des structures de type autophagique et avec la molécule LC3, pouvant s'associer aux autophagosomes. Il était donc possible que dans certaines circonstances, l'autophagie soit impliquée dans les étapes précoces d'activation des LBs.

La troisième partie de ce travail (**publication 3**) a permis d'observer qu'en conditions de stimulation du BCR *in vitro*, la concentration et la polarisation des molécules de BCR internalisées sont caractéristiques des LBs compétents en autophagie. Les LBs issus de souris $Atg5^{f/f}$ CD21 ou Mb1cre internalisent le BCR mais sans polarisation notable. De plus, nous avons pu montrer une

relocalisation des protéines autophagiques ATG16L1 et LC3 suite à l'engagement du BCR dans les LBs compétents pour l'autophagie, ce qui n'est pas le cas pour les LBs déficients en autophagie. Nous avons également noté une plus faible colocalisation des molécules de BCR internalisées avec les molécules du CMH II en absence d'autophagie dans les LBs. De ce fait, nous nous sommes donc intéressés au rôle de l'autophagie dans la présentation antigénique d'antigènes exogènes par les LBs. Aucune différence de présentation antigénique n'a été observée lorsque des antigènes solubles étaient internalisés via le BCR. En revanche, nous avons noté que l'absence d'autophagie dans les LBs compromettrait la présentation d'antigènes exogènes adsorbés, situation expérimentale mimant des antigènes particuliers.

De plus, les lysosomes des LBs délétés en autophagie après stimulation du BCR montrent, comme pour le BCR, une absence de polarisation. Dans un LB exprimant ATG5, le contenu en lysosomes est relargué dans le milieu extracellulaire au niveau de la synapse, permettant une dégradation extracellulaire d'antigènes particuliers de masse plus élevée. Nous émettons donc l'hypothèse selon laquelle la machinerie autophagique contribuerait à la formation de la synapse immunologique et à l'internalisation d'antigènes particuliers par les LBs.

Au vu de ces résultats, il semble ainsi que plusieurs composants de la machinerie autophagique participent au trafic intracellulaire du BCR et à la présentation des antigènes particuliers.

RESULTATS

1 Publication 1

Macroautophagy is deregulated in murine and human lupus T lymphocytes

Frédéric Gros*, Johan Arnold*, Nicolas Page, Marion Décossas, Anne-Sophie Korganow, Thierry Martin and Sylviane Muller, (2012) *Autophagy*.

* These authors contributed equally in this work

1.1 Avant-propos

Comme évoqué dans l'introduction de ce mémoire, les LTs participent à l'initiation, la progression et au maintien de la pathologie lupique. Les LTs jouent un rôle indirect important dans la production d'auto-anticorps par l'aide qu'ils apportent aux LBs. L'autophagie est décrite comme nécessaire au développement précoce des LTs (Arsov *et al.*, 2011; Pua *et al.*, 2007) ainsi qu'à leur survie après stimulation *in vitro*. En effet, les LTs présentent une forte activité apoptotique et une baisse de la prolifération après stimulation par le TCR lorsque l'autophagie est invalidée par une délétion du gène *Atg5*. De plus, les souris déficientes pour la protéine ATG5 spécifiquement dans les LTs à un stade de développement précoce présentent une diminution du nombre de thymocytes et de LTs en périphérie (Pua *et al.*, 2007). Ce défaut de survie est dû, en grande partie, à un rôle important de l'autophagie dans l'élimination des mitochondries non fonctionnelles. En revanche, lors de mon arrivée au laboratoire, peu d'informations étaient connues sur le rôle de l'autophagie dans la maturation et l'activation des LTs *in vivo*. La régulation de l'activité autophagique nous semblait primordiale dans la balance entre activation et mort des LTs. Etant donné les associations trouvées entre des polymorphismes d'*ATG5* et le LED ainsi que l'efficacité de certains traitements pour cette pathologie capable de moduler l'autophagie, nous avons avancé l'idée que l'activité autophagique pouvait être dérégulée au cours du lupus.

Le premier objectif de mon projet de thèse a été d'évaluer l'intensité de l'activité autophagique des LTs dans les tissus lymphoïdes centraux et périphériques au cours du lupus. Pour cela, nous avons purifié des LTs à partir de deux modèles murins (MRL^{*lpr/lpr*} et NZB/W) développant spontanément des symptômes de type lupique, ainsi que des LTs provenant du sang de patients atteints de LED. Le modèle murin MRL^{*lpr/lpr*} se caractérise par une mutation récessive autosomale *lpr* exprimée sur le fond génétique MRL propice au développement d'une auto-immunité. La mutation *lpr* affecte le gène codant pour la protéine FAS, un récepteur membranaire de mort cellulaire. L'expression de FAS est notamment induite au niveau des lymphocytes activés et permet leur délétion par apoptose en

périphérie menant à l'activation de la voie extrinsèque de l'apoptose et particulièrement en phase de contraction de la réponse adaptative. Un défaut de FAS lié à la mutation *lpr*, aboutit à une perte de signalisation de la voie apoptotique, permet la survie des cellules auto-réactives et accélère la pathologie lupique spontanée développée par ces souris. Le modèle murin NZB/W est, quant à lui, obtenu par croisement entre une souris de fond génétique NZBs (New Zealand Black) et une souris de fond génétique NZW (New Zealand White). Toutes deux présentent des *loci* de susceptibilité au développement d'un lupus mais seule la descendance F1 NZB/W développe des symptômes caractéristiques de la pathologie (Rottman and Willis, 2010). Sachant que l'équilibre mort/survie est dérégulé dans la maladie lupique, nous avons émis l'hypothèse que l'autophagie pourrait être dérégulée dans les LTs et jouer un rôle dans la persistance des cellules auto-réactives. Les résultats de ces études sont présentés et discutés dans la **publication 1** (Gros, Arnold *et al.*, 2012)

1.2 Macroautophagy is deregulated in murine and human lupus T lymphocytes

BASIC RESEARCH PAPER

Autophagy 8:7, 1113–1123; July 2012; © 2012 Landes Bioscience

Macroautophagy is deregulated in murine and human lupus T lymphocytes

Frédéric Gros,^{1,2,†,*} Johan Arnold,^{1†} Nicolas Page,¹ Marion Décossas,¹ Anne-Sophie Korganow,^{1,2} Thierry Martin^{1,2} and Sylviane Muller¹

¹CNRS; Immunologie et Chimie Thérapeutiques; Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire; Strasbourg, France; ²Université de Strasbourg; Strasbourg, France

[†]These authors contributed equally in this work.

Keywords: systemic lupus erythematosus, lupus-prone mice, macroautophagy, T lymphocytes

Abbreviations: APC, allophycocyanin; FITC, fluorescein isothiocyanate; LC3, microtubule-associated protein 1 light chain 3; NZB/W, (NZB/NZW)F1; LPS, lipopolysaccharide; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; PBS, phosphate-buffered saline; PE, phycoerythrin; SLE, systemic lupus erythematosus

Macroautophagy was recently shown to regulate both lymphocyte biology and innate immunity. In this study we sought to determine whether a deregulation of autophagy was linked to the development of autoimmunity. Genome-wide association studies have pointed out nucleotide polymorphisms that can be associated with systemic lupus erythematosus, but the potential role of autophagy in the initiation and/or development of this syndrome is still unknown. Here, we provide first clues of macroautophagy deregulation in lupus. By the use of LC3 conversion assays and electron microscopy experiments, we observed that T cells from two distinct lupus-prone mouse models, i.e., MRL^{lpr/lpr} and (NZB/NZW)F1, exhibit high loads of autophagic compartments compared with nonpathologic control CBA/J and BALB/c mice. Unlike normal mice, autophagy increases with age in murine lupus. In vivo lipopolysaccharide stimulation in CBA/J control mice efficiently activates T lymphocytes but fails to upregulate formation of autophagic compartments in these cells. This argues against a deregulation of autophagy in lupus T cells solely resulting from an acute inflammation injury. Autophagic vacuoles quantified by electron microscopy are also found to be significantly more frequent in T cells from lupus patients compared with healthy controls and patients with non-lupus autoimmune diseases. This elevated number of autophagic structures is not distributed homogeneously and appears to be more pronounced in certain T cells. These results suggest that autophagy could regulate the survival of autoreactive T cell during lupus, and could thus lead to design new therapeutic options for lupus.

Introduction

Macroautophagy is a catabolic process characterized by sequestration of cytoplasmic material in double-membrane vacuoles called autophagosomes, that ultimately fuse with lysosomes leading to degradation of their contents.¹ The role of this process was first described in yeast as a promoter of cell survival under nutrient starvation. Autophagy was later shown to play numerous vital roles in higher eukaryotes, notably in the immune system. Thus, autophagy was shown to regulate immune cell homeostasis and activation, induction of central tolerance and finally inflammation processes.²

Autophagy in autoimmune and autoinflammatory disorders is suspected to be a key component of their etiology. Genetic polymorphisms on the gene coding for ATG16L1 was reported with strong association for patients suffering from Crohn disease leading to the identification of autophagy as a critical regulator of inflammation in the gut.^{3,4} In patients suffering from multiple

sclerosis, ATG5 protein upregulation was described in T cells infiltrating inflammatory lesions, yet the precise impact of this expression pattern remains to be defined.⁵ To date, no study investigated the possible involvement of autophagy in systemic lupus erythematosus (SLE). This prototypic systemic autoimmune disease is characterized by abnormal B and T cell activation, multiple organ inflammation, and production of autoantibodies (autoAbs) targeting mainly nuclear components. It was found from genome-wide association studies that two single nucleotide polymorphisms near and in the *Atg5* locus are associated with SLE initiation and/or development.^{6,7} Moreover, drugs modulating autophagy such as hydroxychloroquine,⁸ rapamycin⁹ and the P140 peptide^{10,11} provide beneficial effects on the development of the pathology in lupus-prone mouse models as well as in patients with SLE.¹² To date, little information is available regarding the role of autophagic activity in lymphocytes under infectious or autoimmune events. Inflammation, cytokine environment and chronic antigenic

*Correspondence to: Frédéric Gros; Email: fgros@ibmc-cnrs.unistra.fr
Submitted: 10/20/11; Revised: 04/03/12; Accepted: 04/04/12
<http://dx.doi.org/10.4161/auto.20275>

stimulation characterizing autoimmune pathologies are eager to modulate autophagy in lymphocytes.

Autophagy was shown to be required for activation of T cells and for their survival after stimulation¹³ and differentiation.¹⁴ This survival seems highly related to quality control and turnover of mitochondria as shown with mouse models characterized by T cell-specific deletion of *Atg5* or *Atg7*.^{15,16} Moreover, excess of autophagy that is detrimental to T cell survival under IFN- γ stimulation, is tightly regulated by immunity-related GTPase family M proteins in mice.¹⁷ Finally autophagic flux was shown to degrade procaspases in T cell, thus antagonizing apoptosis.¹⁸ This latter study shows a direct role for autophagy in survival of autoreactive T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. Thus regulation of autophagic activity is integral for T cell to decide between activation and death. Knowing that physiological survival-death equilibrium is deregulated in SLE, where autoreactive T cells are not clonally deleted,¹⁹ we hypothesized that autophagy could play a role in the persistence of autoreactive cells.

This study is the first that aims at describing autophagic activity in lupus T cells. Intensity of autophagy was evaluated in central and peripheral lymphoid organs from two distinct lupus-prone mouse models, namely MRL^{*lpr/lpr*} and (NZB/NZW)F1 (NZB/W) mice. Autophagic activity was also assessed in the human pathology by quantifying autophagic structures in peripheral blood T cells from SLE patients. These results were compared with those obtained in normal mice that received lipopolysaccharide (LPS) to define if autophagy deregulation was a direct consequence of an acute inflammation.

Results

Autophagic flux is increased in thymocytes from lupus-prone mice. In order to evaluate autophagic activity in central T cells, we quantified autophagic compartments on thymus sections obtained from MRL^{*lpr/lpr*} and NZB/W lupus-prone mice. Quantification was performed by transmission electron microscopy (TEM) in cells with lymphocyte morphology (diameter < 10 μ m, high nuclear/cytoplasm ratio) to exclude other cell types, especially thymic epithelial cells known to exhibit high constitutive autophagic activity. An example of autophagic vacuole is depicted in **Figure 1A**. Quantification of autophagic compartments on 50 cell sections failed to reveal any significant difference between lupus mice (8 week-MRL^{*lpr/lpr*} and 12-weeks-NZB/W lupus mice) and CBA/J and BALB/c control mice (**Fig. 1B**). Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) conversion assays were also performed (**Fig. 1C**). No obvious difference in lupus mice vs. controls could be noticed in terms of LC3-II expression in nontreated cells, confirming the results obtained by TEM. However, when thymocytes were treated with inhibitors of lysosomal proteases E64d and pepstatin A, we could observe a significantly higher autophagic flux in MRL^{*lpr/lpr*} and NZB/W mice compared with controls (**Fig. 1D**). These results suggest that autophagic flux is increased in thymocytes from lupus-prone mice.²⁰

Autophagic activity is deregulated in peripheral T cells from lupus-prone mice. As autophagy is shown to be essential for

peripheral T cell homeostasis, we sought to determine whether autophagic activity was deregulated in purified splenic T cells from lupus mice before the appearance of the first symptoms (8–12 week-old MRL^{*lpr/lpr*} mice and 12–20 week-old NZB/W mice). LC3 conversion assays showed high levels of LC3-II expression in nonstimulated conditions (steady-state) for MRL^{*lpr/lpr*} compared with CBA/J mice, with or without lysosomal protease inhibitors (**Fig. 2A and B**). A small increase is also observed for NZB/W mice in comparison to BALB/c mice although statistical significance could not be reached (**Fig. 2C and D**). Comparison of conditions without and with protease inhibitors under phorbol myristate acetate (PMA)/ionomycin stimulation showed LC3-II accumulation in both lupus and control mice reflecting effective autophagic flux in lupus and normal T cells. As LC3-II levels are proportional to the quantity of autophagic membranes, initial quantity of autophagic structures seemed increased in lupus conditions.

To determine if this difference was effectively related to lupus context or solely the consequence of in vivo activation of T cells in an inflammatory environment, we stimulated T cells in vitro with PMA/ionomycin (**Fig. 2A and B**). Both in control and lupus T cells, LC3-II levels increased in the presence of protease inhibitors indicating that in both mice, autophagy was induced after T cell receptor (TCR)-like stimulation. It was also noticed that LC3-II expression was significantly higher in lupus-prone mice compared with controls, both with and without lysosomal protease inhibitors (**Fig. 2C and D**). As accumulation of LC3-II in the presence of E64d and pepstatin A was still observed in lupus conditions, it could be concluded that the elevated LC3-II rates found in these mice are not the consequence of a total autophagic flux blockade. Moreover, LC3-II level rise observed in lupus mice under PMA/Ionomycin stimulation did not result from a higher sensitivity to these compounds because activation of lupus T cells compared with normal mice was at least equivalent as shown by CD69 staining after treatment (**Fig. 2E**). Comparison of MRL^{*lpr/lpr*} or NZB/W mice with three different control mouse strains (C57BL/6, BALB/c and CBA/J) in a single experiment (same immunoblot), confirms that relative levels of LC3-II are effectively raised in lupus conditions (**Fig. S1**).

We then checked if the difference shown in autophagic activity between MRL^{*lpr/lpr*} and control mice was related to the *lpr* mutation. LC3 conversion assays performed in parallel with C57BL/6 and C57BL/6^{*lpr/lpr*} T cells showed no significant difference between both strains even at the highest ages tested for comparison of MRL^{*lpr/lpr*} and CBA/J (**Fig. S2**). We also performed preliminary experiments with the same settings, using B lymphocytes isolated from spleens collected from control and lupus mice (**Fig. S3**). In contrast to T cells, no difference of autophagic activity between normal and lupus conditions was observed in peripheral B cells.

To understand if high levels of LC3-II measured in lupus-prone conditions reflected high numbers of autophagosomal structures, we performed TEM experiments on isolated T cells that were fixed just after isolation. Representative autophagic compartments in T cells sorted from spleens of MRL^{*lpr/lpr*} and NZB/W mice are shown in **Figure 3A**. Quantification of

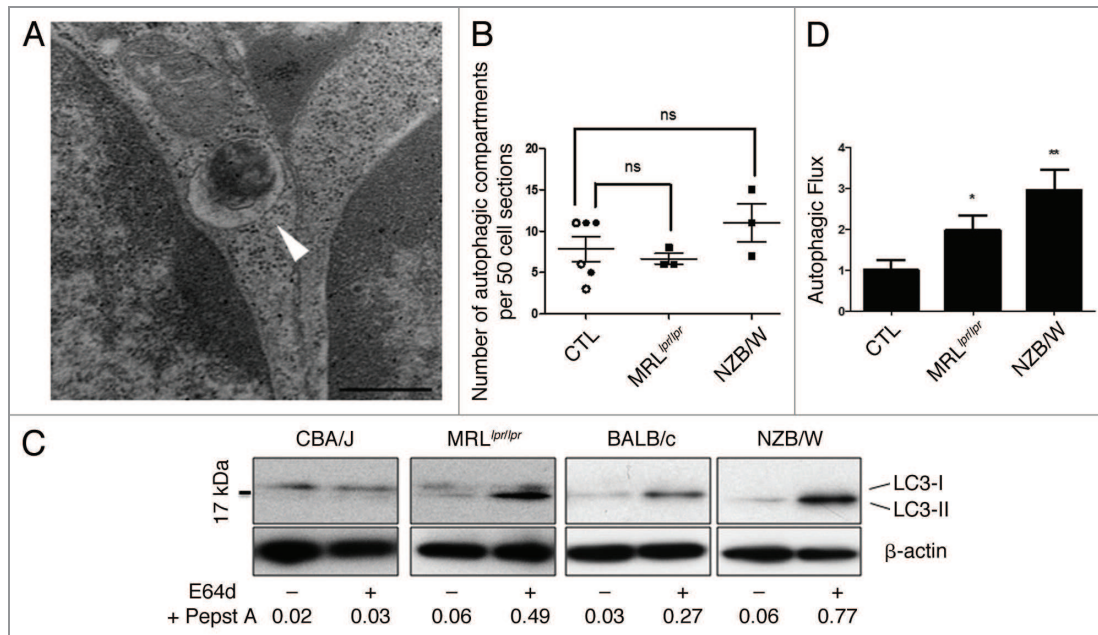


Figure 1. Increased autophagic flux in thymocytes from lupus-prone mice compared with controls (A) A representative autophagosome is indicated by the white arrow (black scale bar: 500 nm). (B) Quantification by TEM of autophagic vacuoles for 50 thymocyte sections randomly selected on thymus sections from 8 week-old CBA/J (open circles) and 12 week-old BALB/c (filled circles) control mice (CTL) and lupus-prone mice MRL^{lpr/lpr} (8 week-old) and NZB/W (12 week-old). Each point represents measurement for an individual mouse. Central bars refer to the mean and vertical bars stand for standard deviation. ns = non-significant using unpaired t-test. (C) LC3 conversion assessed by western immunoblotting. Dissociated thymocytes obtained from 8 week-old control CBA/J and lupus MRL^{lpr/lpr} mice or from 12 week-old control BALB/c and lupus NZB/W mice were cultured at 37°C for 16h. When indicated, cells were treated (+) or not (-) during the last 4 h of the culture with 5 µg/mL pepstatin A and 5 µg/mL E64d to block lysosomal degradation. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE, transferred onto PVDF membranes before staining with anti-LC3 Ab. Loading controls were performed by staining actin β-chain. Each immunoblot is representative of three experiments with identical results. LC3-II/β-actin band intensity ratios are indicated as numbers under each immunoblot. (D) LC3-II levels were evaluated by densitometry and normalized to β-actin band intensities for at least three other independent experiments (right panel). Autophagic flux measurement consists on a ratio between the values with and without protease inhibitors (= autophagic flux). Histogram bars represent the means of individual experiments with standard errors. *p < 0.05 and **p < 0.01 using unpaired t-test between control and lupus conditions.

autophagic compartments in 50 cell sections revealed a number of autophagic vacuoles that was higher in the oldest MRL^{lpr/lpr} lupus mice tested (i.e., 10 to 12 weeks) compared with pooled controls (CBA/J and BALB/c mice at various ages, Fig. 3B). In contrast, NZB/W mice did not exhibit a significant increase in comparison to pooled controls. These results are reminiscent of LC3 conversion assays showing that differences in autophagic compartment load was mainly observed in NZB/W mice compared with controls under PMA/Ionomycin stimulations. It should be noticed that a strict comparison between T cells from 19–22 week-old NZB/W and control mice with corresponding ages, showed that the number of autophagic compartments was significantly higher in NZB/W mice (Fig. S4).

Additional LC3 conversion assays were performed to assess whether autophagic activity deregulation progressively takes place with the age of the mice (Fig. 4A and B). LC3-II detection visualized in the presence or absence of pepstatin A and E64d, effectively increases with age in lupus-prone mice, both at steady-state and under PMA/ionomycin stimulation (as quantified for

corresponding blots in Fig. 4C and D). In contrast, LC3-II conversion does not evolve with age in control mice and was even found to decrease in the oldest mice. LC3-II accumulation observed in MRL^{lpr/lpr} mice was not found in C57BL/6^{lpr/lpr} mice, even at higher ages (Fig. S2) revealing again that the *lpr* mutation per se is not responsible for autophagic deregulation found in MRL^{lpr/lpr} mice. To understand if LC3-II accumulation was due to a decrease in lysosomal activity, we performed p62/SQSTM1 staining by immunoblots (Fig. S1). These results show that accumulation of p62 is observed in lupus-prone mice at ages where LC3-II levels are significantly higher in comparison to control mice (12 weeks for MRL^{lpr/lpr} and 17 weeks for NZB/W). We can then rule out a total autophagic flux blockade as the only cause of LC3-II accumulation in lupus mice. Moreover, compared with control mice, LC3-II level increase in lupus mice is not related to higher LC3-encoding mRNA levels, as shown by *Map1lc3a* mRNA semi-quantified by RT-PCR (Fig. S5).

Autophagic activity is deregulated in peripheral T cells from SLE patients. Although pathologies developed by MRL^{lpr/lpr} and

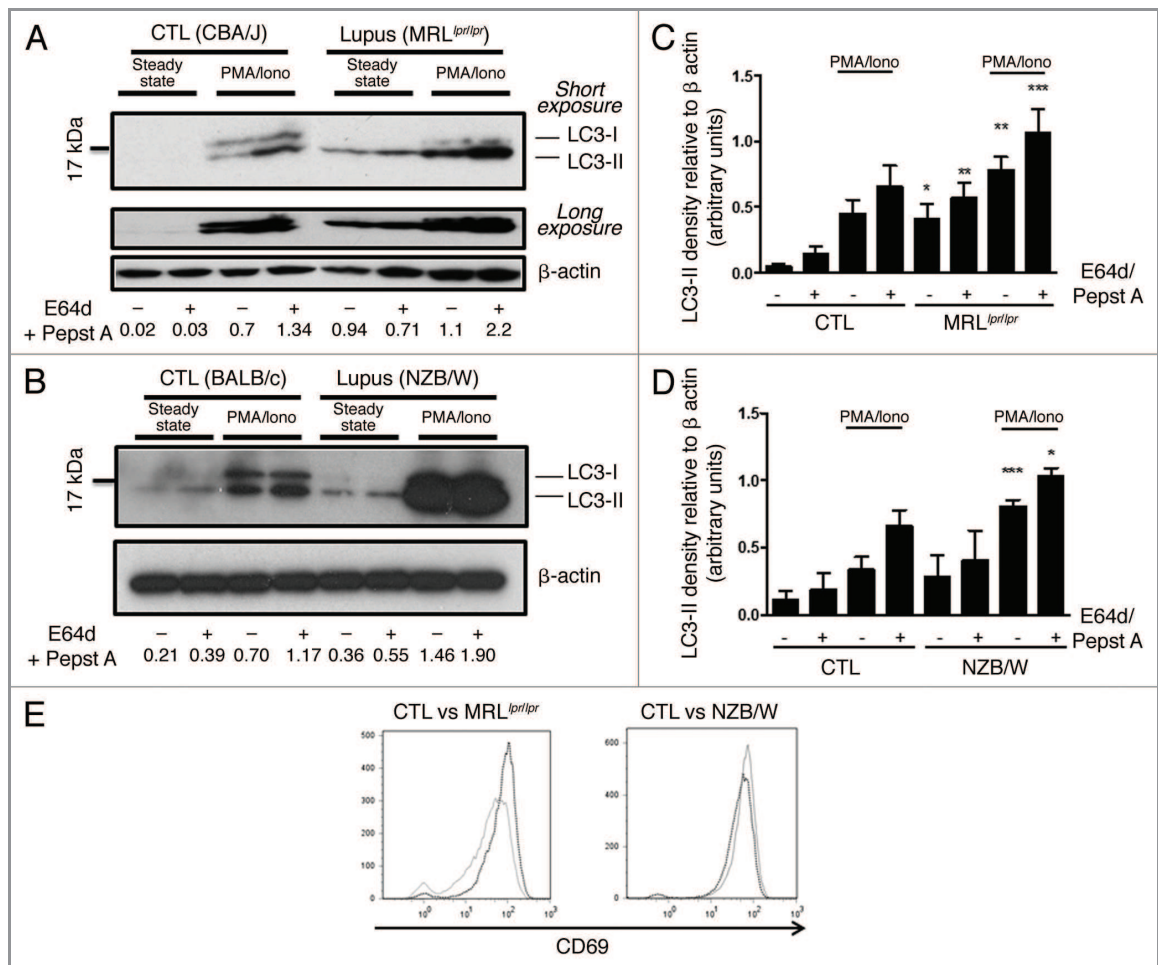


Figure 2. Autophagic activity in peripheral T cells from lupus-prone mice is raised compared with controls T cells sorted from spleens obtained from 8–12 week-old control CBA/J and lupus MRL *lpr/lpr* mice (A) or from 12–20 week-old control BALB/c and lupus NZB/W mice (B) were left unstimulated (steady-state) or stimulated by 50 ng/mL PMA and 1 μ M Ionomycin (PMA/Iono) at 37°C for 16h. When indicated, cells were treated (+) or not (-) during the last 4 h of the culture with 5 μ g/mL pepstatin A and 5 μ g/mL E64d to block lysosomal degradation. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE, transferred onto PVDF membranes before staining with anti-LC3 Ab. Loading controls were performed by staining actin- β chain. Each immunoblot is representative of at least five independent experiments with identical results. *Band corresponding to the Ig heavy chain retained in lysates obtained from oldest lupus mice. LC3-II/ β -actin band intensity ratios are indicated as numbers under each immunoblot. (C and D) LC3-II levels were evaluated by densitometry and normalized to β -actin band intensities for at least five independent experiments. Histogram bars represent the means of individual experiments with standard errors. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ using paired t-test between control and lupus conditions. Activation of sorted T cells from control and lupus mice was assessed by flow cytometry with CD69 staining (E). Dotted black lines and solid gray lines represent respectively control and lupus mice.

NZB/W mice display important similarities with human pathology, these models do not exhibit any quiescent phase and cannot fully compare with the clinical evolution of SLE. We thus decided to investigate if the deregulation of autophagy observed in lupus mice was also found in the human pathology. Lupus patients chosen for the study were mostly quiescent with nine patients out of 11 showing a SLEDAI ≤ 6 , and 2 patients with higher SLEDAI (12 and 14, respectively) (Table 1). Autophagic vacuoles were counted in T lymphocytes isolated from the peripheral blood of healthy volunteers and SLE patients. One

representative cell containing several autophagic compartments is shown in Figure 5A. The number of autophagic vacuoles was significantly higher in T cells from SLE patients compared with healthy volunteers ($p = 0.0032$, Fig. 5B). Moreover, autophagic activity does not seem to be related to disease activity. Of note, patient #7 (Table 1, 14 autophagic vacuoles for 50 lymphocyte sections, SLEDAI = 4) belongs to the same family (daughter) than two controls (father and mother) exhibiting 2 and 3 autophagic vacuoles per 50 T lymphocytes. This suggests that accumulation of autophagic compartments may be correlated with the

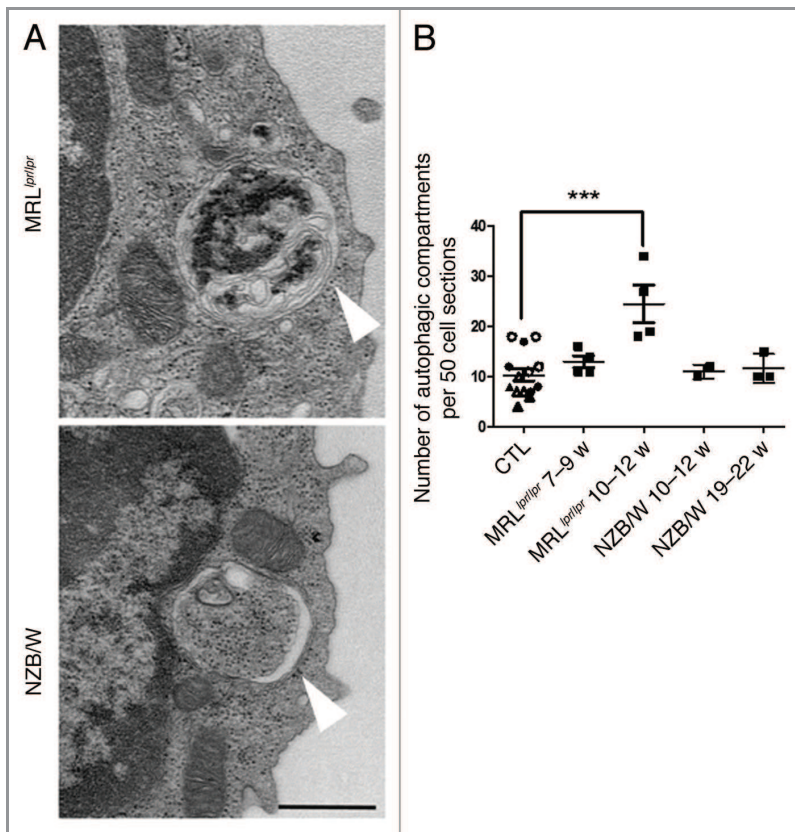


Figure 3. Increased number of autophagic vacuoles in peripheral T cells isolated from lupus mice compared with control mice. (A) Representative autophagic vacuoles indicated by white arrows, in peripheral T cells from lupus MRL^{lpr/lpr} and NZB/W mice. Scale bar stands for both images (black scale bar: 500 nm). (B) Quantification by TEM of autophagosomes counted in 50 peripheral T lymphocyte sections sorted from spleens of control (7–8 week-old CBA/J mice (open circles), 10–12 week-old CBA/J mice (filled circles), 10–12 week-old BALB/c mice (open triangles) and 20–22 week-old BALB/c mice (filled triangles), MRL^{lpr/lpr} and NZB/W lupus mice. Mice were sacrificed at the indicated ages. Each point represents measurement of an individual mouse. Central bars refer to the mean and vertical bars stand for standard deviation. ***p < 0.001 using unpaired t-test, w = week.

development of the pathology and is not a common feature of a familial genetic background. We also tested three patients suffering from inflammatory pathologies unrelated to SLE (2 with vasculitis, 1 with primary Sjögren’s syndrome). None of these patients showed autophagic vacuole number as high as found in several SLE patients. Highly vacuolated autophagic T cells were found in lupus patients, a feature that was not visible in controls ($p = 0.0086$, Fig. 5C). These results led us to conclude that autophagic deregulation observed in lupus-prone mice is also found in T cells from SLE patients.

The increased number of autophagosomes in peripheral lupus T cells is not an immediate consequence of inflammatory event. Inflammatory conditions are known to stimulate autophagy in several cell types through pattern recognition receptor stimulation or in the presence of particular cytokines such as IFN γ . We then sought to determine if an *in vivo* stimulation by LPS of CBA/J control mice, known to generate a systemic inflammation, was sufficient to induce the accumulation of autophagosomes as the one observed in lupus T cells. We first checked the level of B and T lymphocyte activation in LPS-treated mice by measuring respectively CD86 and CD69 expression by flow cytometry (Fig. 6A). Twenty-four hours after *i.p.* injection of 50 μ g LPS, we noticed remarkable activation of splenic B and T cells. B cells are known to be directly stimulated by LPS through toll-like receptor 4 (TLR4) engagement. Moreover TLR4 is known to trigger

is not sufficient to lead to the accumulation of autophagic compartments observed in lupus-prone mice.

Discussion

This work showed for the first time a clear deregulation of autophagic activity in T cells from two lupus-prone mouse models of distinct haplotypes. Autophagic flux was affected in thymocytes isolated from these two murine strains. Compared with normal mice, a significant accumulation of autophagic vacuoles was observed in peripheral lupus T cells. Interestingly, this higher number of autophagic vacuoles was not detectable in T cells from the thymus, which is involved in central tolerance. These results are in good agreement with previous work indicating that autophagy is more crucial in peripheral T cells homeostasis than during earlier immature stages of T cell development.¹⁶ The origin of this phenotype is not known and it would be important to define if the accumulation of autophagic compartments observed in lupus T cells is due to disequilibrium between autophagosome formation and capacity of lysosomal degradation. It is nevertheless possible to conclude that total flux blockade is not the initial consequence of such autophagosome accumulation according to the increase in p62 level in lupus mice under inhibition of lysosomal proteolytic activity. Higher levels of LC3-II in lupus mice do not seem either to be related to *de novo* transcription of

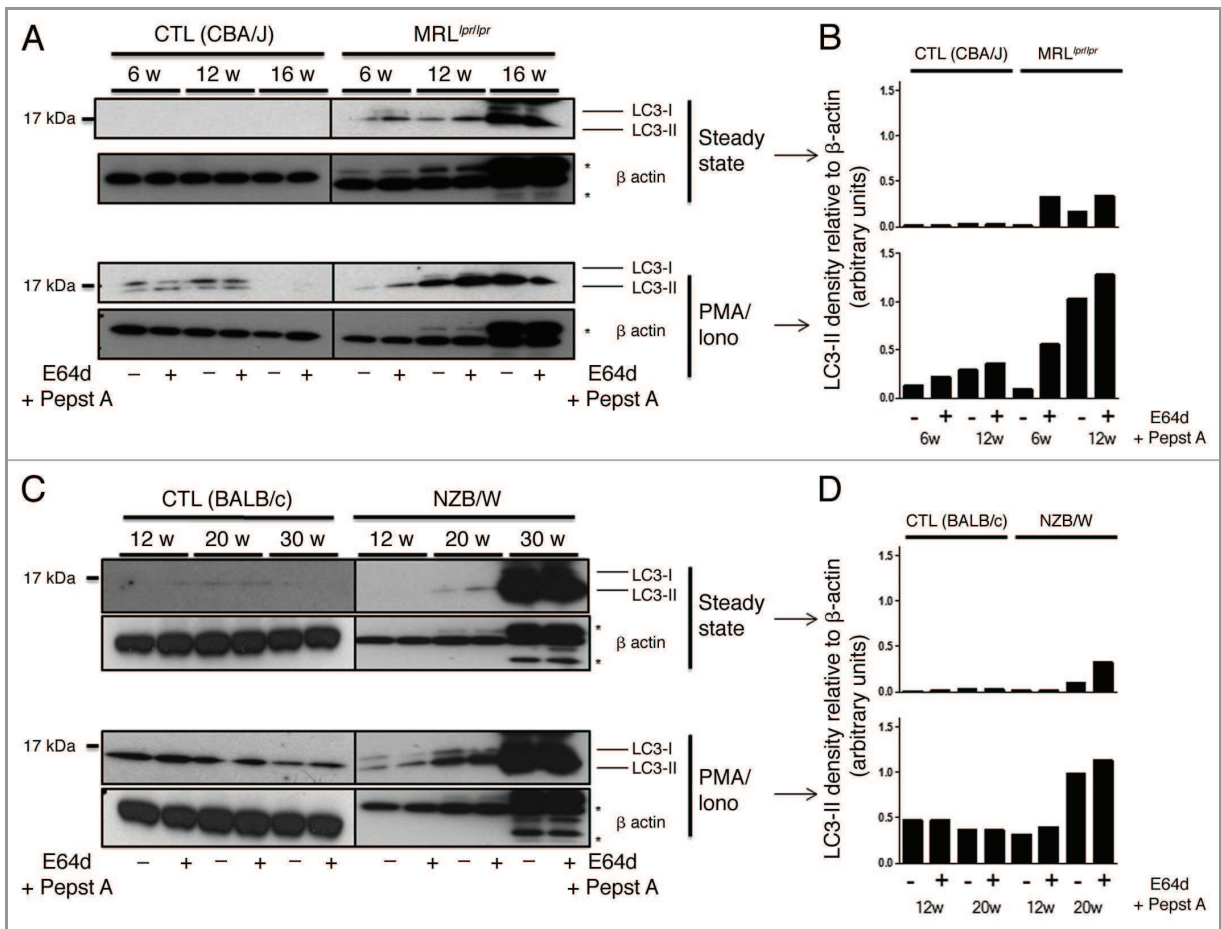


Figure 4. Autophagic activity in peripheral T cells increases with age in lupus-prone mice in contrast to control mice. T cells were sorted from spleens obtained from control (CBA/J) and lupus MRL *lpr/lpr* mice (A) or control (BALB/c) and lupus NZB/W mice (C) that were sacrificed at the indicated ages indicated in weeks. Cells were left unstimulated (steady-state) or stimulated with 50 ng/mL PMA and 1 μ M Ionomycin (PMA/Iono) at 37°C for 16 h. When indicated, cells were treated (+) or not (-) during the last 4 h of culture with 5 μ g/mL pepstatin A and 5 μ g/mL E64d to block lysosomal degradation. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE, transferred onto PVDF membranes before staining with anti-LC3 Ab. Loading controls were performed by staining actin- β chain. Each immunoblot is representative of three experiments with identical results. *Bands corresponding to Ig heavy and light chains retained in lysates obtained from oldest lupus mice. (B and D) LC3-II levels of immunoblots shown in (A and C) were evaluated by densitometry for the indicated ages and normalized to β -actin band intensities.

Map1lc3 genes, at least of one isoform. The precise nature of the stimulus leading to increased autophagic activity in lupus conditions is thus not defined. From PMA/Ionomycin stimulation experiments showing that, in lupus mice, autophagic activity is higher under stimulation than in control mice, we can conclude that TCR signaling pathways that are known to be abnormal in lupus,²³ could be involved in this “hyperautophagic” phenotype.

Stimulations by innate immune receptors, like TLRs,²⁴ or by cytokines, like IFN γ ¹⁷, are known to induce autophagy in different cell types. In vivo LPS injection experiments suggest that TLR4 stimulation induces autophagy in nonlupus B cells. We found further that the increased number of autophagic vacuoles in lupus T cells is not just the consequence of an in vivo

inflammatory stimulus and certainly requires a particular genetic environment to occur. It remains to be defined if other inflammation stimuli than LPS can induce autophagy in T cells and more importantly if a chronicity of inflammatory events could be responsible for the increased autophagosomal load in lupus T cells.

Interestingly, the increased autophagic vacuole number in lupus T cells is not a feature that is restricted to mouse models. We show that some patients suffering from SLE also exhibit a high number of autophagic compartments in peripheral T cells. Despite the strong heterogeneity in the etiology and symptoms of lupus pathology, we identified several patients with an autophagosomal load that is much higher compared with controls. An important consideration is that most patients included in this

Table 1. Description of female patients suffering from SLE included in the study

Patients	Age	SLEDAI	Treatment	Number of autophagic vacuoles counted for 50 T cells
1	41	5	mycophenolate mofetyl	14
2	33	4	mycophenolate mofetyl, prednisone	30
3	27	2	prednisone, mycophenolate mofetyl	1
4	52	14	hydroxychloroquine, mycophenolate mofetyl, prednisone	5
5	30	4	hydroxychloroquine, AVK, prednisone	10
6	33	0	none	21
7	30	4	prednisone	14
8	33	2	hydroxychloroquine, AVK	18
9	44	4	mycophenolate mofetyl	12
10	21	6	hydroxychloroquine, azathioprine, prednisone	16
11	16	12	mycophenolate mofetyl, prednisone	36

SLEDAI (systemic lupus erythematosus disease activity index) score, age and treatments for the patients studied. The number of autophagic vacuoles in T cells isolated from peripheral blood of these patients is also indicated. AVK = anti-vitamin K.

study were quiescent. The number of samples studied is certainly insufficient to establish correlations between the autophagic compartment number, the nature of the symptoms and treatment. Nevertheless, we can argue that autophagic vacuole accumulation is not only a secondary effect of hydroxychloroquine (Plaquenil) treatment routinely used for SLE treatment, and known to block autophagic flux, since highly vacuolated cells were also found in cells collected from patients treated with other drugs (Table 1). It would be important to define if the increased autophagosome number observed in lupus T cells is a general feature of autoinflammatory and autoimmune diseases. Our results show that T cells from two patients suffering from vasculitis and one patient suffering from Sjögren’s syndrome do not exhibit a number of autophagic compartments as high as the ones found in lupus patients.

The precise impacts of autophagy deregulation on T cell fate and the overall progression of the pathology also have to be investigated. Autophagy can exert both pro- and antisurvival effects on T cells. It could be a survival mechanism allowing autoreactive cells to persist as recently shown in experimental autoimmune encephalomyelitis model.¹⁸ Interestingly, we found that cells with high numbers of autophagic vacuoles (more than three per cell section) are more frequent in some SLE patients than in healthy donors. It is tempting to speculate that these cells are autoreactive cells and that autophagy promotes their survival and contributes to their persistence in autoimmune conditions. In certain settings e.g., during apoptosis blockade²⁵ or viral infections,²⁶ autophagy can also lead to a “nonclassical” cell death that do not only rely on caspase activation.²⁷ The impact of this kind of cell death on immune response is not fully understood and could be relevant in lupus pathology where dead cells constitute a source of antigens and proinflammatory molecules. At this stage in vivo models deficient for autophagy in lupus development are necessary to determine how autophagy contributes to lupus disease. An important question will be to determine if certain autophagy-related genes or upstream

regulators of the autophagy pathway are involved in the lupus disease in mice and patients.

An important aspect will also be to identify which T and B lymphocyte subsets are affected. Our first results do not show any significant deregulation of autophagy in the total B cell population. It is possible that only some B cell subtypes in secondary lymphoid organs or in other tissues exhibit deregulated autophagy. Additional studies must be done using sorted B cells, and especially B-1a cells, which are known to play an important role in lupus development. B-1a cells seem to be particularly dependent on autophagy for their survival compared with B-2 conventional B cells.²⁸ Moreover, autophagy in B cells could contribute to the systemic autoimmune disease by providing MHC-II molecules loaded with self-peptides from endogenous origin or by favoring BCR/TLR9 cosignaling as suggested by Chaturvedi et al.²⁹ In this context it is interesting to remind that hydroxychloroquine as well as P140 peptide are both able to modulate autophagic flux and affect peptide presentation by MHC-II molecules.^{11,30} These findings could lead to new therapeutic options, or to the improvement of existing ones, aiming at targeting more specifically pathogenic lymphocytes, avoiding a global inhibition of immune system that is harmful to SLE patients.

Patients, Materials and Methods

Patients and normal donors. Peripheral blood T cells were obtained from 11 female patients with SLE (mean age = 32, range 16 to 52), two male patients with vasculitis, one female patient with primary Sjögren’s syndrome and eight healthy donors (4 men, 4 women, mean age = 31, range 18 to 45). Autoimmune patients fulfilled the American College of Rheumatology criteria for their respective diseases. They were recruited from the Strasbourg University Hospital after informed consent was obtained. Clinical parameters and ongoing treatments of SLE patients at the time of sampling are listed in Table 1.

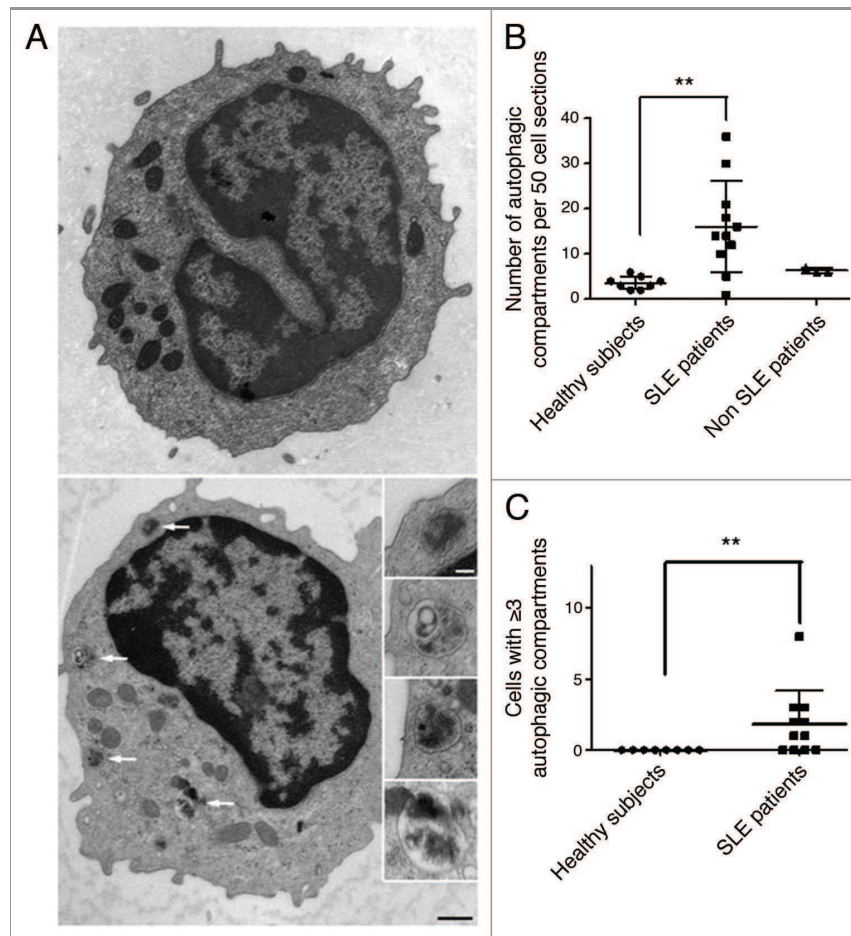


Figure 5. Increased number of autophagic vacuoles in peripheral T cells from SLE patients compared with healthy subjects (A) An example of a cell with a high number of autophagic vacuoles (black scale bar: 500 nm). Magnifications of identified autophagic structures are shown on the right side. The white scale bar (100 nm) stands for all the magnified images (B) Double-blind quantification of autophagic vacuoles in peripheral T cells isolated from the PBMC fraction obtained from healthy donors, patients with SLE or with other autoimmune diseases (Sjögren's syndrome and vasculitis). Autophagic vacuoles were counted in 50 T lymphocyte sections. (C) Cell sections containing three or more autophagic vacuoles were counted for each subject. Each point represents the result for one subject. Central bars refer to the means and vertical bars stand for standard deviation. **p < 0.01 using unpaired t-test (in B) or Mann-Whitney U test.

Mice. MRL^{lpr/lpr}, NZB/W, BALB/c, CBA/J, C57BL/6 and C57BL/6^{lpr/lpr} mice were purchased from Harlan. All mice were bred and maintained in accordance with guidelines of the local Institutional Animal Care and Use Committee (CREMEAS).

Flow cytometry. All Abs used for flow cytometry analyses were purchased from BD Biosciences: fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled anti-mouse TCR-β (clone H57-597, 553171), phycoerythrin (PE)-labeled anti-mouse CD69 (clone H1.2F3, ref. 553237), allophycocyanin (APC)-labeled anti-mouse B220 (clone R13-6B2, 553092), FITC-labeled anti-human CD3ε (clone UCHT1, 55916) and APC-labeled anti-human CD19 (clone HIB19, 555415). Cells were incubated with fluorochrome-conjugated antibodies and in the case of mouse cell staining, rat anti-mouse CD16/CD32 monoclonal Ab (mAb, clone 2.4G2,

553142) was used to block Fcγ receptors, for 30 min at 4°C in phosphate-buffered saline (PBS) pH = 7.4 containing 2% (v/v) fetal calf serum (FCS). Data were collected on a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter) and analyzed using FlowJo software (Tree Star).

Cell culture and isolation. Thymocytes and splenic T cells were collected from MRL^{lpr/lpr}, CBA/J, C57BL/6, C57BL/6^{lpr/lpr}, NZB/W and BALB/c mice and immediately cultured at 37°C, 5% CO₂ in RPMI 1640 medium (Lonza BioWhittaker) supplemented with 10% FCS, 10 μg/mL gentamycin (Lonza BioWhittaker), 10 mM HEPES (Lonza BioWhittaker) and 0.05 mM β-mercaptoethanol (Lonza BioWhittaker) at a concentration of 5 × 10⁶ cellules/mL. Splenic T cells were purified by negative selection. Briefly, spleen cell suspensions

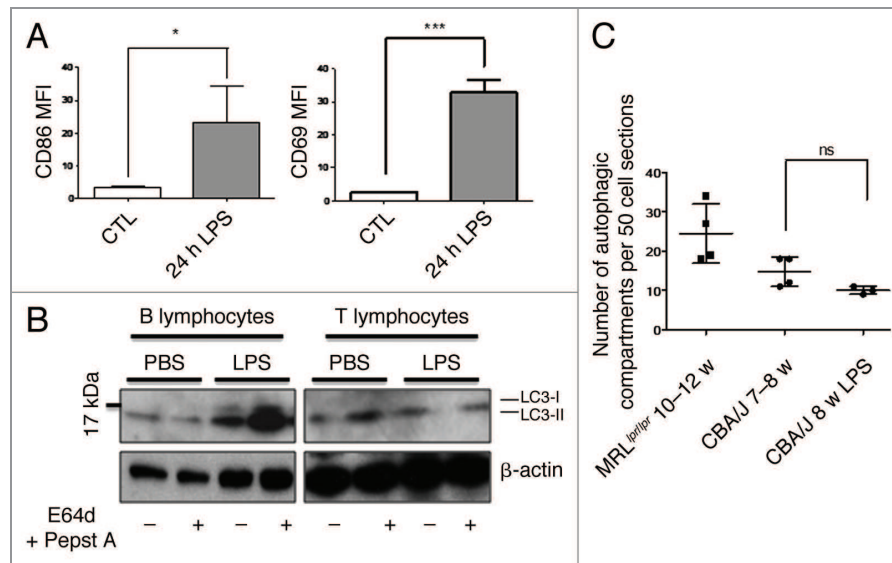


Figure 6. No autophagic compartment accumulation in normal T cells during acute systemic inflammation induced by LPS. (A) CBA/J mice (8 week-old) were injected i.p. with 50 μ g LPS or with PBS (Control). B cell (TCR- β /B220⁺) and T cell (TCR- β +/B220⁻) activation was checked by measuring CD86 and CD69 expression respectively (represented as mean fluorescence intensity, MFI) in treated (24h LPS) and nontreated mice (control). * $p < 0.05$ by paired t-test and *** $p < 0.005$ by paired t-test. (B) LC3 conversion was assessed for splenic B or T cells isolated 24 h after injection of PBS alone or LPS, and left in cultured at 37°C for 4 h with (+) or without (-) lysosomal proteases inhibitors E64d and pepstatin A (5 μ g/mL). Each immunoblot is representative of three experiments with identical results. (C) Quantification by TEM of autophagic vacuoles in peripheral T cells from either 10–12 week-old MRL^{lpr/lpr} lupus mice, control 7–8 week-old CBA/J mice, or LPS-treated mice (CBA/J, 8 week-old LPS). Autophagic vacuoles were counted in 50 peripheral T lymphocyte sections. Each point represents measurement for an individual mouse. Central bars refer to the means and vertical bars stand for standard deviation. ns = nonsignificant using unpaired t-test.

were depleted from monocytes, granulocytes, B cells and NK cells using Dynal T cell Negative Isolation Kit (Dynal-Life Technologies, 114-13D) according to the manufacturer's instructions. CD3⁺CD4⁺CD8⁻ double-negative T cells that are frequent in MRL^{lpr/lpr} mice, were discarded by anti-B220 Abs included in the commercial preparation. Human peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were isolated on a Ficoll (PAA, J15-004) density gradient and T cells were then sorted by using the Pan T cell isolation Kit II, human (Miltenyi Biotech, 130-091-156). Resulting TCR- β ⁺/B220⁻ mouse T cell and CD3 ϵ ⁺/CD19⁻ human T cell preparations were > 90% pure as determined by flow cytometry. Mouse B cells were isolated using Dynal magnetic beads coupled with Abs to rat immunoglobulins (Ig) after incubating splenocyte suspension with the following rat Abs (BD Biosciences): anti-CD11b (clone M1/70, 553308), anti-Gr1 (clone RB6-8C5, 550291), anti-CD49b (clone DX5, 553855) and anti-TCR β (clone H57-597, 553167). Preparations were > 90% pure according to TCR- β /B220 staining.

In vivo LPS injections. CBA/J mice received 50 μ g LPS (Sigma Aldrich, L2630) in PBS or PBS alone intraperitoneally (i.p.). Twenty-four hours later, spleens were harvested and splenocytes were gently dissociated. Activation of lymphocytes was assessed by flow cytometry with CD69 staining for T cells and CD86 staining for B cells. Purified B and T cells were sorted and cultured as described above. Autophagic flux was measured as described below by LC3 staining on western immunoblots.

Western immunoblotting. The Abs used for western immunoblotting were specific for β -actin (Santa Cruz Biotechnology, clone C4, sc-47778), LC3 (MBL, clone 51-11, ref M115-3) and p62/SQSTM1 (rabbit polyclonal antibody, Sigma-Aldrich, P0068). In some experiments, lysosomal protease inhibitors E64d and pepstatin A (Sigma-Aldrich, P5318 and E8640) were added at 5 μ g/mL each. When indicated, cells were treated with 50 ng/mL PMA (Sigma-Aldrich, P8139) and 1 μ M ionomycin (Sigma-Aldrich, I0634). To evaluate the autophagosomal membrane load and monitor autophagic flux, whole cell proteins were extracted from cultured cells using Laemmli buffer (TRIS-HCl 125 mM pH 6.8; 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS); 10% (v/v) glycerol; 5% (v/v) β -mercaptoethanol). Cell lysates were separated on 8–16% Novex Tris-glycine SDS-PAGE gradient gels (Life Technologies, EC6078BOX) and then transferred onto a polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane. Membranes were blocked with PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (PBS-T) and 3% (w/v) non-fat dry milk for 1h and then incubated overnight at 4°C with 1 μ g/mL anti-LC3 Ab in PBS-T containing 1% nonfat dry milk. After washing with PBS-T, membranes were incubated for 30 min at room temperature with horseradish peroxidase-conjugated goat anti-mouse IgG antibody (Southern Biotech, 1030-05). Signal was detected using enhanced chemiluminescence detection reagents (Immobilon Western Millipore, WBKLS0500). When indicated, LC3-II levels were normalized by densitometry to β -actin level using ImageJ Software.

Autophagic flux was quantified by calculating a ratio between these values obtained with and without protease inhibitors.

Real-time PCR (RT-PCR). Total RNA was isolated from 5×10^6 purified T cells using RNeasy Mini Kit (Qiagen, 74103) according to the manufacturer's instructions. After treatment by DNase (Qiagen, 79254) to remove residual genomic DNA, mRNA was retro-transcribed with Improm-II reverse transcriptase (Promega, A3800). Twenty nanograms of cDNA was used for real-time PCR on StepOne apparatus (Applied Biosystems). Briefly, LC3 *Map1lc3a*, *Actb* and *Hprt* (respectively encoding for LC3, β -actin and HPRT1) cDNA were amplified using Taqman Gene Expression Assays provided by Applied Biosystems (Mm01249999-g1, Mm01249999-g1, Mm00458724_m1). Amplicons and probes were designed to span two exons, limiting the risk of amplifying residual genomic DNA. Relative *Map1lc3a* mRNA quantifications were made by defining $\Delta C_T = C_T \beta\text{-actin} - C_T \text{LC3}$ and $C_T \text{hprt1} - C_T \text{LC3}$ where C_T is "Cycle Threshold" and $\Delta\Delta C_T (\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{sample} - \Delta C_T \text{of one control mouse per plate})$ using StepOne software (Applied Biosystems). Results shown represent $2^{-\Delta\Delta C_T}$ values where one control mouse per plate is arbitrarily equal to 1.

Electron microscopy and quantification of autophagic structures. Mouse and human T cells as well as entire mouse thymus were fixed using 2.5% (v/v) glutaraldehyde in phosphate buffer 0.1 M, pH 7.4 overnight at 4°C. They were post-fixed using 1% (v/v) osmium tetroxide for 90 min and dehydrated in ascending series of ethanol dilutions. They were then treated with propylene oxide, impregnated in ascending dilutions of resin in propylene oxide, left in pure resin overnight (Epon, Inland Europe), embedded and polymerized at 60°C for 48 h. Ultra-thin sections (70 nm) performed on ultramicrotome (Leica ultracut R) were collected on butvar-coated single-slot copper grids, stained with 1% (v/v) uranyl acetate for 30 min and with lead citrate for

2 min. Grids were examined by TEM (Hitachi H600) and the images were acquired using a digital Hamamatsu camera. Fifty cell sections per condition were examined and autophagic compartments were quantified. Only grids prepared from different resin blocks were considered for quantification, avoiding counting the same cell several times. Vesicles were considered as autophagosomes when meeting at least two of the following criteria:³¹ double membrane, absence of ribosome in cytosolic side of the vacuole, similar density of the luminal side of the vesicle compared with cytosol, complete or remains of organelles inside the vesicle. Single-membrane vesicles containing dense or clear amorphous material were considered as autolysosomes. Autophagosomes and autolysosomes counts were pooled and termed "autophagic vacuoles" or "autophagic compartments." Statistical analysis comparing either normal vs. lupus-prone mice, or SLE patients vs. healthy donors were performed using unpaired t-test when samples followed a normal distribution and by Mann-Whitney U test when Gaussian distribution of values could not be assumed. Both tests were considered significant when $p < 0.05$

Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

Acknowledgments

We thank Jean-Louis Pasquali and Jean-Paul Briand for carefully reading the manuscript. We also thank Monique Duval for technical assistance. This work was funded by the French Centre National de la Recherche Scientifique, Région Alsace and University of Strasbourg.

Supplemental Materials

Supplemental materials may be found here: www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/20275

References

- Yang Z, Klionsky DJ. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. *Curr Opin Cell Biol* 2010; 22:124-31; PMID:20034776; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ccb.2009.11.014>
- Saitoh T, Akira S. Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins. *J Cell Biol* 2010; 189:925-35; PMID:20548099; <http://dx.doi.org/10.1083/jcb.201002021>
- Rioux JD, Xavier RJ, Taylor KD, Silverberg MS, Goyette P, Huett A, et al. Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis. *Nat Genet* 2007; 39:596-604; PMID:17435756; <http://dx.doi.org/10.1038/ng2032>
- Saitoh T, Fujita N, Jang MH, Uematsu S, Yang BG, Satoh T, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature* 2008; 456:264-8; PMID:18849965; <http://dx.doi.org/10.1038/nature07383>
- Alirezai M, Fox HS, Flynn CT, Moore CS, Hebb AL, Frausto RF, et al. Elevated ATG5 expression in autoimmune demyelination and multiple sclerosis. *Autophagy* 2009; 5:152-8; PMID:19066443; <http://dx.doi.org/10.4161/auto.5.2.7348>
- Harley JB, Alarcón-Riquelme ME, Criswell LA, Jacob CO, Kimberly RP, Moser KL, et al. International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus Genetics (SLEGEN). Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXX, KIAA1542 and other loci. *Nat Genet* 2008; 40:204-10; PMID:18204446; <http://dx.doi.org/10.1038/ng.81>
- Orozco G, Eyre S, Hinks A, Bowes J, Morgan AW, Wilson AG, et al. UKRAG consortium. Study of the common genetic background for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Ann Rheum Dis* 2011; 70:463-8; PMID:21068098; <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2010.137174>
- Ruiz-Irastorza G, Ramos-Casals M, Brito-Zeron P, Khamashta MA. Clinical efficacy and side effects of antimalarials in systemic lupus erythematosus: a systematic review. *Ann Rheum Dis* 2010; 69:20-8; PMID:19103632; <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2008.101766>
- Perl A. Emerging new pathways of pathogenesis and targets for treatment in systemic lupus erythematosus and Sjogren's syndrome. *Curr Opin Rheumatol* 2009; 21:443-7; PMID:19584730; <http://dx.doi.org/10.1097/BOR.0b013e32832ef66b>
- Page N, Gros F, Schall N, Décossas M, Bagnard D, Briand J-P, et al. HSC70 blockade by the therapeutic peptide P140 affects autophagic processes and endogenous MHCII presentation in murine lupus. *Ann Rheum Dis* 2011; 70:837-43; PMID:21173017; <http://dx.doi.org/10.1136/ard.2010.139832>
- Page N, Gros F, Schall N, Briand JP, Muller S. A therapeutic peptide in lupus alters autophagic processes and stability of MHCII molecules in MRL/lpr B cells. *Autophagy* 2011; 7:539-40; PMID:21282971; <http://dx.doi.org/10.4161/auto.7.5.14845>
- Monneaux F, Muller S. Molecular therapies for systemic lupus erythematosus: clinical trials and future prospects. *Arthritis Res Ther* 2009; 11:234; PMID:19591653; <http://dx.doi.org/10.1186/ar2711>
- Pua HH, Dzhalgalov I, Chuck M, Mizushima N, He YW. A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation. *J Exp Med* 2007; 204:25-31; PMID:17190837; <http://dx.doi.org/10.1084/jem.20061303>

14. Arsov I, Adebayo A, Kucerova-Levisohn M, Haye J, MacNeil M, Papavasiliou FN, et al. A role for autophagic protein beclin 1 early in lymphocyte development. *J Immunol* 2011; 186:2201-9; PMID:21239722; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1002223>
15. Stephenson LM, Miller BC, Ng A, Eisenberg J, Zhao Z, Cadwell K, et al. Identification of Atg5-dependent transcriptional changes and increases in mitochondrial mass in Atg5-deficient T lymphocytes. *Autophagy* 2009; 5:625-35; PMID:19276668; <http://dx.doi.org/10.4161/auto.5.5.8133>
16. Pua HH, Guo J, Komatsu M, He YW. Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes. *J Immunol* 2009; 182:4046-55; PMID:19299702; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.0801143>
17. Feng CG, Zheng L, Jankovic D, Báfica A, Cannons JL, Watford WT, et al. The immunity-related GTPase Irgm1 promotes the expansion of activated CD4+ T cell populations by preventing interferon-gamma-induced cell death. *Nat Immunol* 2008; 9:1279-87; PMID:18806793; <http://dx.doi.org/10.1038/ni.1653>
18. Kovacs JR, Li C, Yang Q, Li G, Garcia IG, Ju S, et al. Autophagy promotes T-cell survival through degradation of proteins of the cell death machinery. *Cell Death Differ* 2012; 19:144-52; PMID:21660048; <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2011.78>
19. Tsokos GC, Mitchell JP, Juang YT. T cell abnormalities in human and mouse lupus: intrinsic and extrinsic. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15:542-7; PMID:12960478; <http://dx.doi.org/10.1097/00002281-200309000-00004>
20. Mizushima N, Yoshimori T, Levine B. Methods in mammalian autophagy research. *Cell* 2010; 140:313-26; PMID:20144757; <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2010.01.028>
21. Delgado MA, Elmaoued RA, Davis AS, Kyei G, Deretic V. Toll-like receptors control autophagy. *EMBO J* 2008; 27:1110-21; PMID:18337753; <http://dx.doi.org/10.1038/emboj.2008.31>
22. Xu Y, Jagannath C, Liu XD, Sharafkhaneh A, Kolodziejaska KE, Eissa NT. Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity. *Immunity* 2007; 27:135-44; PMID:17658277; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2007.05.022>
23. Nambiar MP, Juang YT, Krishnan S, Tsokos GC. Dissecting the molecular mechanisms of TCR zeta chain downregulation and T cell signaling abnormalities in human systemic lupus erythematosus. *Int Rev Immunol* 2004; 23:245-63; PMID:15204087; <http://dx.doi.org/10.1080/08830180490452602>
24. Fujita K, Maeda D, Xiao Q, Srinivasula SM. Nrf2-mediated induction of p62 controls Toll-like receptor-4-driven aggresome-like induced structure formation and autophagic degradation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011; 108:1427-32; PMID:21220332; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1014156108>
25. Bell BD, Leverrier S, Weist BM, Newton RH, Arechiga AF, Luhrs KA, et al. FADD and caspase-8 control the outcome of autophagic signaling in proliferating T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008; 105:16677-82; PMID:18946037; <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0808597105>
26. Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, et al. Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest* 2006; 116:2161-72; PMID:16886061; <http://dx.doi.org/10.1172/JCI26185>
27. Yuan J, Kroemer G. Alternative cell death mechanisms in development and beyond. *Genes Dev* 2010; 24:2592-602; PMID:21123646; <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1984410>
28. Miller BC, Zhao Z, Stephenson LM, Cadwell K, Pua HH, Lee HK, et al. The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development. *Autophagy* 2008; 4:309-14; PMID:18188005
29. Chaturvedi A, Dorward D, Pierce SK. The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyperresponses to DNA-containing antigens. *Immunity* 2008; 28:799-809; PMID:18513998; <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2008.03.019>
30. Katz SJ, Russell AS. Re-evaluation of antimalarials in treating rheumatic diseases: re-appreciation and insights into new mechanisms of action. *Curr Opin Rheumatol* 2011; 23:278-81; PMID:21448012; <http://dx.doi.org/10.1097/BOR.0b013e32834456bf>
31. Hubbard VM, Valdor R, Patel B, Singh R, Cuervo AM, Macian F. Macroautophagy regulates energy metabolism during effector T cell activation. *J Immunol* 2010; 185:7349-57; PMID:21059894; <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1000576>



Supplemental Material to:

**Frédéric Gros, Johan Arnold, Nicolas Page,
Marion Décossas, Anne-Sophie Korganow, Thierry Martin
and Sylviane Muller**

**Macroautophagy is deregulated in murine
and human lupus T lymphocytes**

Autophagy 2012; 8(7)

<http://dx.doi.org/10.4161/auto.20275>

www.landesbioscience.com/journals/autophagy/article/20275

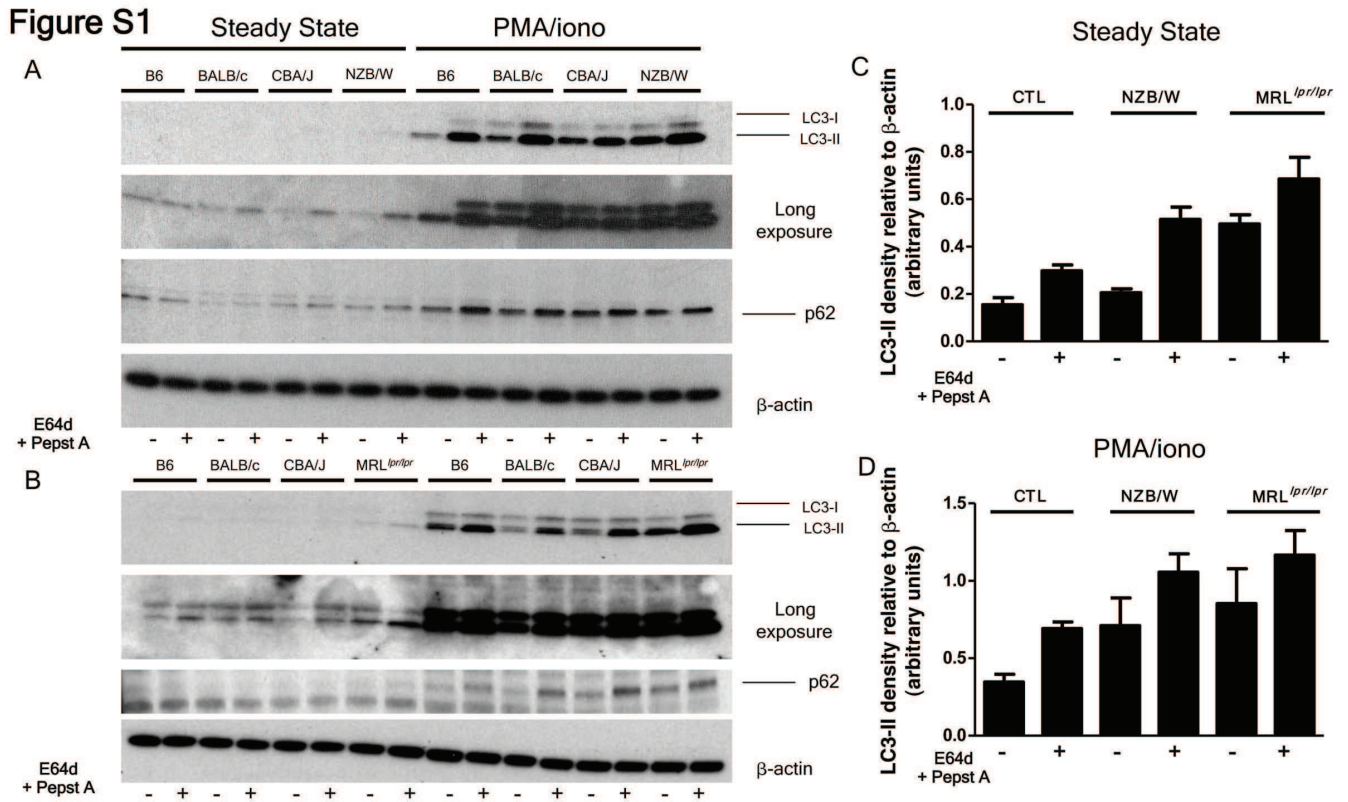


Figure S1. Autophagic activity is higher in lupus-prone mice compared to several control mouse strains. T cells were sorted from spleens of control CBA/J, C57BL/6 (B6), BALB/c and lupus-prone MRL *lpr/lpr* and NZB/W mice sacrificed at 12 weeks in (A) and 17 weeks in (B). Cells were left unstimulated at 37°C for 18 h (steady state) or stimulated for the same time with 50 ng/mL PMA and 1 μM ionomycin (PMA/iono). When indicated, cells were treated (+) or not (-) with 5 μg/mL pepstatin A and 5 μg/mL E64d to block lysosomal degradation. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE, transferred onto PVDF membranes before staining with anti-LC3 and anti-p62 Abs. Loading controls were performed by staining actin b-chain. (C and D) Same experiment: means obtained from four independent experiments. CTL = merged data of C57BL/6, BALB/c and CBA/J (n = 4), NZB/W (n = 2) and MRL *lpr/lpr* (n = 2) lupus mice at steady state (C) and under PMA/ionomycin stimulations (D).

Figure S2

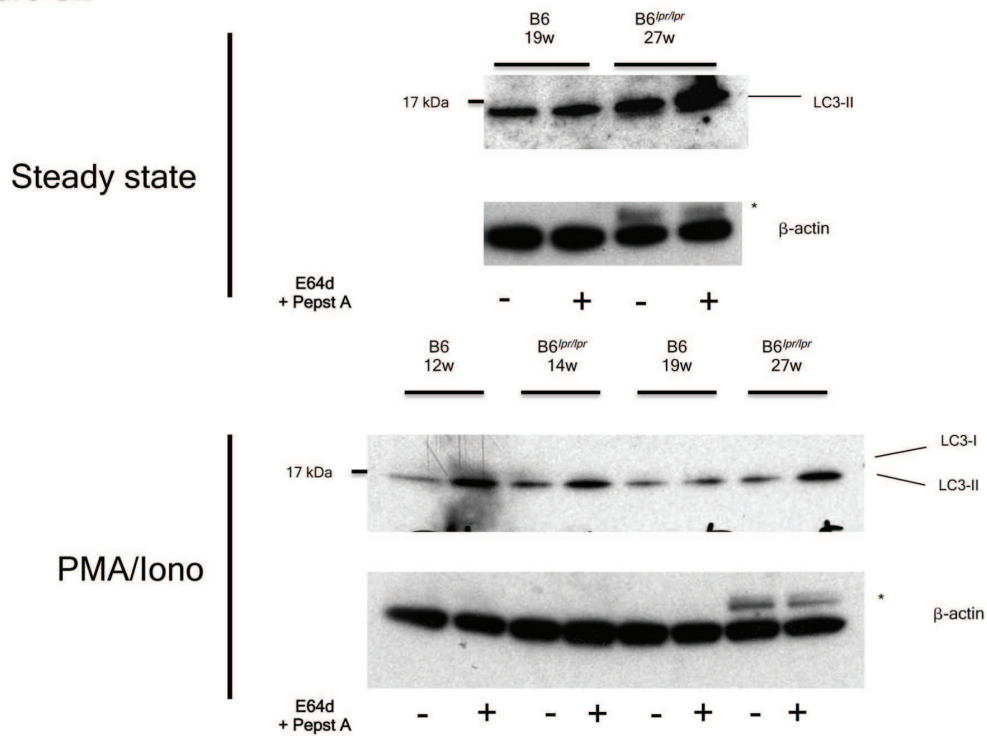


Figure S2. No difference in autophagic activity in T cells from lupus B6^{lpr/lpr} mice compared to control B6 mice. T cells were sorted from spleens of C57BL/6 (B6) and C57BL/6^{lpr/lpr} (B6^{lpr/lpr}) mice sacrificed at the indicated ages and left unstimulated at 37°C for 18 h (steady state) or stimulated for the same time with 50 ng/mL PMA and 1 μM ionomycin (PMA/Iono). When indicated, cells were treated (+) or not (-) with 5 μg/mL pepstatin A and 5 μg/mL E64d to block lysosomal degradation. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE, transferred onto PVDF membranes before staining with anti-LC3 Ab. Loading controls were performed by staining actin b-chain. *Band corresponding to heavy and light chain of immunoglobulins retained in lysates obtained from oldest lupus mice.

Figure S3

Splenic B cells

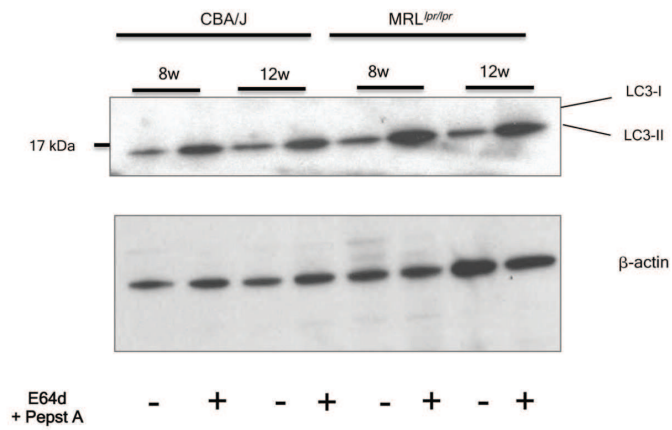


Figure S3. Autophagic activity is similar in splenic B cells from MRL^{lpr/lpr} and CBA/J mice. B cells were sorted from spleens of control CBA/J and lupus-prone MRL^{lpr/lpr} mice sacrificed at the indicated ages (8 and 12 weeks). Cells were left unstimulated at 37°C for 4 h. As indicated, cells were treated (+) or not (-) with 5 µg/mL pepstatin A and 5 µg/mL E64d to block lysosomal degradation. Cell lysates were resolved by SDS-PAGE, transferred onto PVDF membranes before staining with anti-LC3 Ab. Loading controls were performed by staining actin b-chain.

Figure S4

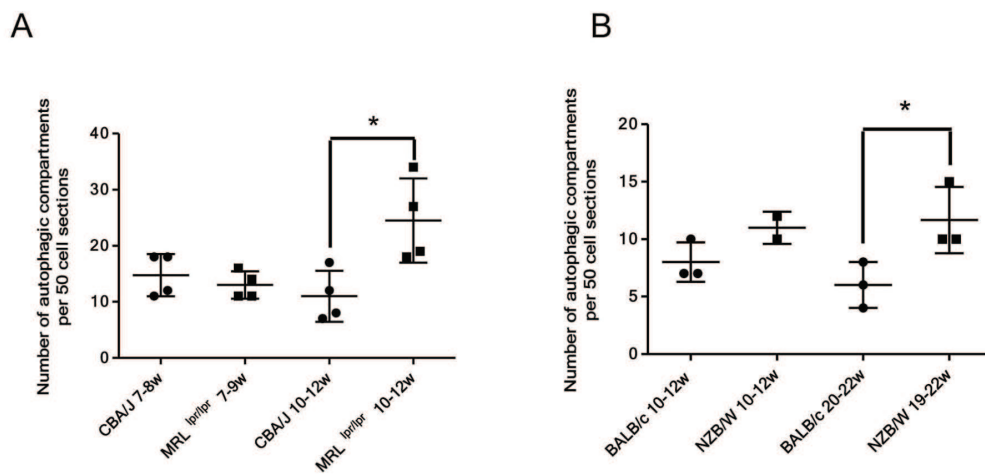


Figure S4. Autophagic activity is maintained or increased in lupus mice compared to control mice. Quantification by TEM of autophagosomes counted in 50 peripheral T lymphocyte sections sorted from spleens of control CBA/J and lupus MRL^{lpr/lpr} mice (A) or from control BALB/c and lupus NZB/W (B). Mice were sacrificed at the indicated ages. Each point represents measurement of an individual mouse. Central bars refer to the mean and vertical bars stand for standard deviation. *p < 0.05 using unpaired t test. w = week.

Figure S5

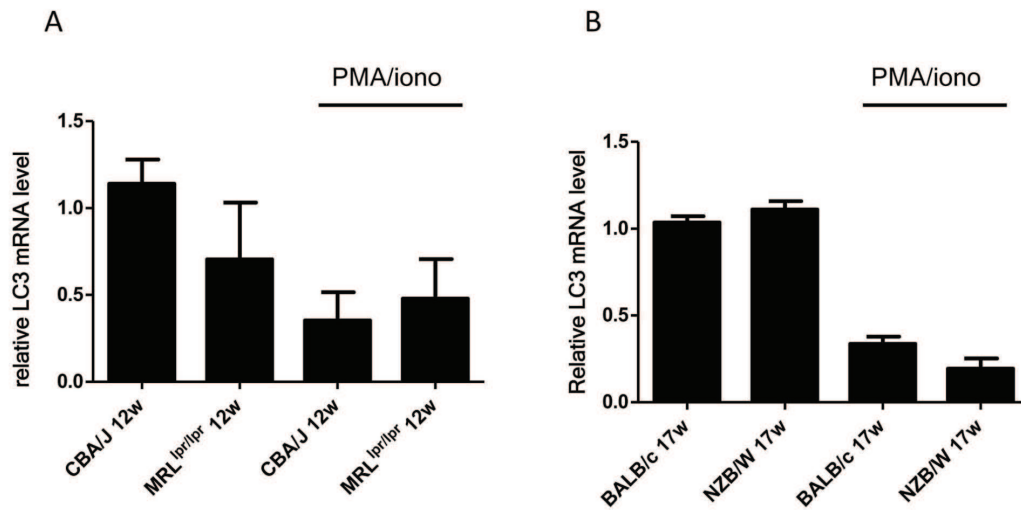


Figure S4. Higher LC3-II levels observed in lupus-prone mice are not a consequence of LC3 mRNA level increase. T cells were sorted from spleens of control CBA/J, BALB/c and lupus-prone MRL *lpr/lpr* and NZB/W mice sacrificed at 12 weeks (A) and 17 weeks (B). Cells were left unstimulated at 37°C for 18 h (steady state) or stimulated for the same time with 50 ng/mL PMA and 1 µM ionomycin (PMA/iono). RNA was isolated and retrotranscribed into cDNA. Quantitative RT-PCR was then performed for measurement of *Map1lc3a* transcripts and were normalized to *Actb* as described in material and methods section. mRNA levels are relative to one control mouse per PCR plate arbitrarily set to 1.

1.3 Commentaires

Nous avons montré qu'une dérégulation du processus autophagique est observée dans les LTs périphériques de souris lupiques MRL^{lpr/lpr} et NZB/W mais aussi de patients atteints de LED. En effet, alors que le nombre d'autophagosomes est équivalent entre les thymocytes de souris lupiques et contrôles, nous notons une nette dérégulation de l'activité autophagique au niveau des LTs périphériques issus de souris lupiques. Cette augmentation du nombre d'autophagosomes dans les LTs périphériques est également observée dans les LTs de patients atteints de LED. De manière intéressante, l'accumulation des autophagosomes dans les LTs de souris lupiques n'est pas généralisable à toute inflammation, comme nous le démontrons par les résultats obtenus lors des expériences d'injection de LPS à des souris saines.

L'existence d'un lien entre une dérégulation de l'autophagie et le développement de pathologies humaines commence seulement à émerger. Par exemple, une étude montre le rôle de l'autophagie dans l'homéostasie de cellules non immunitaires comme les podocytes rénaux chez la souris (Hartleben *et al.*, 2010). Une déficience en *Atg5* dans les podocytes rénaux induit une glomérulopathie inflammatoire proche de celle observée chez certains patients atteints de lupus en phase aiguë. De plus, la suppression de ce gène *in vivo* dans des cellules neuronales aboutit au développement de maladies neurodégénératives, dues à une accumulation anormale d'agrégats protéiques intracellulaires pouvant être une source de toxicité (Hara *et al.*, 2006).

Des études soulignent également l'impact de l'autophagie dans le développement de maladies inflammatoires chroniques telles que la maladie de Crohn. Cette pathologie est associée chez l'Homme à des allèles de susceptibilité du gène *Atg16L1* (Cadwell *et al.*, 2008). Une déficience en *ATG16L1* joue un rôle sur l'inflammation, la xénophagie et la présentation antigénique dont la régulation pourrait participer au développement à la maladie de Crohn.

Au moment de la publication de notre article, deux études suggèrent un impact de l'autophagie dans l'auto-immunité. La première montre un rôle de l'autophagie dans la présentation d'antigènes d'origine endogène par les molécules du CMH II dans les cellules épithéliales thymiques intervenant dans la sélection thymique. Comme mentionné ci-dessus, la contribution d'une dérégulation de l'autophagie dans le thymus aboutissant à une perte de la tolérance centrale des LTs chez l'Homme n'a pas encore été démontrée (Nedjic *et al.*, 2008). La seconde étude suggère que l'expression d'*atg5* dans les LTs infiltrant les sites inflammatoires de patients atteints de sclérose en plaques est élevée. Cette expression pouvant dans certains cas être corrélée à une forte activité autophagique, ce mécanisme pourrait se révéler important dans la survie des LTs autoréactifs (Alirezai *et al.*, 2009).

Bien que deux polymorphismes d'un seul nucléotide (SNPs) localisés sur le gène *Atg5* aient été récemment associés au développement du lupus (Harley *et al.*, 2008; Orozco *et al.*, 2011), aucune étude ne s'était encore penchée sur le rôle de l'autophagie dans l'immunité adaptative au cours de la pathogénèse lupique.

Ces premiers résultats obtenus sur les LTs au début de ma thèse, il nous ont amenés à conclure qu'il était important de définir le périmètre exact du phénomène observé, c'est-à-dire d'évaluer si la forte activité autophagique détectée dans les LTs de patients lupiques est généralisée à d'autres pathologies inflammatoires et/ou auto-immunes.

Rconnaissons également que publiée en 2012 cette étude ne nous permettait pas de trancher sur l'impact éventuel de l'autophagie sur le développement de la pathologie lupique. Comme décrit en introduction, l'autophagie peut être un vecteur de survie des LTs grâce à son rôle connu dans l'homéostasie mitochondriale mais aussi par son activité productrice d'énergie. L'autophagie peut aussi, selon certaines études, participer à la mort cellulaire des LTs, aboutissant à un phénotype nécrotique de ces cellules lorsque l'apoptose extrinsèque est défaillante ou lors d'infections par HIV. Cette étude cependant nous a permis de démontrer que l'autophagie est dérégulée dans les LTs de souris lupiques et de patients atteints d'un LED. Les conséquences d'une telle observation sur le traitement de ces pathologies restait à déterminer. Néanmoins, certains médicaments tels que l'hydroxychloroquine, administrée aux patients lupiques sous le nom de Plaquenil (Lee *et al.*, 2011) ou le peptide P140, développé au laboratoire et actuellement en essai clinique de phase III, inhibent tous deux le flux autophagique et montrent un effet bénéfique sur le développement de la pathologie (Gros and Muller, 2014; Page *et al.*, 2011b). En conclusion, comprendre l'impact précis de l'autophagie dans l'homéostasie lymphocytaire lors des pathologies auto-immunes nous semblr déterminant pour aboutir à la génération de nouvelles molécules ciblant spécifiquement les processus autophagiques qui ont trait à la survie des lymphocytes.

2 Publication 2

Macroautophagy is dispensable for B cell development but required for homeostasis and long-term humoral autoimmune responses.

Johan Arnold, Diane Murera, Florent Arbogast, Jean-Daniel Fauny, Sylviane Muller and Frédéric Gros

2.1 Avant-propos

Le deuxième objectif que nous avons poursuivi a été d'étudier l'impact de l'activité autophagique des LBs lors d'une réponse immunitaire normale ou lors d'une réponse immunitaire pathologique (cas d'une auto-immunité systémique). Selon les modèles décrits précédemment, l'autophagie intervient dans le développement précoce des LBs et semble nécessaire à la survie des sous-populations B1a (Miller *et al.*, 2014). Cependant, ces conclusions basées sur l'étude de souris chimères portant des cellules dont l'expression d'ATG5 a été invalidée depuis le début de la vie embryonnaire ne permettent pas tout à fait de conclure quant à un rôle spécifique d'ATG5 sur le développement des LBs. En effet, des défauts liés à la perte d'ATG5 accumulés au cours de l'hématopoïèse pourraient expliquer le phénotype de blocage développemental au stade pré-B. Nous avons généré deux modèles génétiques de souris permettant d'abolir l'expression de la protéine ATG5 spécifiquement, soit dès les stades précoces de la différenciation des LBs, soit seulement dans les LBs matures. L'expression d'ATG5 est indispensable à la formation des autophagosomes. Ces modèles de souris sont basés sur la délétion de l'exon 3 du gène *Atg5*. Pour ce travail, nous avons bénéficié de souris « C57BL/6 *atg5^{f/-}* » générées par Noboru Mizushima dans lesquelles l'exon 3 du gène *Atg5* a été « flanqué » de sites loxP. Ces souris ont été croisées avec des souris C57BL/6 CD21-cre et C57BL/6 Mb1cre. La recombinaison cre exprimée sous le contrôle du promoteur Mb1 permet une inactivation d'*Atg5* aux stades immatures des LBs ou exprimée sous le contrôle du promoteur CD21 permet une inactivation de *Atg5* aux stades matures des LBs. Ces souris ont été générées sur fond génétique C57BL/6 et C57BL/6^{*lpr/lpr*}. Ces dernières développent spontanément une pathologie de type lupique, cependant moins sévère et plus lente que celle manifestée par les souris MRL^{*lpr/lpr*}. Au moment de ce travail et encore à ce jour, aucune étude n'a montré l'impact

de l'autophagie *in vivo* dans un modèle auto-immun. En comparant les deux modèles de délétion, nous entendions clarifier le rôle de l'autophagie dans le développement des LBs. Nous souhaitons également évaluer le rôle de l'autophagie des LBs lors de la réponse humorale auto-immune chronique afin de définir une nouvelle voie de ciblage thérapeutique. Les résultats de ces travaux sont exposés dans la **publication 2** (Arnold *et al.*,) soumise pour publication.

2.2 Autophagy is dispensable for B cell development but essential for humoral autoimmune responses

Johan Arnold¹, Diane Murera¹, Florent Arbogast¹, Jean-Daniel Fauny¹, Sylviane Muller^{1,2} and Frédéric Gros^{1,3*}

¹CNRS, Immunopathology and therapeutic chemistry/Laboratory of excellence MEDALIS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France

²University of Strasbourg Institute for Advanced Study, Strasbourg, France

³University of Strasbourg, Strasbourg, France

* *Corresponding author*

Abstract

To gain new insight into the role of B cell autophagy, we generated two novel mouse models deficient for autophagy-related genes (*Atg5*), one from the outset pro-B cells stage (*Atg5^{f/-}* Mb1 cre) and the other in mature B cells only (*Atg5^{f/-}* CD21 cre). We show that autophagy is dispensable for pro- to pre-B cell transition but necessary at a basal level to maintain normal numbers of peripheral B cells. It appears nonessential for B cell activation under B-cell receptor stimulation but required for their survival after LPS stimulation that drives plasmablast differentiation and for specific IgM production after immunization. Results obtained using *Atg5^{f/-}* CD21 cre x C57BL/6^{lpr/lpr} autoimmune-prone mice show that B cell autophagy is involved in the maintenance of anti-nuclear Ab secretion and elevated numbers of long-lived plasma cells, and sustains IgG deposits in the kidneys. Thus, treatments specifically targeting autophagy might be beneficial in systemic autoimmune diseases.

Keywords

Macroautophagy/B lymphocytes/development/humoral response/autoimmunity

Introduction

Macroautophagy is a catabolic process allowing the degradation of cytoplasmic material in double membrane vesicles, ultimately fusing with lysosomes. Macroautophagy, initially implicated in the generation of nutrients under metabolic stress, is known to play multiple roles, in different physiologic compartments, such as in vacuole trafficking, cell signalling and cell death. Macroautophagy is deeply involved in the regulation of immunity (Deretic *et al.*, 2013). It has been shown that autophagy can regulate inflammation related to inflammasome activation and to IFN- α secretion. Moreover, it contributes to antigen presentation by both major histocompatibility complex (MHC) class I and class II molecules (Romao *et al.*, 2013a).

Macroautophagy is also tightly linked to lymphocyte activation and survival. It plays central roles in T cell basal homeostasis, survival and polarization (He *et al.*, 2012b). It is also involved in the regulation of T cell signalling by down regulating the NF- κ B pathway (Paul *et al.*, 2012) and apoptosis processes through the procaspases 3 and 8 degradation (Kovacs *et al.*, 2012).

Macroautophagy has additionally been described to regulate B cell lineage, in particular during B cell development. Thus, it has been shown that B cells generated from foetal liver chimeras, with a complete deletion of the essential autophagy-related genes (*Atg5*), exhibited a block at the pro- to pre-B stage transition (Miller *et al.*, 2008; Pua *et al.*, 2007). However, as the genetic deletion is systemic and occurs very early during development, the question still remains over whether the developmental blockade could be due to defects resulting from early hematopoietic development. Indeed, macroautophagy has been shown to be fundamental to hematopoietic stem cell survival and renewal (Mortensen *et al.*, 2011). Moreover conditional deletion of *Atg5* under the control of CD19 promoter expressed from the pre-B stage, does not lead to major developmental breaks, except a decrease of B-1a B cell population (Miller *et al.*, 2008). The contrast with results obtained with chimeric mice, could be due to the partial deletion induced by cre expression under the control of CD19 promoter (Hobeika *et al.*, 2006). At this stage, however, it remains unclear whether macroautophagy is really needed in the first steps of B cell development.

Studies based on mouse models deleted for autophagy genes at an early stage of development led to fundamental findings regarding the importance of macroautophagy in B cell-related immune responses. Two independent studies, one based on T cell-dependent and T cell-independent model antigens¹⁰ and the other on infectious agents (Conway *et al.*, 2013; Pengo *et al.*, 2013) concluded that macroautophagy is necessary *in vivo* for humoral immune responses by regulating plasma cell differentiation and survival. The former study (Pengo *et al.*, 2013) showed that macroautophagy is involved in regulating endoplasmic reticulum (ER) load along with plasma cell differentiation thus limiting ER stress and contributes to long-lived plasma cell survival. A role for macroautophagy in B

cell early activation was excluded, especially in germinal centre (GC) formation. Two more recent studies, one based on a mouse model of influenza infection and the other on model antigens used as immunogens, demonstrated that in addition to its effect on plasma cell survival, macroautophagy is necessary for the survival of B cell memory compartment (Chen *et al.*, 2014b; Chen *et al.*, 2015). These findings therefore also implicate macroautophagy in humoral autoimmunity.

Studying the involvement of autophagy in autoimmunity is justified by its central regulatory impact in inflammation, its role on antigen presentation and on lymphocyte activation and survival (Gros and Muller, 2014; Pierdominici *et al.*, 2012). Our team and others described a deregulation of macroautophagy in T cells from both lupus-prone mice and patients suffering from systemic lupus erythematosus (SLE) (Alessandri *et al.*, 2012; Caza *et al.*, 2014; Gros *et al.*, 2012). This deregulation could contribute to autoreactive T cell survival and can be put in line with the deregulation of macroautophagy and also of chaperone-mediated autophagy (CMA) in B cells that has been recently described to occur in lupus (Clarke *et al.*, 2014; Macri *et al.*, 2015). To date, however, these data still remain correlative and no study has been published describing an *in vivo* model, prone to systemic autoimmunity, with specific autophagy deletion in B cells.

Here we describe the generation of two new mouse models of conditional ATG5 deletion, one under the control of a promoter active early during B cells development (Mb1 cre) and the other active in mature B cells only (CD21 cre). They were designed and constructed to clarify the role of macroautophagy in B cell development and homeostasis. In addition, $Atg5^{f/f}$ CD21 cre deficient mice were crossed with autoimmune-prone mice to further examine the role of macroautophagy *in vivo* on long-term humoral autoimmunity and study some lupus-related pathophysiological features.

Results

Basal levels of autophagy are necessary for B cell maintenance

We generated two new mouse models deficient for ATG5 specifically in B cells. The first one, under the control of Mb1 promoter, was deleted early during B cells development while the second one, under the control of CD21cre promoter, was designed to be deleted in mature B cells only. Both mouse models were born at the predicted Mendelian ratio and showed no particular morphologic phenotype.

ATG5^{f/f} CD21-cre mice exhibited no deletion of ATG5 in splenic T cells and in these cells, conversion of LC3-I to LC3-II occurred normally (Figure 1A). However, as expected, B cells from CD21-cre mice showed a specific deletion of ATG5 compared to B6 mice and littermate ATG5^{f/+} CD21-cre mice (Figure 1B). A poor conversion of LC3 was observed in ATG5^{f/f} CD21 cre mice validating the impeding of the autophagy process, even under IgM stimulation. As previously reported by others (Clarke *et al.*, 2014), no increase in autophagic activity was found after BCR stimulation in wild type and littermate mice. We also checked if autophagy was decreased in B cells from ATG5^{f/f} Mb1 cre (Mb1 cre) mice. We saw a very efficient deletion of ATG5 in splenic B cells from ATG5^{f/f} Mb1 cre, correlating with a total impairment of LC3-II generation (Figure 1C). While B cells from CD21 cre B cells exhibited a reproducible LC3-II knockdown (Fig EV1), LC3-II was no longer observed in Mb1 cre B cells, arguing thus for a very efficient and specific deletion of autophagy in this model. As autophagy levels (deduced from LC3-II staining) between littermates mice from both CD21 cre and Mb1 cre mice were comparable to respective wild type mice, we pooled both types of littermates in the following analyses.

We then wanted to quantify the different subpopulations of B cells in the spleen of these two defective models. The proportion and number of B cells in CD21 cre mice were comparable to the one observed in control mice. However, a reproducible decrease in B cell number was observed in Mb1 cre mice (Figure 2A and 2B). No difference was detectable in CD21 cre mice in terms of distribution of the different populations of splenic B cells *i.e.* follicular (FO) B cells, transitional 1 and 2 (T1 and T2) B cells, and MZ B cells (Figure 2C and 2D). On the other hands, while the number of T1, T2 and FO B cells appeared equally affected in terms of diminution, the number of MZ B cells, in contrast, was maintained at its a normal level. These results led us to speculate that a late *Atg5* deletion in B cells (CD21 cre mice) allows maintaining basal levels of autophagy, while in contrast, an early *Atg5* deletion in B cells (Mb1 cre mice) induces a defect in peripheral homeostasis.

Next, we assessed the repartition of B cell populations from the peritoneum. A decrease of both B-1a and B-2 B cell proportion was observed in Mb1 cre mice while, in contrast, a decrease in peritoneal B2 B cells only was visualized in CD21 cre mice (Figure 2E and 2F). This finding led us to conclude that

early during development, autophagy is necessary for the generation of B-1a B cells. The loss of B-2 cells in both mice might be due to sensitivity to cell death of these Ab-secreting cells in the absence of autophagy, or to a defective replenishment from circulating cells.

Altogether, these results show that autophagy is important during development for B-1a B cell generation. Basal levels of autophagy are necessary to maintain a normal number of B cell in the periphery. B-2 B cells of the peritoneum are particularly sensitive to the decrease of autophagic activity.

Basal levels of autophagy are not necessary for B-2 B cell development

The survival defect of spleen B cells found in Mb1 cre mice could be linked to a developmental issue as described in earlier studies using bone marrow foetal liver chimeras (Miller *et al.*, 2008). We thus checked the number of precursor cells of the B cell lineage in the bone marrow of Mb1 cre and CD21 cre mice, and compared the data to wild type and littermate mice (Figure 3A and B). In sharp contrast with previous studies (Miller *et al.*, 2008), we did not see any significant decrease in the number of B cells precursors in Mb1 cre mice. Previous data suggested a developmental block at the transition between the pro- and pre-B cells stages (Miller *et al.*, 2008). In this study, normal proportions of pre-, pro- and immature B cells were found in the bone marrow of early and late ATG5 deleted mice (Figure 3C and D). Distinction of pre-B and immature B cells from pro- B cells by CD43 staining did not reveal any anomaly between Mb1 cre and CD21 cre mice compared to controls (Figure 3 E and F). Thus, autophagy seems dispensable for the pro- to pre- B cell differentiation. However, as previously described by others (Miller *et al.*, 2008) using CD19 cre mice, we observed a decrease in the proportion of mature B cells, corresponding to Fraction F defined from Hardy nomenclature (Hardy *et al.*, 1991) (Figure 3C, D and F). Since these cells are described as recirculating cells coming from the periphery, they may not necessarily constitute a final developmental stage occurring in the bone marrow. They have also been considered as cells secreting Abs against blood-borne pathogens. The acute deletion of autophagy in Mb1 cre mice might thus lead to sensitivity to cell death of this B cell subtype, because of their long-lived nature or of their Ab secretion properties. Taken together these results show that autophagy is dispensable for the transition between pro to pre-B cell stage. However, basal levels of autophagy are necessary to maintain a normal number of mature recirculating B cells in the bone marrow.

Autophagy is dispensable for B cell activation in response to BCR stimulation

We then assessed in our two models the potential relevance of autophagy activation in B cell response to BCR stimulation. We found no difference in terms of B cell proliferation in Mb1 cre and CD21 cre mice stimulated by anti-IgM Abs with or without anti-CD40 stimulation (Figure 4A and B)

and no significant difference in B cell survival (Figure 4C and D). These results are in line with previous reports showing that short-term B cell stimulation by antigen does not require autophagic activity. In contrast, under LPS stimulation, both Mb1 cre and CD21 cre mice showed a significantly reduced survival. LPS is known to drive differentiation of mouse B cells into plasmablasts. These finding highlights a preferential role of autophagy in Ab-secreting cell survival rather than in initial B cell activation. Incidentally no exclusive Annexin-V staining in CD138 negative population was found in these conditions, suggesting that B cells upregulate this plasma cell marker normally, but then fail to survive in the absence of autophagy (Fig EV2).

We then examined short-term humoral responses against the T-dependent model antigen OVA (Figure 5A). No difference was observed in the total levels of IgM and IgG in Mb1 cre and CD21 cre mice compared to controls (Figure 5B). Likewise the anti-OVA IgG secretion in CD21 cre mice and control mice was similar (Figure 5C). This observation could be explained by the fact that in our immunization conditions, long-lived IgG secreting plasma cell differentiation is normal in the absence of autophagy in B cells, and that survival defects might impact IgG secretion at a longer term. However a significant drop of anti-OVA IgM secretion was observed in both deficient mice mice (Figure 5C), which could reflect decreased survival of short-lived plasma cells in the absence of autophagy. This result suggests that although antigen specific responses are altered, continuous differentiation of naïve B cells into plasma cells allows continuous secretion of Ig, as shown by normal levels of total Ig.

Overall these results suggest that in the absence of autophagy in B cells, activation driven by BCR stimulation is largely normal. However, early specific humoral response is compromised, probably due to a defect of short-lived plasma cells, as illustrated by the high mortality rates after stimulating B cells deficient for autophagy by LPS.

Autophagy in B cells is integral to the long-term maintenance of autoimmune responses

Both macroautophagy and CMA have been shown recently to be deregulated in B cells from lupus-prone mice and patients with lupus (Clarke *et al.*, 2014; Macri *et al.*, 2015). To complete our analysis, we thus asked the question about whether deficiency in *Atg5* could influence autoimmune responses. Owing the mild defect in peripheral B cell homeostasis observed in Mb1 cre mice, these experiments were performed using CD21 cre mice crossed with B6^{lpr/lpr} mice. The B6^{lpr/lpr} strain develops a mild autoimmunity characterized by the secretion of autoAbs directed against nuclear antigens and Ig and complement deposition in kidneys (Izui *et al.*, 1984). Crossed mice were born at the expected mendelian ratio and did not exhibit differential mortality rates before the age of observation. Compared to CD21 cre *Atg5*^{f/+ lpr/lpr} littermate mice (littermates^{lpr/lpr}), there was no significant difference in CD21 cre *Atg5*^{f/- lpr/lpr} mice (CD21 cre^{lpr/lpr}) when total IgM or specific anti-

dsDNA IgM levels were measured (Figure 6A). In sharp contrast, however, CD21 cre^{*lpr/lpr*} mice exhibit a markedly reduced hypergammaglobulinemia and secreted much less anti-dsDNA IgG (Figure 6A). Several sets of experiments were then designed to investigate if this reduction could be due to a decreased B cell survival in peripheral lymphoid organs. No change in splenic B cell proportions was observed in CD21 cre^{*lpr/lpr*} mice compared to controls (Figure 6B) and no difference was detected in GC area relative to the surface of the spleen section scanned by confocal microscopy (Fig EV3). These results indicate that in our model of autoimmunity, autophagy does not play any significant role in the early steps of B cell activation. A slight reduction of splenic plasma cells was noted, but it did not reach statistical significance, consistent with the IgM autoAbs levels that remain unaffected. These findings may result from a greater replenishment of new short-lived plasma cells in the *lpr* model, compensating their loss in the absence of autophagy.

In contrast to the above observations, a reproducible drop of CD138⁺B220⁻ plasma cells counts was found in the bone marrow of CD21 cre^{*lpr/lpr*} mice, compared to controls (Figure 6C and D). These results fully agree with the above-described diminished levels of IgG secreted by long-lived CD138⁺B220⁻ plasma cells, which reside in bone marrow niches.

We then investigated the pathophysiological relevance of the decreased autoAb secretion level observed in CD21 cre^{*lpr/lpr*} mice. In agreement with the above-described results, Immunofluorescence imaging of renal glomeruli clearly showed that IgG deposit staining was weaker in CD21 cre^{*lpr/lpr*} mice compared to littermates controls (Figure 7).

Altogether these results indicate that in a mild spontaneous model of lupus, autophagy is a central component of the long-term maintenance of autoAb production by plasma cells and Ab deposits in target organs, while B cell proportion remains unaffected.

Discussion

The main purpose of this study was to provide new insight into the role of autophagy in the development of B cells. It was previously assumed that autophagy was important for the transition from pro- to pre-B cells (Miller *et al.*, 2008). These results were obtained using foetal liver chimeras with ATG5 deficient cells, in which autophagy was deleted at the early stages of embryonic life, and thus before the initial hematopoietic stem cell development took place. Owing to the major role of autophagy in the survival of hematopoietic stem cells and in lymphocyte precursors (Mortensen *et al.*, 2011), it thus remained possible that accumulation of defects in the absence of autophagy in B cell precursors led to the observed defects on pre-B cell survival. Indeed no such defects were observed using CD19, expressed from the pre-B cell stage, to drive cre expression (Miller *et al.*, 2008). It could be argued further that CD19 leads to incomplete ATG5 deletion at this early developmental stage. We thus created a new mouse expressing cre recombinase under the control of the strong Mb1 promoter known to drive very efficient deletion at the pro-B cell stage. In the mice generated in this study, contrary to previous observations, we did not find any developmental blockade at the pro/pre-B cell transition. We thus concluded that autophagy is dispensable for B cell development in the bone marrow.

However, we found a reproducible decrease of mature recirculating B cells in the bone marrow. These cells occupying a specific niche in this central lymphoid organ, are described as long-lived cells, secreting Abs against blood-borne pathogens (Cariappa *et al.*, 2005). As CD21 cre mice exhibit no such loss, we cannot totally rule out a developmental issue in B cell precursors leading to selective defects in this population. It is also possible that the suboptimal deletion of ATG5 in CD21 cre mice is responsible for their normal survival contrary to Mb1 cre mice where the deletion was total. Thus, basal levels of autophagy are particularly necessary for the survival of mature B cells in the bone marrow.

In line with previous reports, we found a strong decrease of B-1a B cells in the peritoneum. Again this loss may be relative to developmental issue, as Mb1 cre mice exhibit this defect but CD21 cre mice did not. Overall, these data support the idea that early precursors of B-1a B cells critically depend on autophagy to generate viable cells at long-term.

Interestingly, we also found a diminished survival of B-2 B cells in the peritoneum of both CD21 cre and Mb1 cre mice. This could be explained by the secretory activity of these cells (Berberich *et al.*, 2007; Hastings *et al.*, 2006), or by their nature of mature recirculating cells. In the latter case and in contrast to what occurs in lymphoid organs, a slower replacement rate of dying cells by new B cell emigrants issued from the bone marrow, could account for these observations.

The survival of naïve B-2 cells in lymphoid organs was found to be compromised in Mb1 cre mice compared to CD21 cre mice. This could be linked to the very efficient deletion of ATG5 in Mb1 cre mice whereas some basal autophagy remained in B cells from CD21 cre mice. It seems that, contrary to what was previously assumed, basal levels of autophagy are indeed required for the survival of B cells in the periphery. This observation may be related to an impairment of homeostatic maintenance, as proliferation and survival upon BCR signalling was normal in both Mb1 cre and CD21 cre mice. Interestingly, in our study, the only effective stimulus leading to survival defect was the one generated by LPS, and this was observed in both our deletion models. LPS is known to drive the differentiation of mouse B cells into plasmablasts. Thus, the selective survival defect could also be linked to the role autophagy plays in the survival of Ab-secreting cells.

A defective IgM production against the T-cell dependent antigen OVA was observed in both Mb1 cre and CD21 cre mice. In contrast, IgG production against OVA appeared normal in the absence of autophagy. A possible explanation for this outcome would be the defective survival of short-lived plasma cells in secondary lymphoid organs in the absence of autophagy while long-lived plasma cells could transiently resist to the absence of autophagy. In this setting, defective IgG production could be observed on the long term only. It is also possible that selection processes allow autophagy-competent cells only to survive, as it has been described in mice with CD19 cre-mediated ATG5 deletion (Pengo *et al.*, 2013). This latter argument remains however uncertain, knowing the very efficient ATG5 deletion observed in our models, especially in Mb1-cre mouse B cells.

To study the long-term impact of autophagy deletion in B cells, we used the spontaneous systemic autoimmunity model driven by the *lpr* mutation on a B6 genetic background (Cohen and Eisenberg, 1991). This mutation on *Fas* gene leads to secretion of autoAbs directed against nuclear antigens, which can deposit in several organs, especially in the kidneys of affected animals (Izui *et al.*, 1984). The pathology developed over time, although relatively mild in comparison to MRL/*lpr* mice, for example, mimicking some lupus features. $Atg5^{f/-}$ CD21 cre x $B6^{lpr/pr}$ autophagy-deficient autoimmune mice showed no survival failures in B cells supporting the minimal role of autophagy in B cell survival, even in an autoimmune context. In contrast, and in good agreement with data reported in other (infectious) settings (Chen *et al.*, 2014b; Chen *et al.*, 2015; Pengo *et al.*, 2013), we found a decrease in plasma cell proportion in the bone marrow reflecting selective defects in long-lived cells. This drop of long-lived Ab-secreting cells may be responsible for the reduction of hypergammaglobulinemia and anti-dsDNA Abs observed in our autophagy defective mice. Note that we cannot formally exclude a possible contribution of the reduced memory B cell compartment in *lpr* mice deficient for autophagy (Chen *et al.*, 2014b; Chen *et al.*, 2015). Interestingly, we also found less IgG deposits in the kidneys of CD21 cre^{*lpr/lpr*} mice. Considering the above-described findings, we propose that this feature

is mainly due to autophagy impairment in plasma cells, and not in initial B cell activation, as no major defect in GC formation was noticed.

In summary, using three novel mouse models defective for autophagy process, we report here that autophagy is dispensable for B-2 B cell development contrary to B-1a B cells and that basal levels of autophagy are absolutely required in B cells to maintain their normal number in lymphoid organs. We confirm in a new setting that autophagy is a major player of long-lived B cells and Ab-secreting cell survival. We describe further that mice exhibiting signs of lupus autoimmunity and in which autophagy was diminished, show significantly less biological (lower anti-dsDNA IgG Ab levels) and clinical (less IgG deposits in their kidneys) lupus features, without having their whole B cell compartment adversely affected. Therefore, autophagy modulation appears to be a good therapeutic option to limit autoAb-linked inflammation in systemic autoimmunity.

Materials and Methods

Mice

Atg5^{fl/fl} mice, with a flox sequence flanking exon 3 of *Atg5* gene backcrossed on a C57BL/6 (B6) background have been described (Hara *et al.*, 2006) were a kind gift from Prof. N. Mizushima. We also used mice with systemic deletion of exon 3 (*Atg5^{+/-}*) to generate *Atg5^{fl/-}* mice. *Atg5^{fl/fl}* mice were crossed with *Atg5^{+/-}* CD21 cre (Kraus *et al.*, 2001) or *Atg5^{+/-}* Mb1 cre (Hobeika *et al.*, 2006) mice for B cell lineage specific deletion. In all experiments, B6 *Atg5^{fl/-}* CD21cre or B6 *Atg5^{fl/-}* Mb1 cre mice with B cell specific deletion of *Atg5*, were compared to littermates (B6 *Atg5^{fl/+}* CD21cre mice and *Atg5^{fl/+}* Mb1cre mice, pooled in some experimental analysis, as the autophagic activity is comparable between these mice). In some experiments, B6 *Atg5^{fl/-}* CD21cre mice were crossed with B6 mice bearing the *lpr* mutation affecting *Fas* gene, driving a spontaneous systemic autoimmunity. In this setting, lupus-prone B6^{*lpr/lpr*} *Atg5^{fl/-}* CD21cre (3 females, 1 male) were compared to age-matched B6^{*lpr/lpr*} *Atg5^{fl/+}* littermates (4 females, 1 male). Mice were genotyped for the *Atg5* alleles (wild type, with constitutive or induced deletion) with the primers A (exon3-1), 5'-GAATATGAAGGCACACCCCTGAAATG-3'; B (short2), 5'-GTACTGCATAATGGTTTAACTCTTGC-3'; C (check2), 5'-ACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGG-3'; D (5L2), 5'-CAGGGAATGGTGTCTCCAC-3' using PCR [94°C (4 min); 30 cycles of 94°C (30 sec), 60°C (30 sec), 72°C (1 min); 72°C (5 min)]. The cre transgene expressed under the control of CD21 promoter was detected with primers cre-F 5'-ACGACCAAGTGACAGCAATG-3' ; cre-R 5'-CTCGACCAGTTTAGTTACCC-3' and for the cre expressed under Mb1 promoter with primers, cre-F 5'-ACCTCTGATGAAGTCAGGAAGAAC-3' ; cre-R 5'-GGAGATGTCCTTCACTCTGATTCT-3' using PCR [94°C (4 min); 25 cycles of 94°C (30 sec), 60°C (30 sec), 72°C (1 min); 72°C (5 min)]. The presence of *lpr* allele was determined by PCR using a sense primer, 5'-AGGTTACAAAAGGTCACCC-3', in intron 2 and two antisense primers, 5'-GATACGAAGATCCTTCTCTGTG-3' and 5'-CAAACGCAGTCAAATCTG-CTC-3' using PCR [94°C (4 min); 30 cycles of 94°C (45 sec), 55°C (1min), 72°C (1 min); 72°C (5 min)]. We genotyped mice with the REExtract-N-Amp Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). All mice were bred and maintained in accordance with guidelines of the local Institutional Animal Care and Use Committee (CREMEAS).

Flow cytometry

Antibodies (Abs) used for flow cytometry analyses were all purchased from BD Biosciences: allophycocyanin (APC)-Cyanin 7-labelled anti-mouse TCR-β (clone H57-597, 553139), phycoerythrin (PE)-labelled anti-mouse CD69 (clone H1.2F3, 553236), fluorescein isothiocyanate (FITC), APC or peridinin chlorophyll (PerCP) cyanine 5.5-labelled anti-mouse B220 (clone R13-6B2, 553087, 553092

and 552771), FITC-labelled anti-mouse CD3 ϵ (clone 145.2C11, 553061), FITC-labelled anti-mouse CD21/CD35 (clone 7G6, 553818); PE-labelled anti-mouse CD23 (clone B3B4, 553139), APC-labelled anti-mouse CD5 (clone 53-7-3, 550035), APC-labelled anti-mouse CD43 (clone S7, 560663), APC-labelled anti-mouse IgD (clone 11-26c.2a, 560868), APC-labelled anti-mouse CD19 (clone 1D3, 550992), APC-labelled anti-mouse CD138 (clone 281-2, 558626), FITC-conjugated polyclonal anti-mouse IgM (Jackson Immunoresearch, Newmarket, UK, 115-095-020). Cells were incubated with fluorochrome-conjugated Abs and with unlabelled rat anti-mouse CD16/CD32 monoclonal Ab (mAb, clone 2.4G2, 553142) to block Fc receptors, for 15 min at 4°C in phosphate-buffered saline (PBS) pH 7.4 containing 2% (v/v) fetal calf serum (FCS). Data were collected on a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter, Fullerton, California) and analysed using FlowJo software (FlowJo LLC, Oregon).

Cell culture and isolation

Splenic B cells were collected from B6 *Atg5^{fl/-}* CD21 cre, B6 *Atg5^{fl/-}* Mb1 cre, B6^{*lpr/lpr*} *Atg5^{fl/-}* CD21cre mice or from littermates and immediately cultured at 37°C, 5% CO₂ in complete RPMI 1640 medium (Lonza BioWhittaker) containing 10% FCS, 10 μ g/mL gentamycin (Lonza BioWhittaker), 10 mM HEPES (Lonza, Basel, Switzerland) and 0.05 mM β -mercaptoethanol (Lonza) at a concentration of 5×10^6 cellules/mL. Splenic B cells were purified by negative selection. Briefly, spleen cell suspensions were depleted from monocytes, granulocytes, T cells and NK cells using the Pan B cell isolation Kit II (130-090-862; Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Resulting TCR- β /B220⁺ mouse B cell preparations were > 95% pure as determined by flow cytometry. Cells were stimulated with goat F(ab)₂ anti-IgM (Jackson Immunoresearch, 115-006-020) with or without anti-CD40 Ab (5mg/mL, BD Biosciences, clone HM40-3, 553721) or lipopolysaccharide (LPS) alone (5 mg/mL, Sigma). Alternatively, T cells were sorted from spleen cell suspension with the Dynabeads untouched mouse T cell isolation kit (ThermoFisher Scientific, Illkirch, France, 11413D) and were stimulated by anti-CD3 ϵ Ab (clone 145.2C11, 553057) purchased from BD Biosciences. For the analysis of proliferation, cells were stained with 0.5 μ M carboxyfluorescein isothiocyanate succinimidyl ester diacetate CFSE (Sigma Aldrich) before the stimulation. Cell death was assessed by annexin V-FITC/7-AAD double staining (BD Biosciences, respectively 559925 and 556419). After acquisition by flow cytometry, proliferation and cell death results were analysed with FlowJo software.

Immunoblots

The Abs used for western immunoblotting were specific for ACTB (Santa Cruz Biotechnology, clone C4, sc-47778), LC3 (MBL, clone 51–11, ref M115–3) and ATG5 (Polyclonal Novus). In some experiments, lysosomal protease inhibitors E64d and pepstatin A (Sigma-Aldrich, P5318 and E8640) were added at 5 μ g/mL each. When indicated, cells were treated with goat F(ab)₂ anti-IgM (5

mg/mL, Jackson ImmunoResearch, 115-006-020). To evaluate the autophagosomal membrane load, whole cell proteins were extracted from cultured cells using Laemmli buffer (Tris-HCl 125 mM pH 6.8; 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS); 10% (v/v) glycerol; 5% (v/v) β -mercaptoethanol). Cell lysates were separated using 4-20% gradient gels (Biorad) and proteins transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane. Membranes were blocked with PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (PBS-T) and 3% (w/v) non-fat dry milk for 1h and then incubated overnight at 4°C with 1 μ g/mL anti-LC3 Ab in PBS-T containing 1% non-fat dry milk, or for 1h at room temperature with 1 μ g/mL anti-ATG5 Ab in PBS-T containing 1% non-fat dry milk. After washing with PBS-T, membranes were incubated for 30 min at room temperature with goat anti-mouse IgG Ab (Southern Biotech, Birmingham, Alabama, 1030-05) conjugated to horseradish peroxidase (HRP). Signal was detected using enhanced chemiluminescence detection reagents (Immobilon Western, Merck Millipore, Darmstadt, Germany, WBKLS0500). When indicated, LC3-II and ATG5 staining were normalized by densitometry to ACTB staining using ImageJ Software.

Immunization

Eight to twelve week-old mice were injected intraperitoneally (i.p.) at days 0, 10 and 20 with the antigen suspension, and bled on days 5, 15 and 25 after the first immunization. Mice received 100 μ g ovalbumin (OVA, Sigma) in complete Freund's adjuvant (CFA, Sigma) for the first injection and 100 μ g OVA in incomplete Freund's adjuvant (IFA, Sigma) for the second and third injections.

Antibody detection by ELISA

IgG or IgM titers were measured in serum from immunized or lupus-prone mice. To measure anti-OVA specific Abs, 96-wells ELISA Maxisorp plates (NUNC, Fisher Scientific) were coated with OVA (10 μ g/mL, Sigma) in 50 mM sodium carbonate buffer (pH 9.6). The wells were blocked with PBS-T 0.1 %, 5% (w/v) milk for 1h at 37°C and incubated with diluted anti-sera for 1 h at 37°C. HRP-conjugated anti-mouse isotype-specific Abs (Jackson ImmunoResearch) were used to reveal bound Abs. Absorbance was measured at 450 nm, after revelation with tetramethylbenzidine to the wells, and stop of the reaction by 1M HCl. The same protocol was used for detecting of anti-double stranded (ds)DNA Abs except that ELISA plates were coated with 100 ng/mL non-sheared dsDNA (from calf thymus, Sigma Aldrich, St Louis, USA) in 25 mM citrate buffer, pH 5. Titers correspond to the inverse of the last dilution giving an absorbance equal to 0.2.

Immunohistofluorescence

Spleen/kidneys were embedded in Tissue-Tek OCT compound (Sakura Finetek, Torrance, California, 4583) and snap frozen with liquid nitrogen. To visualize IgG deposits in the kidney, tissue sections were then stained with goat anti mouse IgG-FITC (Southern Biotech, 1030-02) and DAPI. To detect GC in the spleen, tissue sections were stained with peanut agglutinin (PNA, Vector, Burlingame, California, FL-1071), IgD-APC and DAPI. Images were acquired with a spinning disk confocal microscope (Zeiss, Oberkochen, Germany) with an A-Plan 20x/0.8 Zeiss 20x objective. Images were analysed with ImageJ software. The quantification of IgG deposits in the kidney was performed as follows: glomeruli were identified via typical structures shaped by DAPI staining. A zone comprising 20 glomeruli was delimited for each kidney section. Fluorescence intensity given by the anti-IgG staining was measured in each glomeruli and background intensity of the delimited zone was subtracted. The quantification for GC in spleen section was performed by delimiting zones positive for PNA staining, measuring the area of the zone, and by normalizing it to the total area of the scanned section.

Statistical analyses

The data were analysed with Prism software (GraphPad, San Diego, California) using two-tailed unpaired t tests or Mann Whitney U test. Error bars represent standard deviations (SD).

Acknowledgements

We thank Prof. Noboru Mizushima for the gift of $Atg5^{ff}$ mice. This work was funded by the French Centre National de la Recherche Scientifique, the Laboratory of Excellence Medalis (ANR-10-LABX-0034) and the EquipEx program I2MC (ANR-11-EQPX-022), Initiative of Excellence (IdEx), Strasbourg University, and the Fondation Arthritis Courtin. Johan Arnold was a recipient of pre-doctoral fellowships from the Ministère de la Recherche et de l'enseignement supérieur and from Association de Recherche Contre le Cancer; Diane Murera of a pre-doctoral fellowship from the Fond National de Recherche of Luxembourg; Florent Arbogast of a pre-doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'enseignement supérieur.

Author's contribution

JA and FG performed and designed experiments. DM, FA and JDF performed experiments. SM and FG designed experiments and wrote the article.

Author's contribution

The authors declare no conflict of interest.

Figure Legends

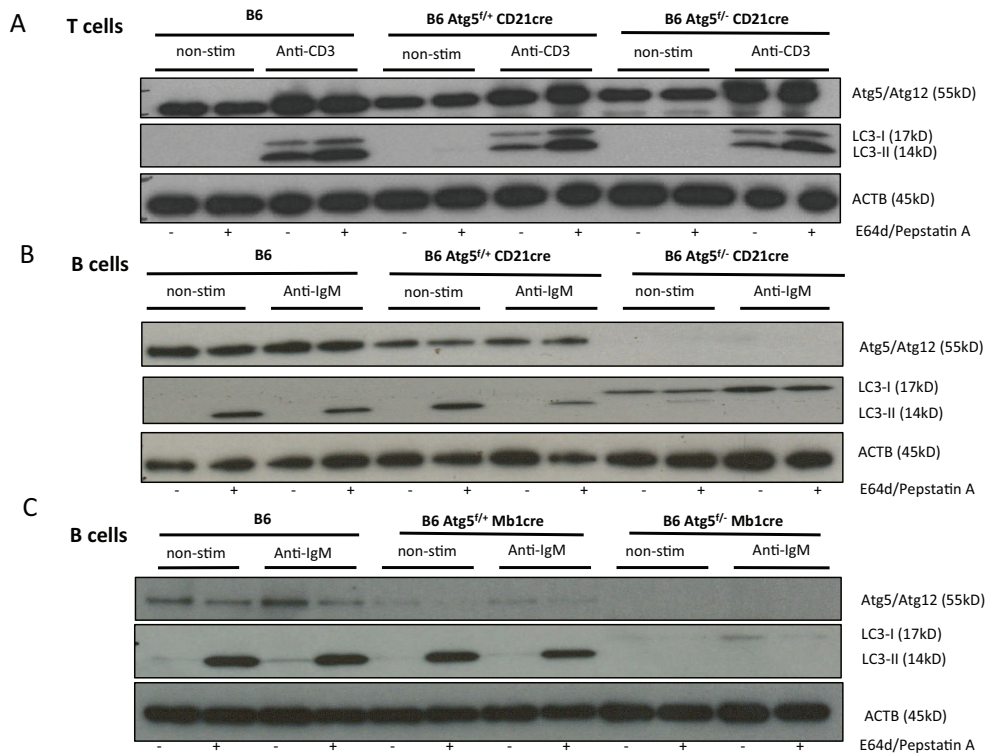


Figure 1

Figure 1: Efficient invalidation of autophagy in B cells from Atg5^{-/-} CD21 cre mice and Atg5^{-/-} Mb1 cre mice

Atg5^{+/+} CD21 cre, Atg5^{-/-} CD21 cre, Atg5^{-/-} Mb1 cre and Atg5^{+/+} Mb1 cre, were generated. B or T cells were purified from the spleen and cultured in vitro in the presence of different stimuli. Lysosomal protease inhibitors pepstatin A and E64d were added (+) or not (-) in the indicated conditions. **(A)** T cells from wild type C57BL/6 mice (B6), Atg5^{+/+} CD21 cre or Atg5^{-/-} CD21 cre were left unstimulated (non-stim) or stimulated by anti-CD3 Ab for 18h. Cells were lysed and immunoblots were performed against ATG5, LC3 and ACTB. **(B)** and **(C)** B cells from wild type B6, Atg5^{+/+} CD21 cre or Atg5^{-/-} CD21 cre **(B)**, Atg5^{-/-} Mb1 cre or Atg5^{+/+} Mb1 cre **(C)** were left unstimulated (non-stim) or stimulated by anti-IgM Ab for 18h. Cells were lysed and immunoblots were performed against ATG5, LC3 and ACTB.

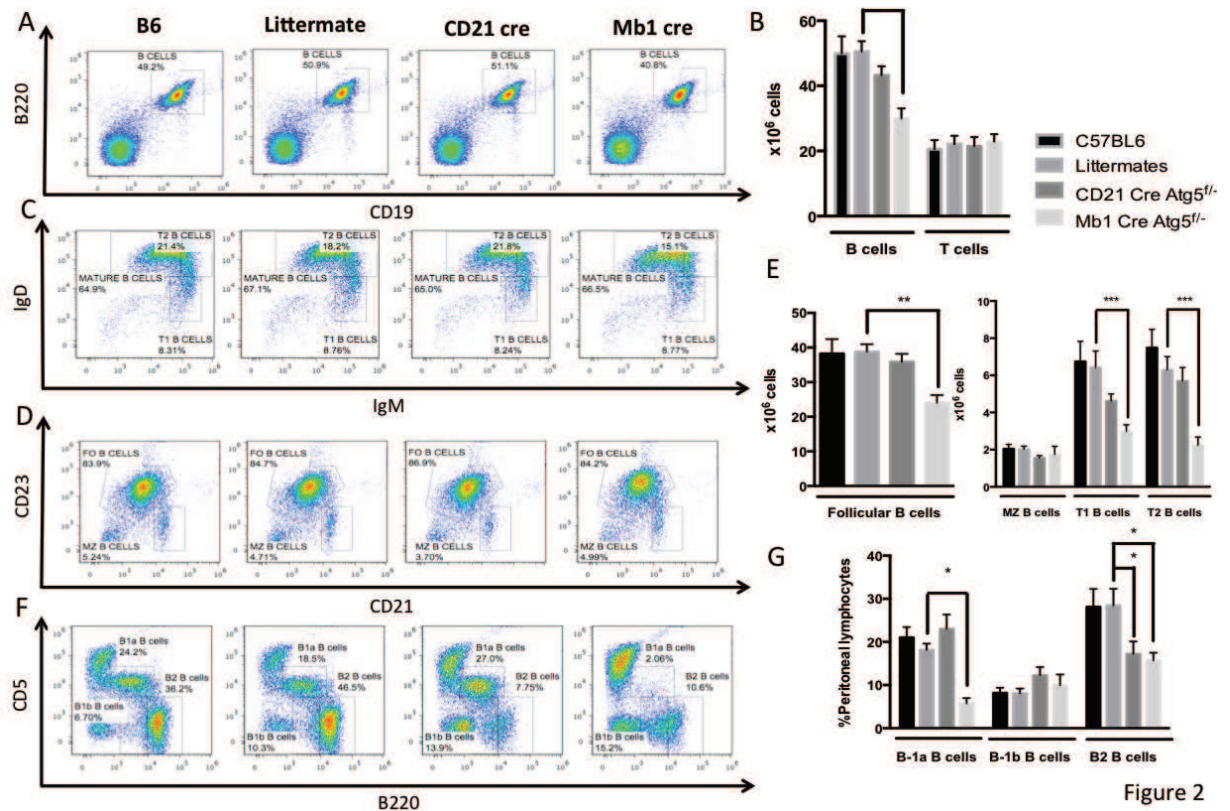


Figure 2

Figure 2: basal levels of autophagy are necessary for B cell survival in the periphery

Spleen cells from wild type C57BL/6 mice (B6), Atg5^{f/f} CD21cre or Atg5^{f/f} Mb1cre (littermates), Atg5^{-/-} CD21 cre (CD21 cre) or Atg5^{-/-} CD21cre (Mb1 cre) were stained with anti-B220 and anti-CD19 Abs. Representative dot plots obtained after flow cytometry analysis are depicted in (A) showing the percentages of B220⁺CD19⁺ B cells. (B) Means and standard deviations (SD) of absolute numbers of B and T cells, in the spleen obtained on B6 mice and littermate mice n=11, CD21 cre mice n=9 and Mb1 cre mice n=5. Expression was assessed for the spleen of the same animals for the expression of IgD, IgM (C), CD21 and CD23 (D). Representative dot plots after flow cytometry analysis, show the percentages among B220⁺ cells of mature B cells (IgM^{low}IgD^{hi}), transitional 1 and 2 (T1 and T2, respectively IgM^{hi}IgD^{lo} and IgM^{hi}IgD^{hi}), follicular (FO) B cells (CD21⁺CD23^{hi}) and marginal zone (MZ) B cells (CD21^{hi}CD23^{lo}). Means and SD of absolute numbers for these cell populations for the same number of mice as in (B) mice are indicated in (E). Peritoneal lavage was also performed on some animals and the cells obtained were stained by anti-CD5 and anti-B220 Abs. (F) Representative histogram obtained after analysis of cells from the peritoneal lavage by flow cytometry, with the different populations indicated: B-2 B cells (B220^{hi}CD5⁺), B-1a B cells (CD5⁺B220^{lo}), B-1b B cells (CD5⁻B220^{lo}). (G) Means of cell proportions obtained on B6 and littermate mice n=13, CD21 cre mice n=11 and Mb1 cre mice n=6. *p<0.05, **p<0.01, *** p<0.001 (Mann-Whitney U test). Hi, high; lo, low

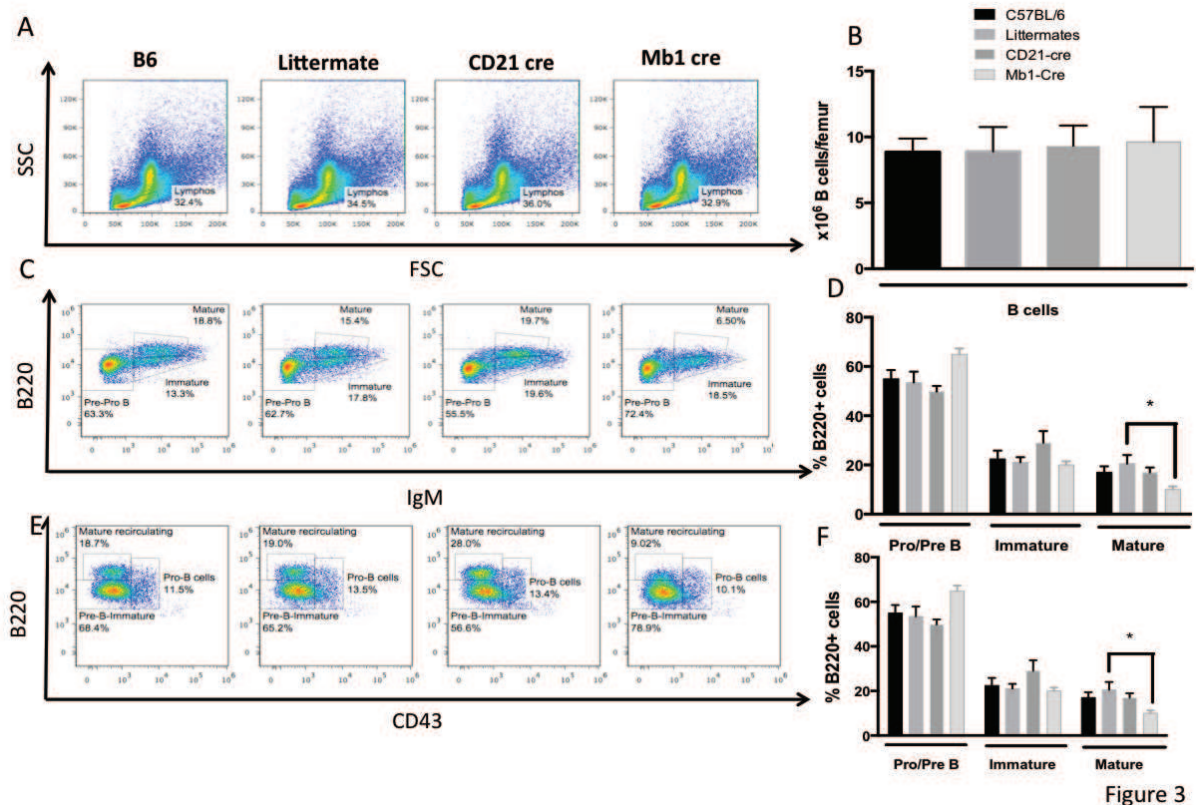


Figure 3

Figure 3: Autophagy is dispensable for B cell development in the periphery

Bone marrow cells from one femur of each wild type C57BL/6 mice (B6), $Atg5^{+/+}$ CD21cre or $Atg5^{+/+}$ Mb1cre (littermate), $Atg5^{-/-}$ CD21 cre (CD21 cre) or $Atg5^{-/-}$ Mb1 cre (Mb1 cre) were stained with anti-IgM, anti-B220 and anti-CD43 Abs and analysed by flow cytometry. **(A)** Representative dot plots of FSC and SSC profiles of bone marrow cells. **(B)** Means and SD of absolute numbers of B cell precursors defined as B220⁺ cells. **(C)** Representative dot plots for the expression of B220 and surface IgM, allowing definition of pre/pro B cells (IgM⁻B220^{lo}), immature B cells (IgM⁺B220^{lo}) and mature B cells (IgM⁺B220^{hi}). **(D)** Means and SD of percentages among B220⁺ cells of populations depicted in (C). **(E)** Representative dot plots obtained by flow cytometry analysis, showing the percentages among B220⁺ cells of pre-B/immature B cells (CD43⁻B220^{lo}), pro-B cells (B220⁺CD43⁺) and mature recirculating B cells (B220^{hi}CD43⁻). **(F)** Means and SD of percentages for the populations defined as described in E. *p<0.05, significant after Mann-Whitney U test for B6, littermate (n=4), Mb1 cre and CD21 cre mice (n=3 in each group).

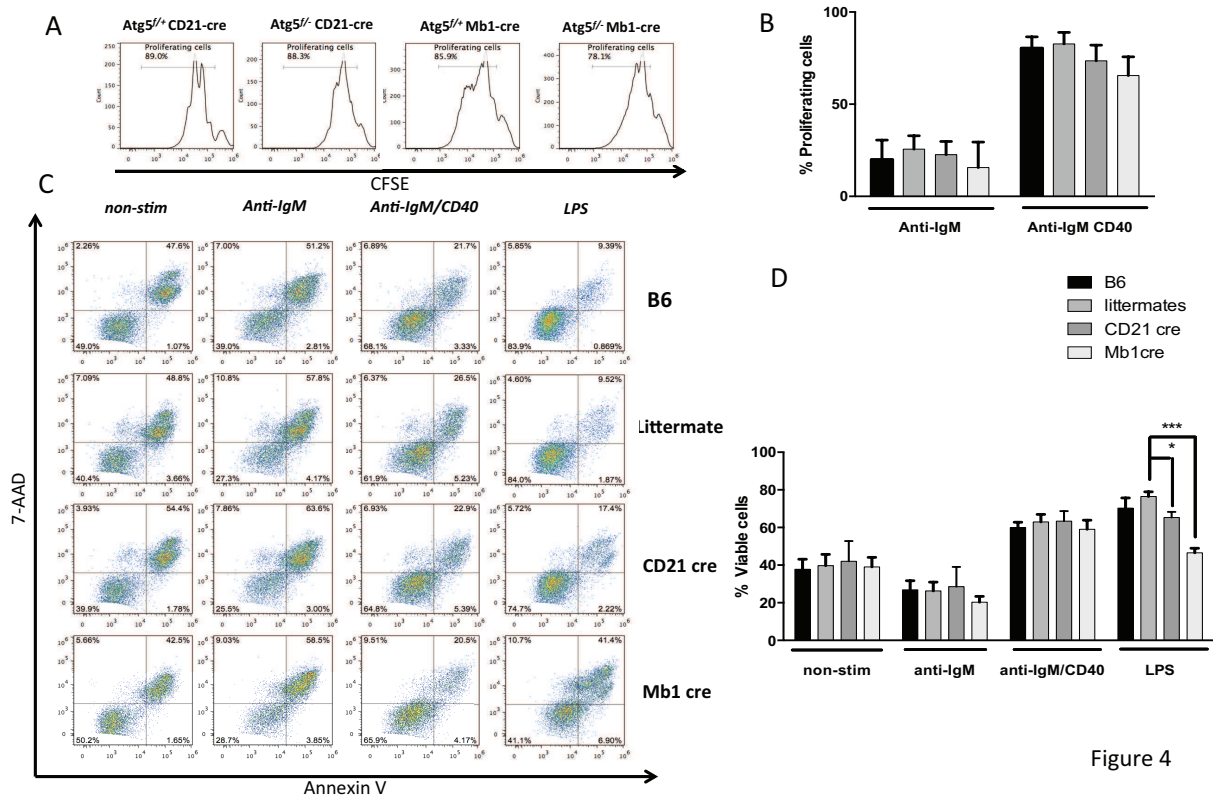


Figure 4

Figure 4: Autophagy is dispensable for B cell proliferation and survival upon BCR stimulation

Purified splenic B cells from wild type C57BL/6 mice (B6), $Atg5^{+/+}$ CD21cre or $Atg5^{+/+}$ Mb1cre (littermates), $Atg5^{-/-}$ CD21 cre (CD21 cre) or $Atg5^{-/-}$ Mb1cre (Mb1 cre) were cultured without any stimulation (non-stim) or with 5 μ g/mL anti-IgM in combination or not with anti-CD40 Abs, or with LPS (5 μ g/mL). **(A)** Cells from the indicated mice were stained before culture with CFSE, and proliferation was assessed by measuring the dilution of the fluorescent signal by flow cytometry after 3 days of culture. Percentages of proliferating cells are indicated in the histograms, for 1 representative anti-IgM/CD40 stimulation experiment, for each CD21 cre and Mb1 cre mice with their controls. **(B)** Means and SD values of the percentages of proliferating cells obtained in 4 independent experiments. **(C)** Alternatively cells were stimulated as described and cell death was assessed by double Annexin-V/7-AAD staining allowing to distinguish viable cells (Annexin-V⁻7-AAD⁻) early apoptotic cells (Annexin-V⁺7-AAD⁻) and late apoptotic/necrotic cells (AnnexinV⁺7-AAD⁺). **(D)** The means and SD values of viable cell proportions obtained in 6 independent experiments are indicated. *p<0.05, p<0.01, ***p<0.001 (Mann-Whitney U test).

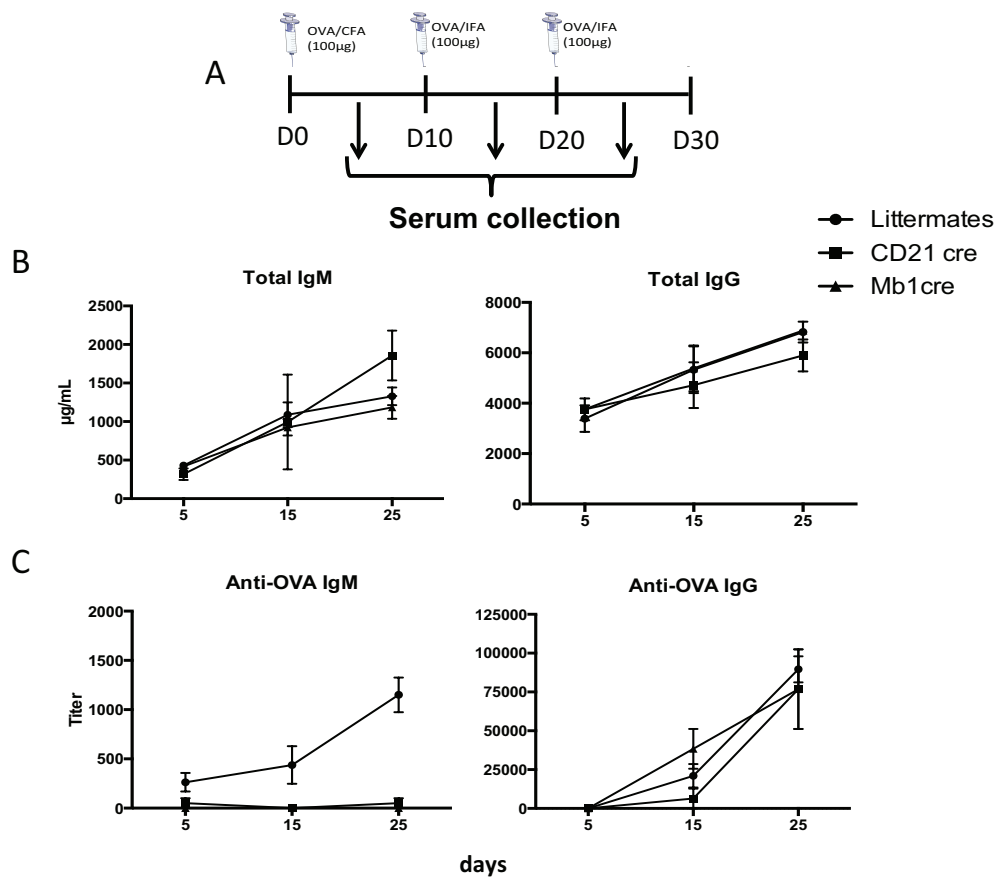


Figure 5: functional autophagy is crucial in vivo for short-term humoral response

(A) Schematic representation of the immunization protocol used. C57BL/6 mice (B6), $Atg5^{fl/+}$ CD21cre or $Atg5^{fl/+}$ Mb1cre (littermates), $Atg5^{fl/-}$ CD21 cre (CD21 cre) or $Atg5^{fl/-}$ Mb1 cre (Mb1 cre) mice were injected i.p. with OVA in the presence of FA at days 0, 10 and 20. Blood was collected at days 5, 15 and 25. **(B)** Absolute concentrations (+SEM values) of total IgM and IgG in the serum of immunized animals (littermate mice n=3, CD21 cre n=2 and Mb1 cre mice n=2). **(C)** Measurement of anti-OVA IgM and IgG Ab titers (+SEM values) in the serum from the immunized animals (littermate mice n= 3; CD21 cre mice n=2; Mb1 cre mice n=2).

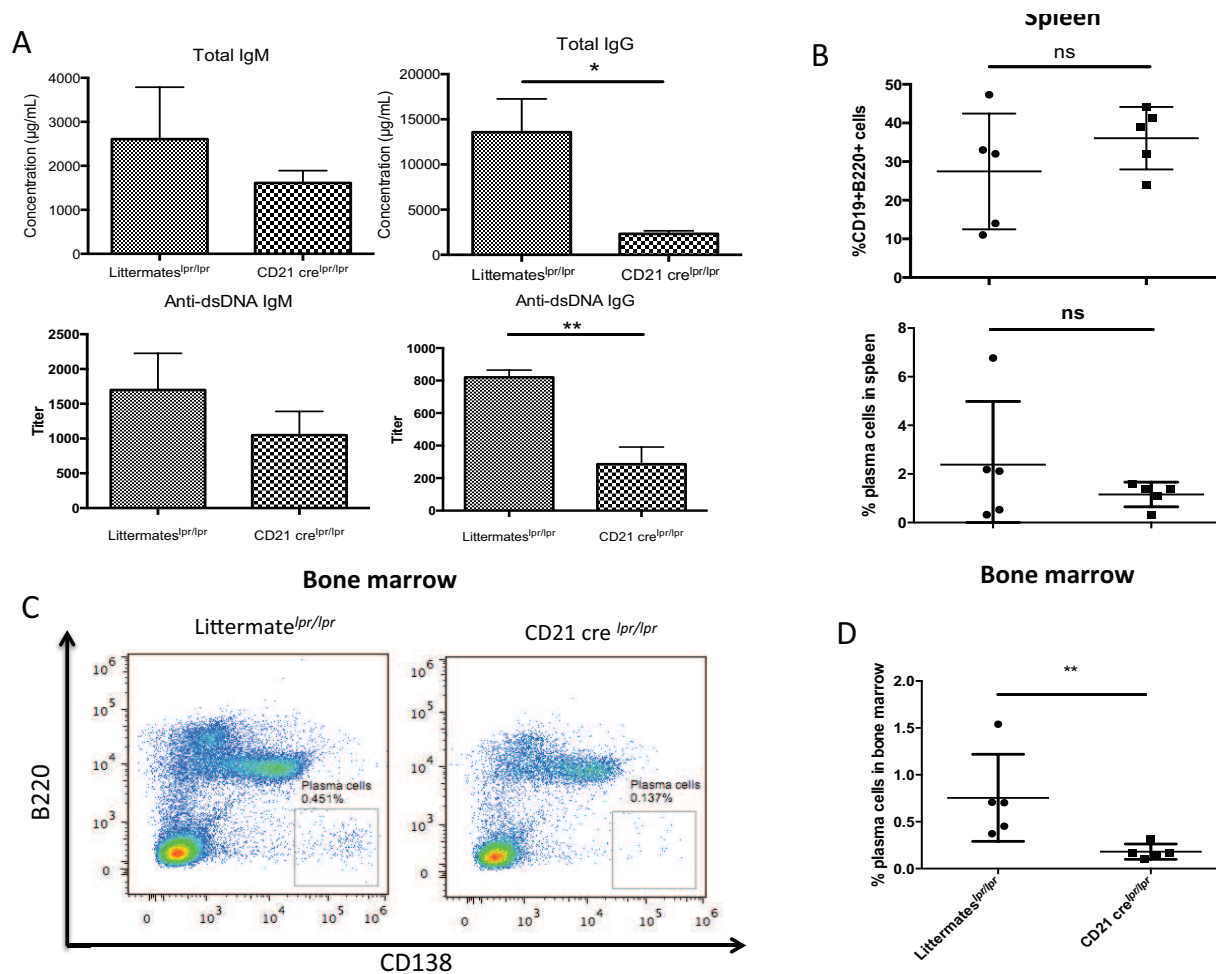


Figure 6: autophagy is necessary for survival of long-lived plasma cells during autoimmune responses

Mice harbouring the *lpr* mutation on the C57BL/6 background were crossed with *Atg5^{fl}* CD21 cre mice (CD21 cre^{lpr/lpr}). They were compared to littermate *Atg5^{fl/+}* CD21 cre mice, also crossed with *lpr* mice (littermates^{lpr/lpr}) at the age of 9 months. **(A)** Absolute concentrations of IgG and IgM in the serum determined by ELISA and titers of anti-dsDNA IgM and IgG Abs. Means (and SD) are represented (n=5 mice in each group). **(B)** The spleens of the animals were collected, cells were stained by anti-CD19, anti CD-138 and anti-B220 Abs, and analysed by flow cytometry. Each point represents the value for an individual mouse. The central bar represents the means and the upper and lower bars symbolize the SD. **(C)** Staining of bone marrow cells collected from one femur per mouse. Each dot plot stands for one representative case for each genotype. The gate delimiting B220⁺CD138⁺ cells gives an indication on the percentages of plasma cells resident in the bone marrow. **(D)** Percentage of plasma cells among the bone marrow cells for individual mice analysed as in (C). Mean and SD are indicated. **p<0.01 (Mann-Whitney U test).

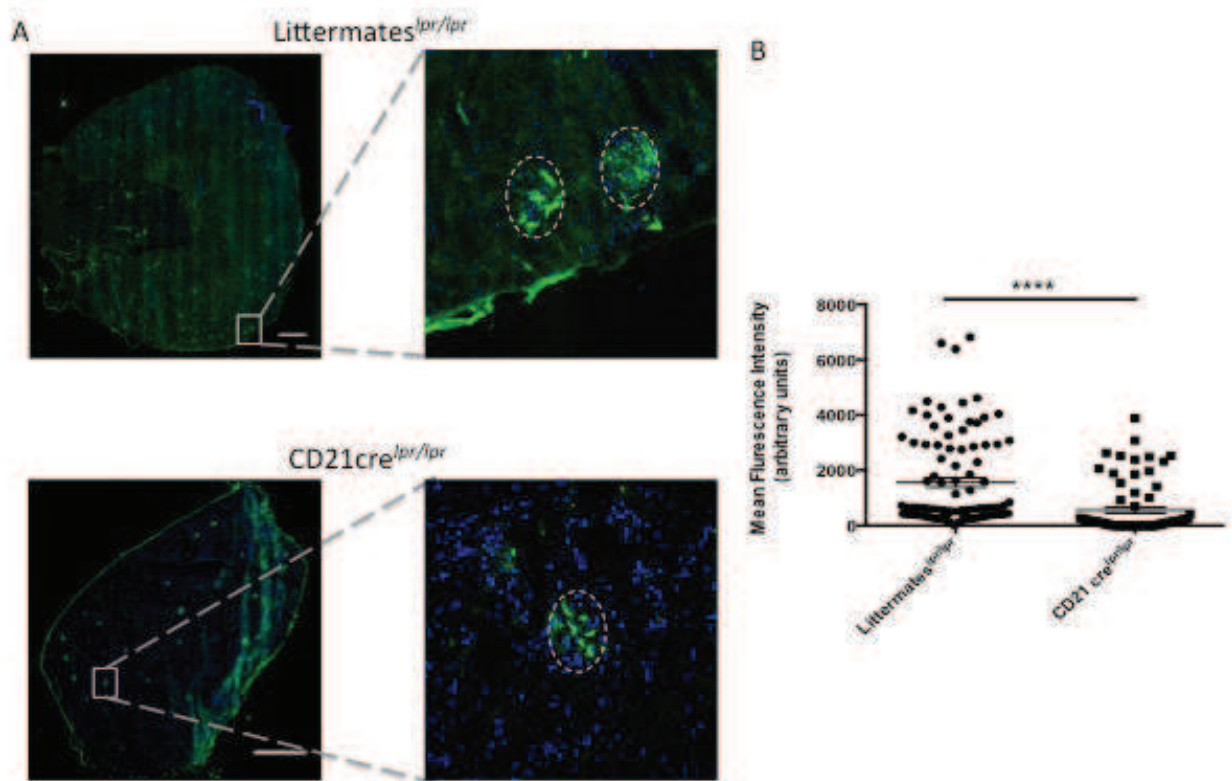


Figure 7: invalidation of autophagy in B cells dramatically reduces IgG deposits in the kidney of lupus-prone mice

Mice bearing the *lpr* mutation on the C57BL/6 background were crossed with *Atg5^{fl/-}* CD21 cre mice (CD21 cre ^{lpr/lpr}) and their kidney were collected at the age of 9 months. Littermate *Atg5^{fl/+}* CD21 cre mice were crossed with *lpr* mice for comparison (littermates ^{lpr/lpr}). Organ sections stained with anti-mouse IgG Abs before analysis on a spinning disk confocal microscope. **(A)** The total section was scanned and a representative image for each genotype is shown on the left. The white bars represent 500 μm. A magnification is indicated on the right to exemplify a glomerulus positive for IgG deposition, delimited by the dotted line. **(B)** The intensity of IgG staining was determined for each glomerulus as indicated in the material and methods section. Individual values of littermates ^{lpr/lpr} n=5 and CD21 cre ^{lpr/lpr} n=4 animals (n=20 glomeruli per animal) for each genotype were pooled and plotted on the graph. The bars represent the mean of glomerular IgG staining for each genotype. **** p<0.001 (Mann-Whitney U test).

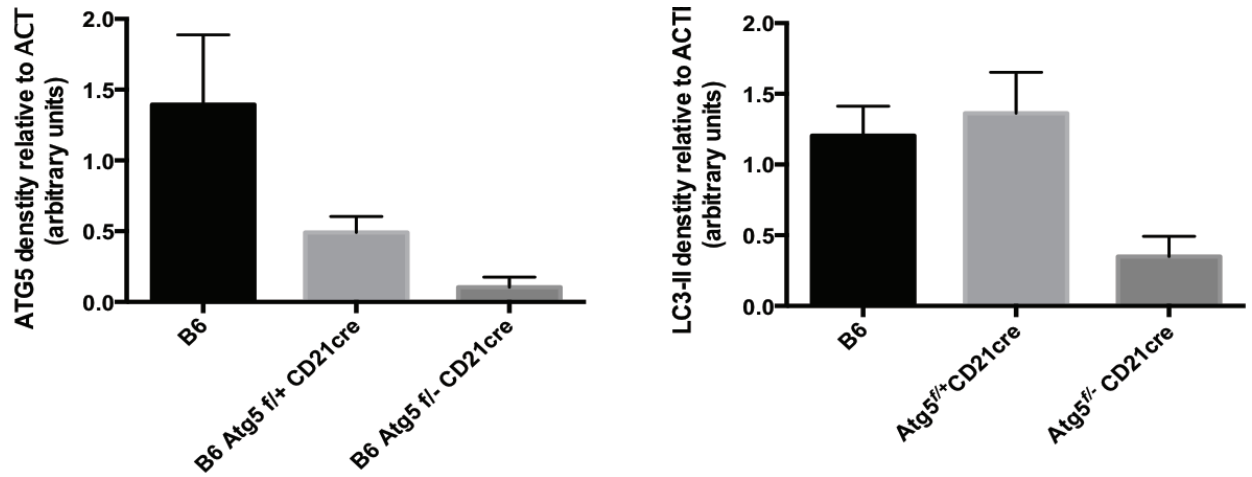


Figure EV1: measurement of the efficiency of autophagy deletion in B cells from model mice

Densitometric analysis of the non-stimulated condition, with protease inhibitors, presented on western immunoblotting in figure 1 for C57BL/6 (B6), CD21 Atg5^{fl/+} CD21 cre, CD21 Atg5^{fl/-} CD21 cre. On the left, densitometric analysis of ATG5 staining (left) and of LC3-II (right) both relative to *ACTB*. Histograms represent the mean obtained on 4 independent individual mice and the bars stand for SD.

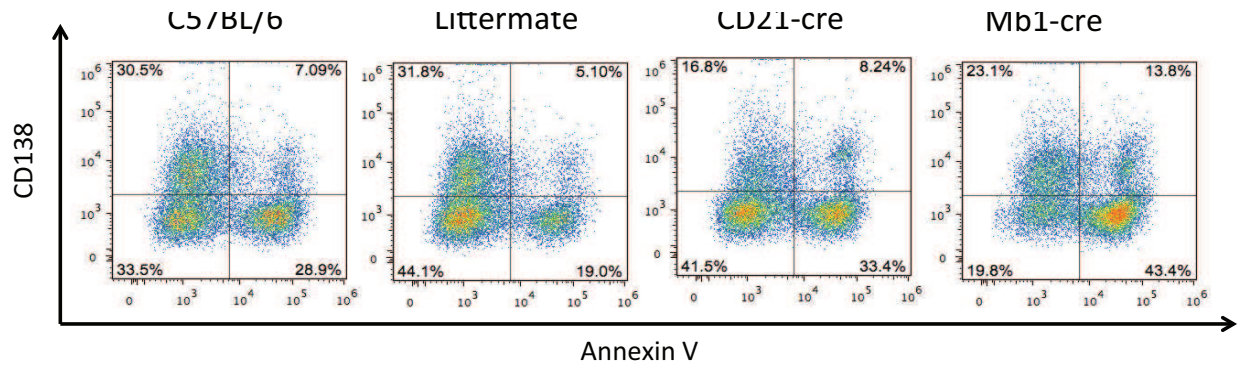


Figure EV2: normal upregulation of CD138 in mice deficient for autophagy in B cells

C57BL/6, CD21 Atg5^{f/f} CD21 cre littermate mouse, Atg5^{f/f} CD21 cre (CD21) and Atg5^{f/f} Mb1 cre (Mb1) were stimulated by LPS for 48h. Cells were stained by Annexin-V and anti-CD138 antibody, and analysed by flow cytometry.

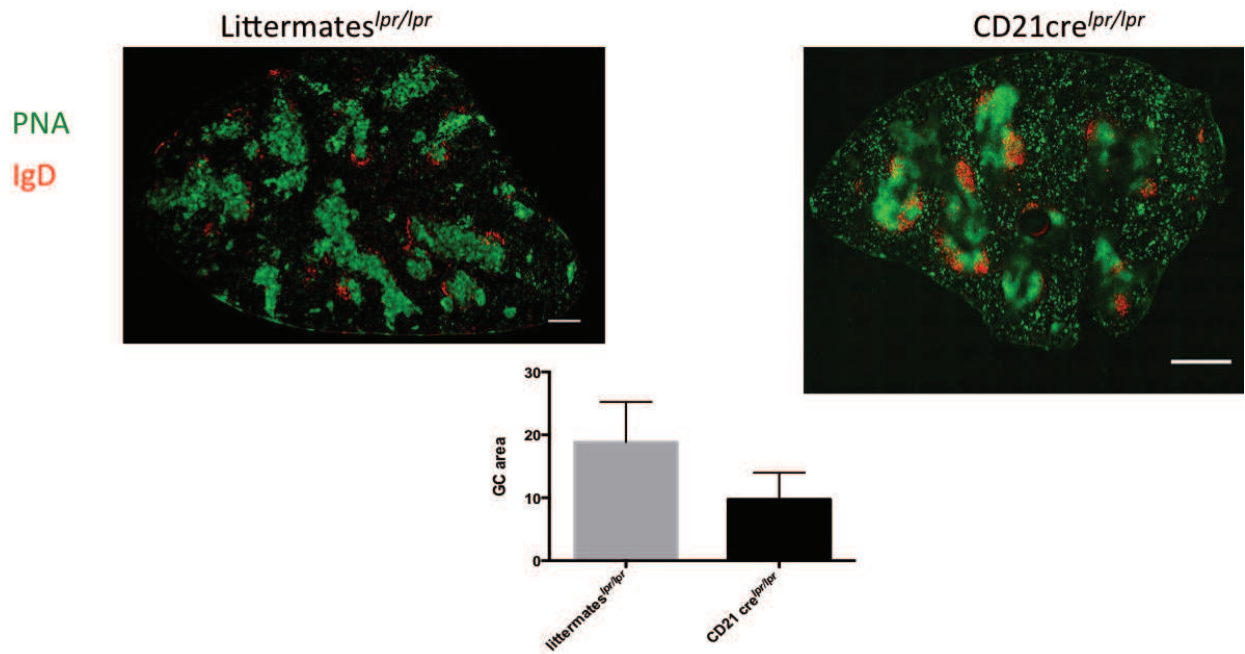


Figure EV3: normal generation of germinal centers in lupus-prone mice deficient for autophagy

Spleen sections obtained from $Atg5^{fl/-}$ CD21 cre mice (CD21 cre^{lpr/lpr}) and $Atg5^{fl/+}$ CD21 cre^{lpr/lpr} (littermates^{lpr/lpr}) were stained for PNA (green) and IgD (red). Staining overlay appears yellow. Sections were scanned by spinning disk confocal microscopy. The area of PNA⁺ zones was measured and normalized to the total area for each section. The histograms at the bottom show the mean of the relative GC area for n=4 CD21cre^{lpr/lpr} mice and n=5 littermate^{lpr/lpr} mice. No significant difference was found after Mann-Whitney U test comparison. The white bar represents 500 μ m.

2.3 Commentaires

Le processus autophagique propre aux LBs pourrait jouer un rôle déterminant dans le lupus. Les LBs autoréactifs, retrouvés au cours de la maladie lupique, peuvent se différencier en plasmocytes sécrétant des auto-anticorps formant des complexes immuns. Ces derniers se déposent dans les tissus, participent à l'inflammation induite par l'activation du complément et le recrutement de cellules immunitaires conduisant ainsi à l'apparition des symptômes lupiques.

Cette deuxième étude a permis de caractériser et de comparer deux nouveaux modèles murins transgéniques de délétion de l'autophagie spécifiquement dans les LBs à partir d'un stade immature ou mature (respectivement lignées $Atg5^{f/f-}$ Mb1cre et $Atg5^{f/f-}$ CD21cre). Dans ces deux souris, la répartition des sous-populations de LBs reste normale dans les organes lymphoïdes secondaires (OLS), à savoir la rate et les ganglions. En revanche une baisse du nombre de LBs dans les souris $Atg5^{f/f-}$ Mb1cre a été observée dans la rate, sans distinction d'une sous-population donnée. La grande efficacité de la délétion dans les LBs de ces souris peut expliquer la perte de ces cellules et souligne qu'un niveau basal d'autophagie reste nécessaire à la survie des LBs. Aucune altération de la fonctionnalité des LBs de type B2 n'a été observée en absence d'autophagie dans les LBs des deux souris. En effet, en réponse à une stimulation *in vitro* du BCR avec ou sans costimulation par un anticorps anti-CD40, les LBs déficients en autophagie isolés à partir des souris $Atg5^{f/f-}$ CD21cre prolifèrent normalement et ne montrent pas de défaut de survie en comparaison aux LBs compétents pour l'autophagie. En revanche, la stimulation au LPS dans les LBs, connue pour déclencher la différenciation en plasmablastes compromet la survie des LBs dans nos deux modèles de souris. Nous en concluons donc que ces deux modèles sont adaptés à une étude du rôle de l'autophagie dans les LBs *in vivo* étant donné qu'aucun défaut n'est observé à l'état basal et que la fonctionnalité *in vitro* n'est pas altérée.

Afin de définir le rôle de l'autophagie des LBs périphériques lors d'une réponse immune humorale, nous avons immunisé des souris $Atg5^{f/f-}$ CD21cre avec de l'ovalbumine (OVA) en présence d'adjuvant de Freund. Nous n'avons observé aucune différence significative de sécrétion d'anticorps anti-OVA de sous-type IgG. Par contre, nous avons noté une diminution de la sécrétion d'anticorps anti-OVA de sous-type IgM dans les souris dans lesquelles l'autophagie est délétée. Ce résultat peut être expliqué par une perte des plasmocytes à courte durée de vie (dans les organes secondaires) lorsqu'ils sont délétés en autophagie. Aucune différence dans le taux d'IgG ou d'IgM totales n'a été mise en évidence par méthode ELISA entre des souris dont

les LB sont compétents ou déficients pour l'autophagie. Nous pouvons émettre l'hypothèse selon laquelle les plasmocytes à longue durée de vie résistent à l'absence d'autophagie, un court moment avant d'avoir un défaut de survie et de sécrétion à long terme, comme nous l'avons montré dans les expériences sur un fond auto-immun.

Nous avons également généré des souris $Atg5^{f/-}$ CD21cre sur fond C57BL/6 lpr/lpr . Les souris C57BL/6 lpr/lpr développent une auto-immunité systémique dès l'âge de 6 mois. Les premières souris $Atg5^{f/- lpr/lpr}$ CD21cre étudiées ont présenté une proportion des sous-populations de LBs comparable à celle des souris contrôles possédant la mutation lpr et dont les LBs sont compétents pour l'autophagie. De manière intéressante, nous avons mis en évidence une diminution du nombre de plasmocytes médullaires dans les souris dont les LBs sont déficients en autophagie à long terme. L'hypergammaglobulinémie classiquement observée dans les souris C57BL/6 lpr/lpr est fortement réduite dans les souris $Atg5^{f/- lpr/lpr}$ CD21cre. De plus, la quantité d'auto-anticorps anti-ADN double brin est également réduite. Enfin, l'intensité du dépôt d'auto-anticorps au niveau rénal est atténuée en absence d'autophagie dans les LBs. Ceci suggère que l'autophagie intervient dans le maintien de l'immunité humorale à long terme, en particulier en condition d'inflammation chronique. Ceci pourrait être dû à un défaut d'activation des LBs face à certains antigènes et/ou à un rôle de l'autophagie dans la survie des plasmocytes à longue durée de vie comme suggéré dans un travail récent (Pengo *et al.*, 2013). La baisse de l'intensité de la réponse autoimmune pourrait également être liée à un défaut dans la réponse B mémoire comme suggéré par deux études du même laboratoire (Chen *et al.*, 2014b; Chen *et al.*, 2015). En accord avec les travaux précédemment rapportés, nous ne montrons pas d'effet significatif de la machinerie autophagique sur la constitution des CGs, c'est-à-dire sur l'activation initiale des LBs. Notons cependant qu'il est possible que dans le cas de l'autoimmunité systémique et dans les études publiées par les autres équipes, l'immunisation par différents types d'antigènes, en particulier des antigènes particuliers, pourrait requérir la machinerie autophagique à des stades précoces d'activation du LB.

3 Publication 3

ATG5 is required for the relocalization of lysosomes after B cell receptor engagement and for the subsequent presentation of immobilized antigens

Johan Arnold, Florent Arbogast, Diane Murera, Jean-Daniel Fauny, Sylviane Muller and Frédéric Gros

3.1 Avant-propos

Le troisième objectif de mes travaux de thèse a été focalisé sur l'impact potentiel de la machinerie autophagique dans l'activation précoce des LBs liée à la présentation antigénique. Nous avons entrepris l'étude de l'implication de la protéine ATG5 dans le trafic du BCR après son engagement et la présentation subséquente d'antigènes exogènes par les molécules du CMH II. Ce travail a été engagé en sachant que l'autophagie contribue, suite à l'engagement du BCR, à la relocalisation des vésicules d'internalisation vers les compartiments contenant le TLR9 (Chaturvedi *et al.*, 2008). Une étude avait aussi démontré une colocalisation des vésicules autophagiques ou des protéines de la machinerie autophagique avec les vésicules d'internalisation du BCR (Ireland and Unanue, 2011). Nous savions aussi que l'autophagie permet dans les LBs, comme dans les autres APCs d'antigènes endogènes, la présentation d'antigènes provenant du soi ou de microorganismes, sur les molécules du CMH (Dengjel *et al.*, 2005; Paludan *et al.*, 2005). Au début de cette étude, l'impact de l'autophagie dans la présentation d'antigènes exogènes, en particulier d'origine particulaire, par les LBs n'était donc pas connu. Les résultats de mes travaux sont décrits dans la **publication 3** (Arnold *et al.*) qui sera soumise très prochainement.

3.2 ATG5 is required for the relocalization of lysosomes after B cell receptor engagement and for the subsequent presentation of immobilized antigens

Johan Arnold¹, Florent Arbogast¹, Diane Murera¹, Jean-Daniel Fauny¹, Sylviane Muller^{1,2} and Frédéric GROS^{1,3,*}

¹CNRS, Immunopathology and therapeutic chemistry/Laboratory of excellence MEDALIS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, Strasbourg, France

² University of Strasbourg Institute for Advanced Study, Strasbourg, France

³ University of Strasbourg, Strasbourg, France

* *Corresponding author*

Abstract

Autophagy-related proteins (ATGs) are involved in the completion of the catabolic process autophagy. Some ATGs are also involved in intracellular trafficking. Autophagy or endocytic processes dependent on autophagy proteins, are implicated in providing respectively endogenous and exogenous antigens for presentation by MHC class II molecules. In B cells, although autophagy proteins are known to participate in endogenous antigen presentation, their role in exogenous antigen processing remains less described. By using primary mouse B cells deficient for the essential autophagy protein ATG5, we show that the latter protein contributes to the polarization of internalized BCR after stimulation, the recruitment of lysosomes and MHC-II molecules-containing compartments. The autophagy proteins LC3 and ATG16L1 are also recruited to the cluster. The polarization of B cells is particularly important for the acquisition of particulate antigens for B cells. We show *in vitro*, that ATG5 is required for the presentation of ovalbumin, when provided as an immobilized antigen, to cognate OT-II T cells. In contrast no effect of ATG5 deficiency in B cells was observed on the presentation of soluble antigens internalized via the BCR. We postulate that ATG5 and possibly autophagy facilitate the formation of the immune synapse, lysosomal trafficking and exocytosis to the synapse, necessary for particulate antigen uptake.

Introduction

Macroautophagy is a catabolic process, targeting to lysosomes cytoplasmic material through the formation of double membrane vacuoles. Macroautophagy plays multiple roles in the immune system, regulating inflammation, participating in the degradation of microorganisms and modulating adaptive immunity through its impact on lymphocyte homeostasis and activation (Deretic *et al.*, 2013; Gros and Muller, 2014).

Autophagy plays important roles in the homeostasis of T lymphocytes and in their activation (He *et al.*, 2012b). Autophagy in B cells is important for the survival of B-1b subtype (Miller *et al.*, 2008) and memory B cells (Chen *et al.*, 2014b; Chen *et al.*, 2015). Moreover autophagy is integral to the survival of plasma cells (Conway *et al.*, 2013; Pengo *et al.*, 2013).

Previous works investigating the specific role for autophagy in B cells, exclude an involvement of autophagy during the first steps of B cell activation. Indeed no major defect of germinal center (GC) formation after immunization with T-dependent antigens is observed in the absence of autophagy in B cells (Chen *et al.*, 2014b; Pengo *et al.*, 2013). According to these studies, autophagy is important for later stages of B cell development, i.e. for long-lived cells survival as memory B cells and plasma cells. However during the first steps of B cell activation, the B cell receptor (BCR) internalized after its engagement colocalizes with autophagic compartments, or at least with vesicles containing molecules of the autophagy machinery (Chaturvedi *et al.*, 2008; Ireland and Unanue, 2011). This suggests that in certain circumstances BCR trafficking and maybe B cell activation is regulated by autophagy. It has first been observed that autophagy allows relocation of endocytosed BCR toward TLR9 positive endosomes, enhancing BCR signal in response to nucleic acid containing antigens.

The internalization of the BCR is an important step for B cell activation as it allows the transport of cognate antigens to major histocompatibility complex (MHC) class II compartment (Mitchison, 2004). The antigen is then processed and loaded on MHC-II molecules to be potentially presented to cognate T cells, which will provide help for final differentiation of B cells. A role for autophagy in the presentation of certain types of antigens acquired through BCR engagement has been shown for citrullinated epitopes acquired after BCR internalization (Ireland and Unanue, 2011). The authors postulate that autophagy allows the relocation of the antigen acquired after BCR internalization, to peptidylarginine deaminase (PAD) containing compartments. PAD is the enzyme that mediates citrullination of peptide epitopes. Pharmacological inhibition of autophagy in B cells in these settings inhibits the presentation of citrullinated epitopes. However a small, non-explained decrease in antigen presentation has been observed for non-modified epitopes.

It thus seems that autophagy could be important for the presentation of certain types of antigens, maybe through the modulation of BCR trafficking. Several studies use small soluble model antigens that can be directly internalized after BCR cross-linking and be subsequently presented to T cells. It is suspected however that in several humoral immune reactions, the majority of antigens are large particulate antigens, presented at the surface of antigen presenting cells (APC) in secondary lymphoid organs (Yuseff *et al.*, 2013).

For an efficient loading onto MHC class II molecules, in that case, B cells must engage an immune synapse with the APC. The recognition of the antigen by the BCR then triggers the formation of this synapse (Batista *et al.*, 2001), characterized by the polarization of lysosomes and MHC-II molecules to the cell-cell contact region (Batista *et al.*, 2001; Yuseff *et al.*, 2011). Polarized B cells then release the lysosomal content in the intercellular space to facilitate antigen degradation, before internalization and loading onto MHC class II molecules (Thaunat *et al.*, 2012). Thus, B cell polarization may be more crucial for the presentation of large particulate antigens than small free soluble antigens.

In this work, we wanted to address the question of the role of autophagy in the trafficking of the BCR and of its impact on B cell activation. We observed that autophagy deficient B cells are unable to efficiently polarize the internalized BCR. We also observed that in autophagy competent cells several components of the autophagy machinery colocalize with the internalized BCR. We confirm the previously described relocalization of lysosomes toward the synapse (Yuseff *et al.*, 2011). Interestingly, several components of macroautophagy machinery are more generally involved in intracellular trafficking (Subramani and Malhotra, 2013) and autophagy *stricto sensu* is connected to the lysosomal compartment. We thus asked whether autophagy or its machinery could play a role in antigen presentation. Here, we show, in line with what is suggested by several previous reports (Chen *et al.*, 2014b; Ireland and Unanue, 2011; Pengo *et al.*, 2013), that autophagy is not necessary for soluble antigen presentation to T cells. However, the protein ATG5 seems integral to the extraction of immobilized antigens and to the subsequent presentation to cognate T cells.

Results

BCR trafficking is disturbed in the absence of ATG5

We first aimed at evaluating BCR trafficking in the absence of the essential autophagy gene ATG5. B cells were purified from wild type C57BL/6 mice and from two previously described mouse models with B cell specific deletion of ATG5: one with a deletion early during development (Mb1 cre *Atg5*^{f/f} mice, Mb1 cre) and one with a deletion only in mature B cells (CD21 cre *Atg5*^{f/f} mice, CD21 cre). B cells were also purified from littermate mice, obtained from the same breedings as CD21 cre or Mb1 cre as a second control. We then cross-linked the BCR with a polyclonal anti-IgM F(ab')₂ fragment antibody, linked to a fluorochrome (Figure 1A). In C57BL/6 and littermate B cells, as described early by others (Taylor *et al.*, 1971), we observe by confocal microscopy a concentration of internalized BCR at one pole of the cell. This phenomenon is called “capping” (Schreiner and Unanue, 1977). In contrast, when B cells are deficient for autophagy, in either CD21 cre or Mb1 cre B cells, even though BCR molecules are internalized, they do not form a massive cluster at one pole of the cell. The quantification of this trafficking profile shows that indeed, CD21 cre and Mb1 cre B cells maintain a high number of BCR spots, reflecting the absence of a major cluster (Figure 1B) in contrast to control B cells. Moreover the polarization index, reveals that internalized BCR remain scattered in B cells deficient for ATG5. Intense BCR polarization in control B cells corresponds to classical capping as BCR molecules are located in a more restricted angle formed at the center of mass of the cell. To confirm the potential role of ATG5 in BCR relocalization, we performed RNA silencing against ATG5, by infecting the human lymphoblastoid cell line BJAB, with shRNA-expressing lentiviruses. We first checked the efficacy of the silencing by Western blot and validated the decrease of ATG5 expression and the concomitant decrease in LC3-I conversion into LC3-II (supplementary figure 1A). We then stimulated ATG5-silenced B cells by anti-human IgM and compared BCR relocalization to control shRNA expressing cells. In control cells, as for mouse B cells, we observe a concentration of internalized BCR at one pole of the cell (supplementary figure 1B). When ATG5 expression is silenced, BCR clustering and polarization are less intense. Thus ATG5 favours the concentration and the polarization of internalized BCR molecules in both primary mouse B cells and in a human B cell line.

Autophagy machinery is mobilized upon BCR stimulation

As described by others, BCR can be relocalized to putative autophagic compartments (Chaturvedi *et al.*, 2008) or at least to vesicles containing proteins of the autophagy machinery (Ireland and Unanue, 2011). We then assayed if upon stimulation, BCR is recruited to vesicles containing ATG proteins. We thus stimulated the cells as described in the previous experiment, and co-stained the cells with anti-

LC3 (Figure 2A) or anti-ATG16L1 antibodies (Figure 2B). In both control and littermate mice, we observed a recruitment of LC3 and ATG16L1, together with the BCR in a polarized cluster. Quantitative analysis translates the reproducible progressive increase in LC3 (Figure 1B) and ATG16L1 (Figure 1C) colocalization with the internalized BCR in control B cells. In regard, both B cell types deficient for ATG5 (CD21 cre and Mb1 cre) fail to recruit ATG16L1 and LC3 together with the internalized BCR as only a very poor colocalization could be observed from the different experiments (not indicated in the figures reporting quantification studies). Thus in control B cells, BCR is internalized and integrated to polarized clusters that contain LC3 and ATG16L1 molecules. This relocalization is ATG5-dependent.

ATG5 plays a role in the relocalization of internalized BCR to MHC II containing vesicles

Antigens captured by the BCR are known to relocate to MHC class II compartments. Peptides derived from the antigens can then be presented for help by cognate CD4 T cells. Moreover previous work show a potential role for autophagy in the presentation of exogenous antigens captured via the BCR for citrullinated epitopes (Ireland and Unanue, 2011). We then assessed BCR trafficking toward MHC class II containing compartments. In control and littermate B cells, we observed a clustering of MHC-II molecules along with the internalized BCR (figure 3A). This phenomenon is reminiscent of what happens during the formation of the immune synapse between B cells and APC for the acquisition of particulate antigens (Batista *et al.*, 2001). In this cited work, Batista and colleagues suggest that the strong clustering of BCR by polyclonal anti-IgM antibodies can mimic the polarization of B cells occurring during their interaction with APC. In sharp contrast, in the absence of ATG5 in B cells, although some colocalization of internalized BCR can be detected, it remained lower than in control mice (Figure 3A and 3B). Moreover no polarization of MHC-II containing molecules could be observed in the absence of ATG5. Thus, ATG5 is involved in the coclustering and polarization of internalized BCR and MHC class II molecules, which occurs during the formation of the immune synapse.

ATG5 is involved in the presentation of particulate antigens

As different patterns of BCR/MHC-II colocalization were observed in B cells sufficient versus proficient for ATG5, we wanted to assess the presentation ability of B cells for antigens acquired after BCR internalization. We then produced anti-IgM F(ab')₂ fragment molecules covalently linked to the model antigen ovalbumin (F(ab')₂ OVA). Treating the cells with this compound, allows B cells to acquire the antigen after BCR binding. Then cocultures were performed with OT-II T cells, expressing a transgenic TCR specific for an epitope of ovalbumin. We performed two types of stimulation, one with F(ab')₂-OVA adsorbed on a maxisorp plate and the other one with the same conjugate provided in the culture medium in its soluble form. We could then mimic the acquisition of

a particulate antigen as described by Batista's team (Batista and Neuberger, 2000) with the adsorbed molecule, and compare our results to the presentation of soluble antigens. We found that control and littermate B cells were equally competent at acquiring OVA after BCR cross-linking, in either its adsorbed or soluble form, as shown by the measurement of OT-II cell proliferation (Figure 4A). ATG5-deficient B cells were also able to present antigen as efficiently as controls, when F(ab')₂-OVA was delivered as a soluble form. However we found a reproducible decrease in antigen presentation, for both B cells purified from CD21 cre and Mb1 cre mice, when the antigen was adsorbed on the plate (Figure 4A and 4B). This shows first that as described in the previous experiments, the intracellular colocalization between BCR and MHC-II containing vesicles after soluble anti-IgM stimulation may be sufficient to process the antigen for presentation to T cells. However ATG5, is required for the acquisition and/or processing of the adsorbed antigen. This suggests that ATG5 and possibly the autophagy machinery may facilitate the presentation of particulate antigens. We performed a preliminary experiment by immunizing control, CD21 cre or Mb1 cre mice with 3 μm beads covalently conjugated to ovalbumin (Figure S2). These beads cannot be endocytosed by B cells. This immunization protocol then requires an acquisition of the antigen through the presentation by APC, and extraction of the antigen from the beads. It was previously shown by others and us that immunization with a soluble antigen was, at short term, as efficient in mice with autophagy competent B cells as well as in those with autophagy deficient B cells, in terms of specific IgG secretion (Arnold et al, article 2 of the thesis and (Chen *et al.*, 2014b)). In contrast, our preliminary results show a total absence of anti-OVA IgG secretion in mice with B cells deficient for autophagy in comparison to littermate mice. These results have to be confirmed, but suggest that ATG5 and possibly autophagy is required for the presentation of particulate antigens but dispensable for the acquisition of soluble antigens.

ATG5 is necessary for the relocalization of lysosomes to the immune synapse

Thus ATG5 is required for the polarization of the BCR. This phenomenon is necessary for the relocalization of lysosomes toward the immunological synapse and for the extraction of particulate antigens from APC. We indeed identified a specific defect in the presentation of immobilized antigens to T cells when B cells are deficient for autophagy. We then evaluated lysosomal trafficking after BCR stimulation (Figure 5A). We performed LAMP-1 staining after BCR cross-linking at different time points. We first did not evidence any decrease in the number of discernable LAMP-1 stained spots during time (Figure 5B). We did not find any difference in the number of Lamp-1 spots either between control and ATG5 deficient B cells, suggesting that there is no difference in the number of lysosomes in the absence of ATG5. However, in the absence of ATG5 we found a reproducible decrease in BCR/LAMP-1 colocalization (Figure 5C). Moreover, as shown by the polarity index

calculation, in both CD21 and Mb1 cre B cells, lysosomes are more dispersed than in control B cells where they concentrate in the vicinity of the BCR cluster (Figure 5D). This shows that ATG5 deficiency compromises the relocalization and polarization of lysosomes toward the polarized BCR after cross-linking. As lysosome exocytosis at the immune synapse is necessary for the acquisition of particulate antigens, this could explain the lack of immobilized antigen presentation in the absence of ATG5 in B cells.

Discussion

In this work, we showed that the essential autophagy protein ATG5 was required for the polarization of internalized BCR upon cross-linking. These data are in line with previous reports showing that internalized BCR was recruited to vesicles with an autophagic morphology (Chaturvedi *et al.*, 2008). The authors in this work suppose that autophagy is required for the translocation of internalized BCR to TLR9 containing endosomes. Ireland and colleagues also show a colocalization of internalized BCR with the protein LC3 (Ireland and Unanue, 2011). Here, we confirm these results and extend the colocalization of the BCR with another autophagy protein, ATG16L1. Thus ATG5 regulates BCR trafficking after stimulation. ATG5 is involved in several mechanisms distinct from canonical autophagy. Relevantly in this context, endocytic processes in some settings require part of the autophagy machinery, such as LC3-associated phagocytosis. Thus we cannot formally conclude that autophagy *per se* regulates BCR trafficking but it seems probable that along with ATG5, LC3 and ATG16L1 are involved in BCR polarization.

Concomitantly with the polarization of the BCR, MHC-II containing vesicles and lysosomes are co-recruited to the observed capped cluster, reminiscent of the formation of the immune synapse between B cells and APC. This mechanism is particularly important for the acquisition of particulate antigens, and especially the membrane-bound ones. At the synapse, lysosomal content is exocytosed, facilitating the degradation of antigen preceding its internalization (Yuseff *et al.*, 2011). The proximity of MHC-II containing vesicles is then thought to contribute to the efficacy of antigen loading after acquisition via the BCR. Interestingly we found that ATG5 was particularly important for the presentation to T cells of immobilized antigens, mimicking particulate antigens presented by APC. No effect of ATG5 deletion was observed for antigens delivered in a soluble form. Although ATG5 is required for BCR clustering together with MHC-II and lysosomes at one pole of the cell, we observed in ATG5 deficient B cells an efficient BCR internalization and partial colocalization with MHC-II molecules. This suggests that though polarization of BCR is important for immobilized antigen presentation, it is optional for soluble ones that gain access to MHC-II compartment without optimal BCR clustering. This finding can be put in line with a recent report showing that PAR3 protein, involved in B cell polarization participates in the presentation of immobilized antigens, contrary to those internalized via pinocytosis (Reversat *et al.*, 2015).

This finding implies that in certain cases, ATG5 would be required *in vivo* for the presentation of antigens to T cells, and thus for the formation of GCs. This is in opposition with works published using mice with conditional deletion of ATG5 or ATG7 in B cells (Chen *et al.*, 2015; Pengo *et al.*, 2013). Both works exclude in their settings a role for autophagy in GC formation, thus rendering unlikely a role

for autophagy proteins in the presentation of antigens acquired via the BCR. However, the first work only uses soluble T-dependent antigens, which could explain, according to our results, the absence of effect on GC formation related to antigen presentation. The second work also uses soluble antigens and integrates experimental infection by influenza, leading to the same conclusion. We could still argue in that case that in both experimental immunization models, the formation of an immune synapse is not necessary for the acquisition of these types of antigens. Our preliminary results seem to show that in the case of particulate antigens covalently linked to beads that cannot be internalized by B cells, there is a reduction of specific IgG production in the absence of ATG5 in B cells. At that time point, after immunization with soluble antigens, the IgG response was largely normal (Arnold et al, paper n°2 of the thesis manuscript). These results have to be confirmed and a potential impairment of GC formation must be evaluated in the absence of ATG5 under particulate antigen immunization. Only then, one could make conclusions about an *in vivo* role of the autophagy machinery in the presentation of antigens acquired via the BCR.

One open question remains about the relevance of ATG proteins in BCR trafficking and in the formation of the immune synapse. Several proteins are involved in the polarization of the BCR as reviewed in (Yuseff *et al.*, 2013). Among them, the small GTPase Cdc42 allows the relocalization of lysosomes to the immune synapse (Yuseff *et al.*, 2011). A recent paper showed the major importance in Cdc42 in B cell biology (Burbage *et al.*, 2015). Among the numerous defects observed in B cells deficient for Cdc42, an inability in particulate antigen presentation to T cells was demonstrated, linked to a default in polarization. Interestingly, Cdc42 is also involved in the polarization of another cell type: the osteoclasts (Ito *et al.*, 2010). As for B cells, lysosomal secretion occurs at one pole of the cell, contributing to bone resorption. Moreover lysosomal secretion at the ruffled border, in these cells requires the autophagy proteins ATG5, ATG7, ATG4B, LC3 and Rab7 (DeSelm *et al.*, 2011). It thus seems that at least in osteoclasts, polarization driven by Cdc42 and lysosomal exocytosis mediated by autophagic proteins are linked. Ongoing experiments performed in the laboratory aim at showing that an ATG5-dependent process mediates lysosome exocytosis and extracellular antigen degradation.

The precise protein interaction relating BCR internalization and the recruitment of autophagy proteins also remain to be defined. It has been recently described, that the gap junction protein connexin 43 (Cx43) could interact at the plasma membrane with ATG16L1, modulating autophagy (Bejarano *et al.*, 2014). In B cells, Cx43 has been shown to be activated upon BCR stimulation and to facilitate B cell spreading (Machtaler *et al.*, 2011). It is thus tempting to speculate that autophagy proteins such as ATG16L1 might be recruited via Cx43 to facilitate lysosomal trafficking to the immune synapse.

In conclusion ATG5 and possibly other members of the autophagy machinery are involved in BCR trafficking and in the recruitment of lysosomes in polarized B cells. This phenomenon may be integral to the acquisition and presentation of particulate antigens as shown *in vitro* and possibly *in vivo*. If confirmed, this finding could include autophagy proteins as the major actors of GC formation in B cells and in the efficacy of humoral immune response against particulate antigens.

Material and Methods

Mice

CD21 cre $Atg5^{flox/-}$ (CD21 cre) and Mb1 cre $Atg5^{flox/-}$ (Mb1 cre) mice have been described (Arnold et al, paper n°2 of the thesis manuscript). Control mice used are wild type C57BL/6 mice and littermate mice from the same breedings than CD21 cre or Mb1 cre. Results obtained with littermate mice were pooled in the analysis. Mice were genotyped for the *Atg5* gene detected with the primers A (exon3-1), 5'-GAATATGAAGGCACACCCCTGAAATG-3'; B (short2), 5'-GTACTGCATAATGGTTTAACTCTTGC-3'; C (check2), 5'-ACAACGTCGAGCACAGCTGCGCAAGG-3'; D (5L2), 5'-CAGGGAATGGTGTCTCCAC-3' using PCR [94°C (4 min); 30 cycles of 94°C (30 sec), 60°C (30 sec), 72°C (1 min); 72°C (5 min)]. The CD21 cre transgene was detected with primers cre-F 5'-ACGACCAAGTGACAGCAATG-3'; cre-R 5'-CTCGACCAGTTTAGTTACCC-3' and for the cre Mb1 gene, cre-F 5'-ACCTCTGATGAAGTCAGGAAGAAC-3'; cre-R 5'-GGAGATGTCCTTCACTCTGATTCT-3' using PCR [94°C (4 min); 25 cycles of 94°C (30 sec), 60°C (30 sec), 72°C (1 min); 72°C (5 min)]. We genotyped mice with the REExtract-N-Amp™ Tissue PCR Kit (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). OTII mice were purchased from Harlan (Gannat, France). All mice were bred and maintained in accordance with guidelines of the local Institutional Animal Care and Use Committee (CREMEAS).

Cell culture and isolation

Spleen cells were collected from C57BL/6, littermate, B6 $Atg5^{flox/-}$ CD21cre and B6 $Atg5^{flox/-}$ Mb1cre, mice and B cells were purified by negative selection. Briefly, spleen cell suspensions were depleted from monocytes, granulocytes, T cells and NK cells using the Pan B cells isolation Kit (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) according to the manufacturer's instructions. Resulting TCR- β -/B220+ mouse B cell preparations were > 95% pure as determined by flow cytometry. Splenic OT-II cells were purified by negative selection. Briefly, spleen cell suspensions were depleted from monocytes, granulocytes, B cells and NK cells using Dynal T cell Negative Isolation Kit (Dynal-Life Technologies, 114-13D) according to the manufacturer's instructions. Resulting TCR- β +/B220- mouse T cell preparations were > 95% pure as determined by flow cytometry. We also used BJAB human Burkitt lymphoma cell line. All cultures were performed at 37°C, 5% CO₂ in RPMI 1640 medium (Lonza BioWhittaker, Basel, Switzerland) supplemented with 10% FCS, 10 μ g/mL gentamycin (Lonza BioWhittaker), 10 mM HEPES (Lonza BioWhittaker) and 0.05 mM β -mercaptoethanol (Lonza BioWhittaker).

ATG5 silencing in BJAB human B cell line

We have used pTRIP.CMV.GFP lentiviral vector for short hairpin RNA (shRNA) delivery. The construction of pTRIP-shATG5, pTRIP-shCtl and pTRIP-LC3/GFP was kindly provided by Pr. Christian Münz. Lentiviral particles were produced by transient transfection of 293T cells, with an encapsidation plasmid and a VSV envelope expression plasmid together with the pTRIP vectors. Viruses were then used to transduce $3 \cdot 10^5$ BJAB human B cells in the presence of polybrene (Sigma Aldrich). GFP-positive BJAB human B cells were sorted by flow cytometry with a FACS Aria cell sorter (BD Biosciences).

Flow cytometry

All Abs used for flow cytometry analyses were purchased from BD Biosciences, San Jose, CA: allophycocyanin (APC)-cyanine 7-labeled anti-mouse TCR- β (clone H57-597, 553171), APC-labelled anti-mouse CD44, or APC-labelled anti-mouse B220. Cells were incubated with fluorochrome-conjugated antibodies and in the case of mouse cell staining, rat anti-mouse CD16/CD32 monoclonal Ab (mAb, clone 2.4G2, 553142) was used to block Fc receptors, for 15 min at 4°C in phosphate-buffered saline (PBS) pH = 7.4 containing 2% (v/v) fetal calf serum (FCS). For the analysis of proliferation, cells were stained with CFSE carboxyfluorescein succinimidyl ester (CFSE ; Sigma) before the stimulation. Data were collected on a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter) and analyzed using FlowJo software (Tree Star).

Western immunoblotting

The Abs used for western immunoblotting were specific for ACTB (Santa Cruz Biotechnology, clone C4, sc-47778), LC3 (MBL, clone 51–11, ref M115–3) and ATG5 (Novus, Littleton, CO). In some conditions, lysosomal protease inhibitors E64d and pepstatin A (Sigma-Aldrich, P5318 and E8640) were added at 5 μ g/mL each. When indicated, cells were treated with goat anti-IgM F(ab')₂ fragment (5 mg/ml, Jackson Immunoresearch, WestGrove, PA). To evaluate the autophagosomal membrane load, whole cell proteins were extracted from cultured cells using Laemmli buffer (TRIS-HCl 125 mM pH 6.8; 2% (w/v) sodium dodecyl sulfate (SDS); 10% (v/v) glycerol; 5% (v/v) β -mercaptoethanol). Cell lysates were separated on 4-20% gradient gels (Biorad, Hercules, CA) and then transferred onto a polyvinylidene difluoride membrane. Membranes were blocked with PBS containing 0.1% (v/v) Tween 20 (PBS-T) and 3% (w/v) non-fat dry milk for 1h and then incubated overnight at 4°C with 1 μ g/mL anti-LC3 Ab in PBS-T containing 1% nonfat dry milk, or for 1h at room temperature (RT) with 1 μ g/ml anti-ATG5 Ab in PBS-T containing 1% nonfat dry milk. After washing with PBS-T, membranes were incubated for 30 min RT with goat anti-mouse IgG antibody (Jackson Immunoresearch). Signal was detected using enhanced chemiluminescence detection reagents (Immobilon Western Millipore,

WBKLS0500, Darmsatdt, Germany).

Anti-IgM/ovalbumin conjugate generation.

The anti-IgM F(ab')₂/ovalbumin conjugate (anti-IgM F(ab')₂/ova) is obtained by coupling a goat anti-mouse IgM F(ab')₂ (Jackson Immunoresearch) with ovalbumin (Sigma) by using the « Protein- Protein Conjugation kit» kit (S-9010-1, Solulink™, San Diego, CA). The coupling is done according to the manufacturer's protocol and lead to stable and covalent bis-arylhydrazone bonds between the two molecules.

Antigen presentation assays

100µL of F(ab')₂ goat anti-mouse IgM (10µg/mL ; 31172, Jackson immunoresearch), ovalbumin (10µg/mL ; Sigma) or of the anti-IgM F(ab')₂/OVA (at variable concentrations) are added in the wells of a MaxiSorp plate (MaxiSorp, Thermo Scientific Nunc, Rochester, NY), for adsorption. For experiments with the soluble anti-IgM F(ab')₂/ova, the conjugate is not adsorbed but directly added with B cells at a concentration of 10 µg/mL. 100µL of purified B cells (at a concentration of 10⁶ cells/mL) are added and incubated in RPMI medium for 4h at 37°C. OT-II T cells previously stained with CFSE accordingly to the manufacturer's protocol, are added in each well with an anti-CD28 Ab (5 µg/mL; 37.51 clone, BD Bioscience). Activation and proliferation of OT-II cells are observed 3 days later by flow cytometry.

OVA Beads conjugation

3 µm latex NH₂-beads (Polyscience, Eppelheim, Germany) were activated overnight with 8% glutaraldehyde overnight. Beads were washed with PBS and incubated overnight 4 hours with a solution of ovalbumin. Efficacy of the conjugation is evaluated by measuring the absorbance at 280 nm of the ovalbumin solution before and after the conjugation process. NH₂-remaining groups are then blocked by the addition of ethanolamine.

Immunization

Eight to twelve week-old mice were injected intraperitoneally (i.p.) on days 0 and 10, and bled on days 5 and 15 after the first immunization. Mice were injected with 5 µg soluble OVA or a suspension of beads-OVA corresponding to a protein load of 5µg (Sigma) in Alum (Sigma) for both injections.

Antibody detection by ELISA

IgG or IgM titers were measured in serum from immunized mice. To measure anti-OVA specific antibodies, 96-wells ELISA Maxisorp plates (NUNC, Denmark) were coated with OVA (10 µg/ml, Sigma) in 50mM sodium carbonate buffer (pH 9.6). The wells were blocked with PBS-0,1 % tween 20-

5% (w/v) milk for 1h at 37°C and incubated with diluted sera for 1 h at 37°C. HRP-conjugated anti-mouse isotype-specific antibodies (polyclonal antibodies purchased from Jackson Immunoresearch) were used as revealing antibodies. Absorbance was measured at 450 nm, after revelation with tetramethylbenzidine to the wells, and stop of the reaction by 1M HCl. Titers were determined as the last dilution giving an absorbance equal or superior to 0,2.

Immunostaining

Lab-Tek chambers slides (Thermo Scientific Nunc) are coated with a poly-L-Lysine solution (Sigma-Aldrich) diluted in ultra-pure water (Lonza Inc.) 0,02%(v/v) to enhance cellular adhesion. 500 000 splenocytes are added by chamber before incubation of the slides at 37°C for 30min. BCR is then stimulated with an F(ab')₂ anti-IgM coupled to an Alexa-647 (5µg/mL ; Goat anti-mouse polyclonal antibody 115-606-020 Jackson Immunoresearch). Cells are fixed in PBS-paraformaldehyde 2%(v/v) and washed in Tris-buffered Saline (TBS) before incubation in a permeabilization solution (TBS, Bovine Serum Albumine (BSA) 2%m/v, Triton 0,05%v/v) for 1 hour at RT. Primary anti-LAMP1 antibodies (2,5µg/mL ; Rabbit anti-mouse polyclonal antibody; ab24170Abcam, Cambridge, MA), anti-LC3 (1µg/mL Rabbit anti-mouse polyclonal antibody, NB100-2220, MBL International Corporation, Nanterre, France), anti-ATG5 (2,5µg/mL ; Rabbit anti-mouse polyclonal antibody, NB110-53818, Novus), anti-ATG16L1 (5µg/mL ; Rabbit anti-mouse polyclonal antibody, NB110-53818, Novus), biotinylated anti-I-A/I-E (2µg/mL ; mouse anti-mouse, 2G9 clone, BD Bioscience) are in some conditions added to the cell suspension in a TBS 1%BSA solution, overnight at 4°C. The staining is finalized by adding adapted secondary antibodies (2µg/mL ; Goat anti Rabbit coupled to an Alexa488 or 555 ; respectively A-11070 and A-21430, Molecular Probes, Rochester, NY) or streptavidin (2µg/mL ; coupled to an Alexa488 or 546 respectively S-11223 and S-11225, Molecular Probes). DAPI (*4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride*) is used for DNA staining (50µg/mL, D1306 , Molecular Probes) for 30min at RT. Slides are then mounted in Dako fluorescence mounting medium (S3023, Dako North America Inc., Carpinteria, CA), and observed under a confocal microscope (Zeiss Axio Observer Z1 lsm 700 Zeiss, Oberkochen, Germany) with adapted settings.

Quantification of spot numbers, polarization and colocalization

Cells were acquired using a 63x Plan Apochromat oil immersion NA1.4 objective and using a 7x zoom. Pictures were acquired with the same conditions (laser power and amplification gain). The focus was done at the median plane. Cells and spots were segmented using ImageJ Auto Threshold tools. This allowed us to individualize cells and to estimate the number of spots per cell. We used ImageJ macro and java languages to systemize this analysis.

Each cell was divided in 72 parts (each making an angle of 5 degrees) centered on the geometrical center of the cell. Sum of grey levels was done in each part for the staining of interest giving a list of 72 values that were then normalized by the sum of grey values in the whole cell. List of each cell was then centered to have the maximum intensity in the part 37 (middle part). This process was systematized in java language in ImageJ. Centered lists of comparable cells corresponding to each condition could then be added altogether. We obtained a graph for each condition that we could then fit these data to a Gaussian curve, which indicates the extreme angles of staining distribution, and then a polarization index.

We used the colocalization finder plugin in ImageJ for each cell. We determined the min and max grey values of spots for each channel and used these extreme values to calculate the Pearson coefficient. Cells whose Pearson coefficient was above 0.5 were considered as showing colocalization.

Statistical analyses

All data were analyzed with Prism software (GraphPad, San Diego, CA) using two-tailed unpaired t tests. Error bars represent SEM.

Acknowledgements

We thank Prof. Noboru Mizushima for the gift of Atg5^{ff} mice and Prof. Christian Münz for the gift of pTRIP-shAtg5, pTRIP-shCtl and pTRIP-LC3/GFP. This work was funded by the French Centre National de la Recherche Scientifique, the Laboratory of Excellence Medalis (ANR-10-LABX-0034) and the EquipEx program I2MC (ANR-11-EQPX-022), Initiative of Excellence (IdEx), Strasbourg University, and the Fondation Arthritis Courtin. Johan Arnold was a recipient of pre-doctoral fellowships from the Ministère de la Recherche et de l'enseignement supérieur and from Association de Recherche Contre le Cancer; Diane Murera of a pre-doctoral fellowship from the Fond National de Recherche of Luxembourg; Florent Arbogast of a pre-doctoral fellowship from the Ministère de la Recherche et de l'enseignement supérieur.

Author's contribution

JA and FG performed and designed experiments. DM, FA and JDF performed experiments. SM and FG designed experiments and wrote the article.

Author's contribution

The authors declare no conflict of interest.

Figures and legends

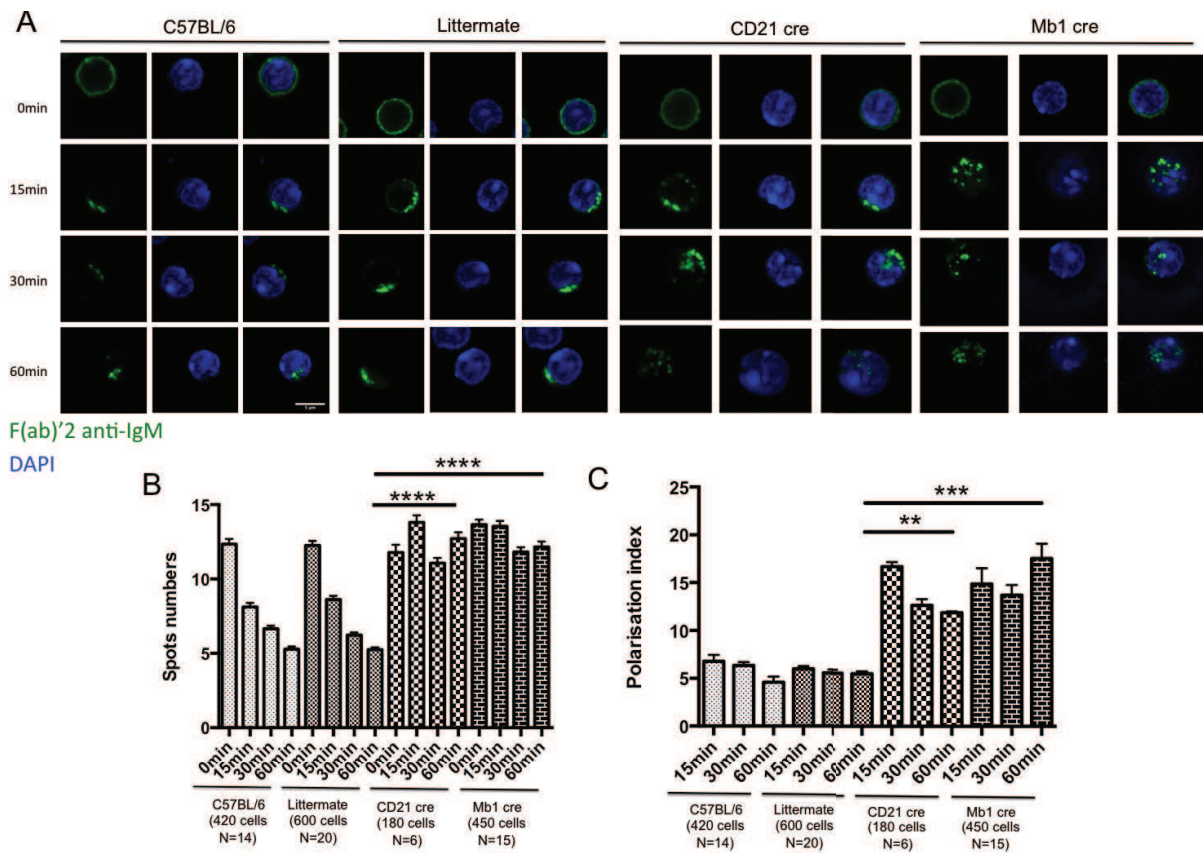


Figure 1 : ATG5 participates in BCR clustering and polarization

A. Analysis of BCR localization after various times of stimulation by an anti-mouse IgM (T = 0; 15; 30; 60 min) in B cells deficient for ATG5 (CD21cre and Mb1cre) or control B cells (C57BL/6/Littermates).

B. Quantification of the amount of BCR spots formed after stimulation of this receptor in deficient for ATG5 or control B cells, at various time points after BCR engagement. (Bars represent mean values per cell ± SEM ; ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 Student’s test)

C. Polarisation index of the BCR B cells after stimulation of this receptor in deficient for ATG5 or control B cells, at various time points after BCR engagement. The values represent the relative angle formed between the center of mass of the cell and the extremes of the staining distribution (Bars represent mean values per cell ± SEM ; ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 Student’s test)

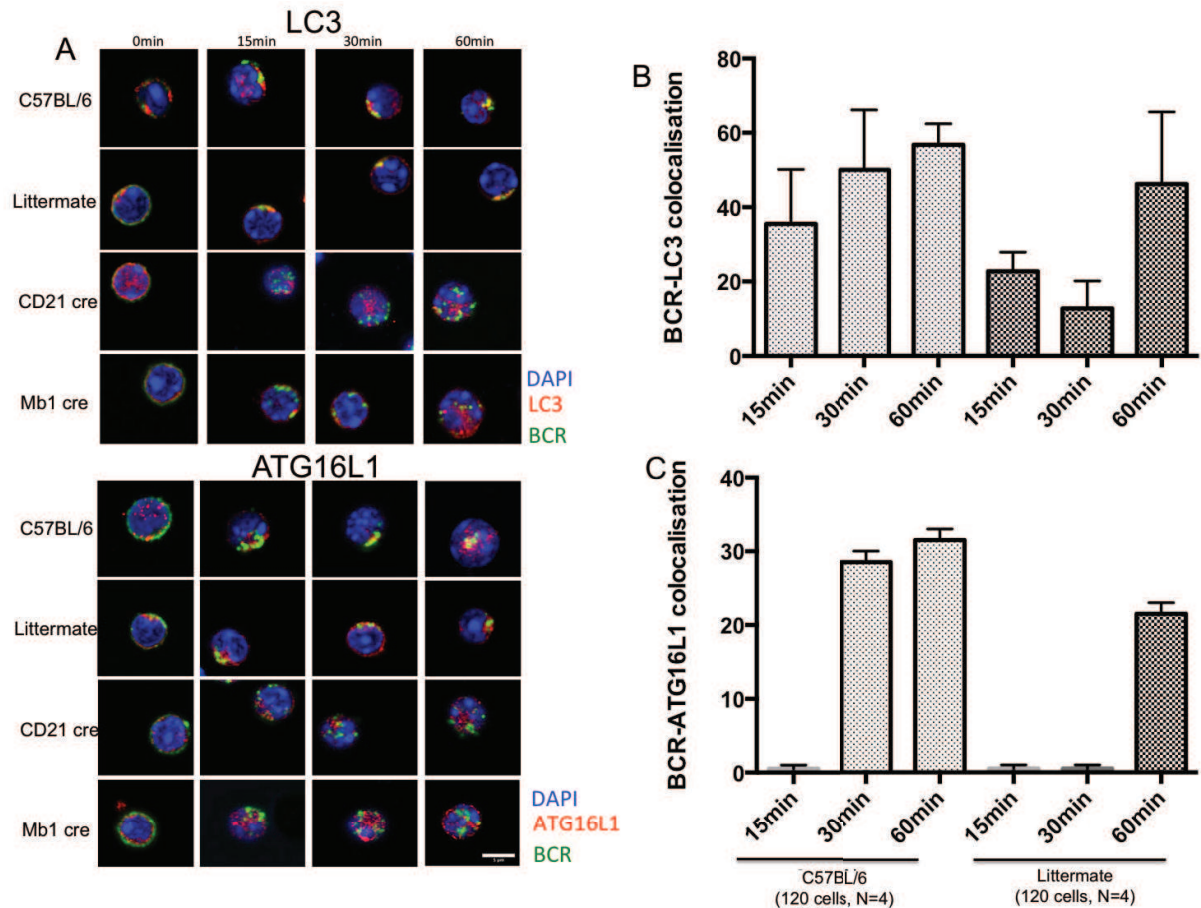


Figure 2 : LC3 and ATG16L1, colocalized with the internalized BCR

A. Analysis of BCR/LC3 localization at the top and BCR/ATG16L1 localization at the bottom after various time of BCR engagement (T = 0; 15; 30; 60 min) in B cells deficient for ATG5 (CD21cre and Mb1cre) or control (C57BL/6/Littermates).

B. Quantification of BCR and LC3 colocalization in deficient for Atg5 or control B cells, at various time points after BCR engagement. The percentage of colocalization was determined by considering the percentage of cells presenting a Pearson correlation coefficient comprised between 0,5 and 1. (Bars represent mean values \pm SEM ; ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 Student's test)

C. Quantification of BCR and ATG16L1 colocalization in deficient for Atg5 or control B cells, at various time points after BCR engagement. The percentage of colocalization was determined by considering the percentage of cells presenting a Pearson correlation coefficient comprised between 0,5 and 1. (Bars represent mean values \pm SEM of 5 independents experiments; ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 Student's test)

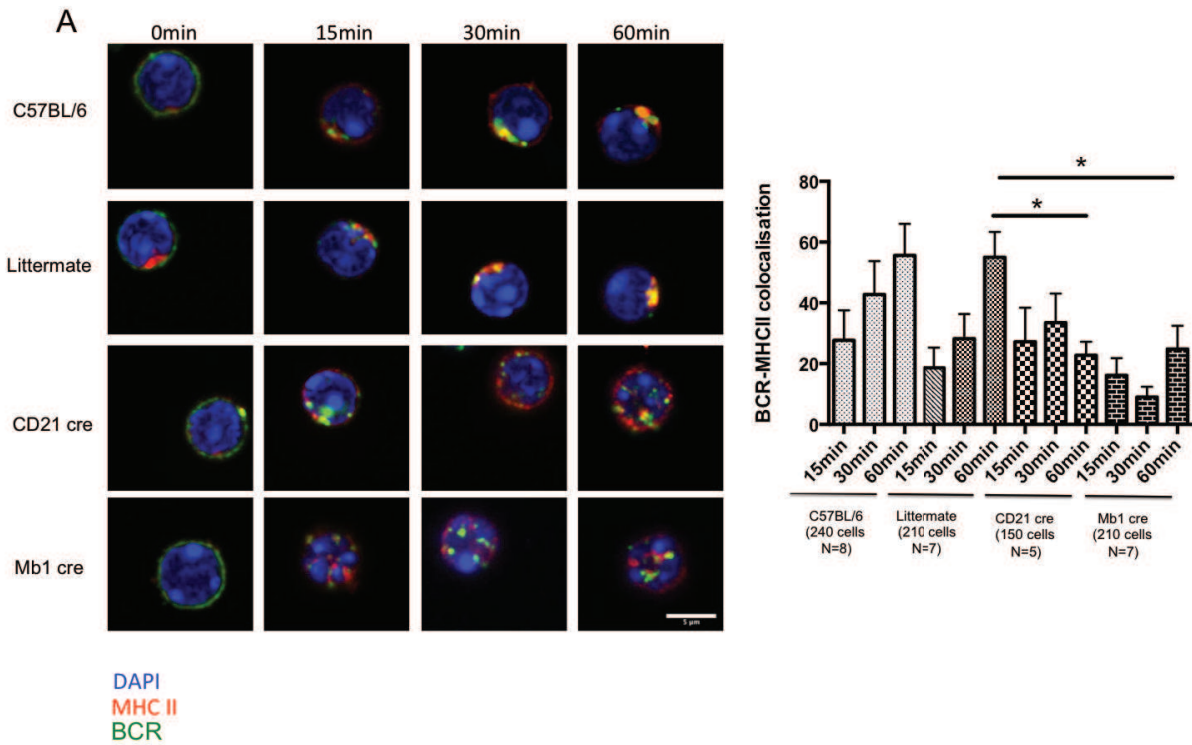


Figure 3 : ATG5 is involved in MHC-II molecules polarization up BCR stimulation

A. Analysis of BCR and MHC-II localization after various time of BCR engagement (T = 0; 15; 30; 60 min) in B cells deficient for ATG5 (CD21cre and Mb1cre) or control (C57BL/6/Littermates). On the right, quantification of BCR and MHC-II colocalization in control B cells or deficient for ATG5, at various time points after BCR engagement. The percentage of colocalization was determined by considering the percentage of cells presenting a Pearson correlation coefficient between 0,5 and 1. (Bars represent mean values \pm SEM ; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ Student's test)

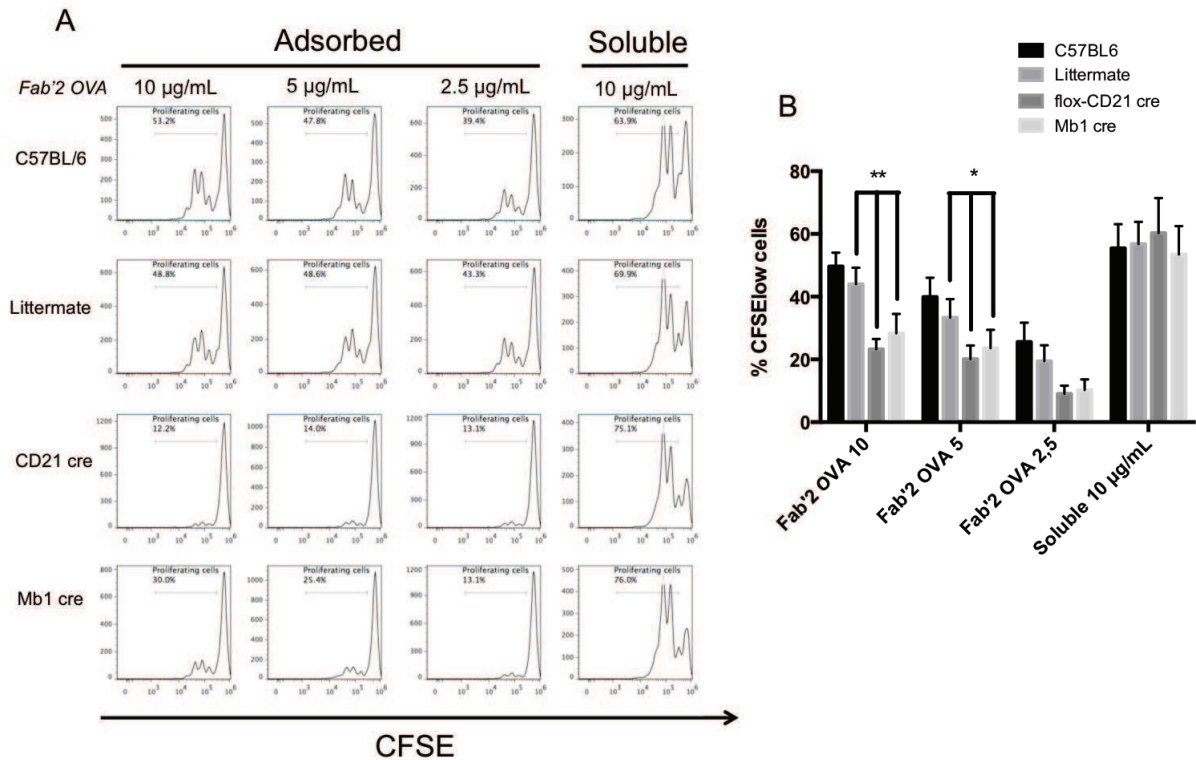


Figure 4 : ATG5 facilitates presentation of immobilized antigens acquired via BCR endocytosis

A. After co/culture with B cells deficient for ATG5 (CD21cre and Mb1cre) or control (C57BL/6/Littermates), OT-II cells were stained before culture with CFSE, and proliferation was assessed by measuring the dilution of the fluorescent signal by flow cytometry after 3 days of culture. Cells were gated on CFSE +/TCRβ+ cells and CD44 staining was performed to ensure that the decrease of CFSE staining correlated to the activation of OT-II cells. Percentages of proliferating cells OT-II cells are indicated in the histograms. B cells are stimulated by two different ways, the first one is an adsorbed antigen in different concentration (Fab'2 OVA, 10, 5, 2.5 ug/ml), the second one is a soluble antigen (Fab'2 OVA, 10ug/mL).

B. Means and SD of the percentages of proliferating cells obtained on n=10 independent experiments with presence of different concentration of the conjugate (10, 5, 2.5 ug/ml for the adsorbed antigen and 10 ug/mL for the soluble antigen). (Bars represent mean values ± SEM ; ***p<0,001, **p<0,01, *p<0,05 Student's test)

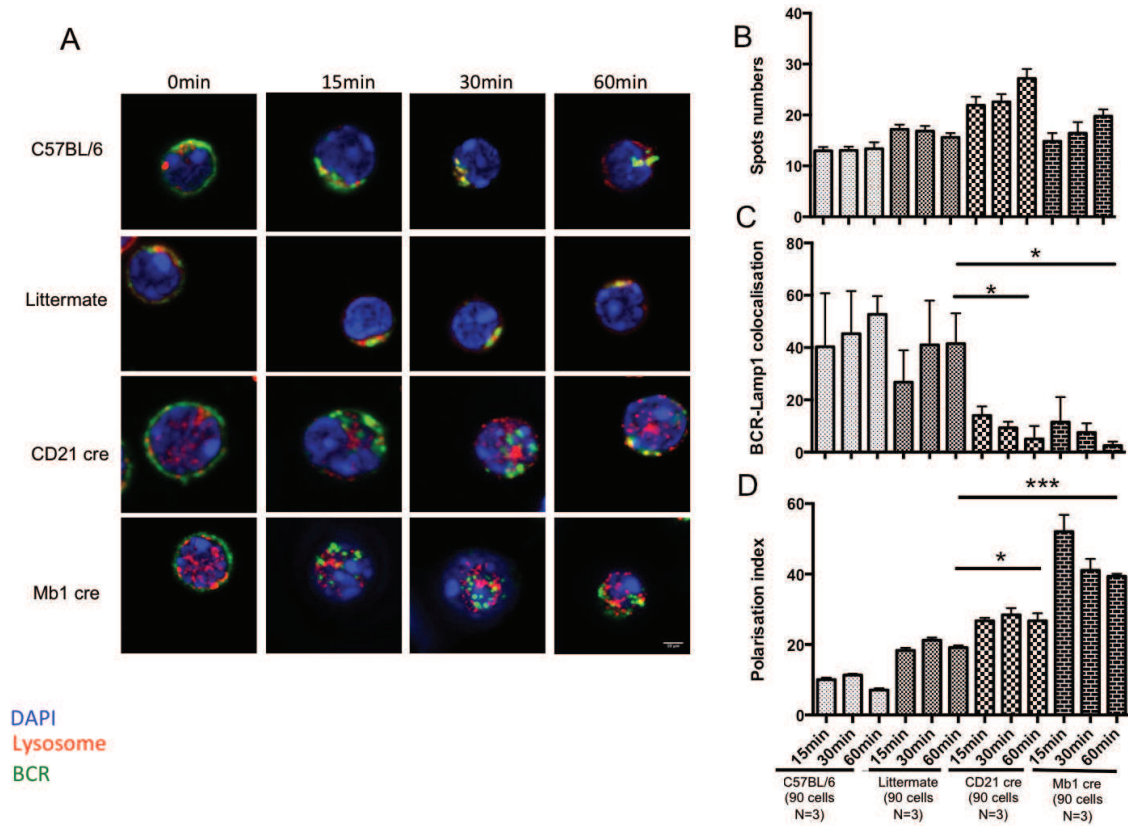


Figure 5 : ATG5 is implicated in the polarization of lysosomes after BCR cross-linking

A. Analysis of BCR and LAMP1 localization after various times of BCR engagement (T = 0; 15; 30; 60 min) in B cells deficient for ATG5 (CD12cre and Mb1cre) or control (C57BL/6/Littermates).

B. Quantification of the amount of LAMP1 spots formed in deficient for ATG5 or control B cells, at various time points after BCR engagement. (Bars represent mean values \pm SEM ; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ Student's test)

C. Quantification of BCR and LAMP1 colocalization in deficient for Atg5 or control B cells, at various time points after BCR engagement. The percentage of colocalization was determined by considering the percentage of cells presenting a Pearson correlation coefficient between 0,5 and 1. (Bars represent mean values \pm SEM ; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ Student's test)

D. Polarisation index of the LAMP1 B cells after stimulation of the BCR in deficient for ATG5 or control B cells, at various time points after BCR engagement. The values represent the relative angle formed between the center of mass of the cell and the extremes of the staining distribution (Bars represent mean values \pm SEM ; *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$, * $p < 0,05$ Student's test)

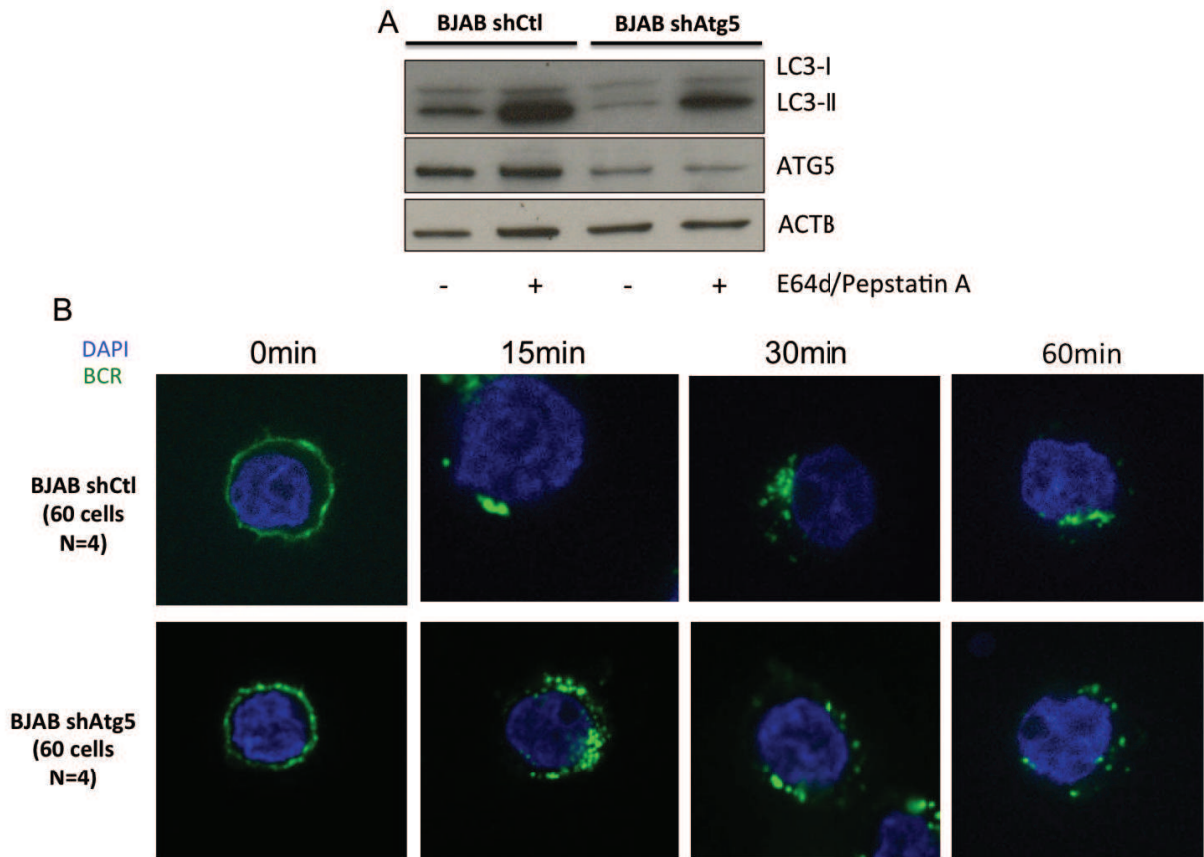


Figure S1 : ATG5 regulates BCR trafficking in human BJAB cell line

A. BJAB shCtl or BJAB shATG5 were generated. Lysosomal protease inhibitors pepstatin A and E64d were added (+) or not (-) in the indicated conditions. BJAB shCtl or BJAB shATG5 were not stimulated. Cells were lysed and immunoblots were performed against ATG5, LC3 and ACTB

B. Analysis of BCR localization after various times of stimulation (T = 0; 15; 30; 60 min) by an anti-human IgM in BJAB control cells expressing a non relevant shRNA (shCtl) or BJAB cells silenced for ATG5 expression (shATG5).

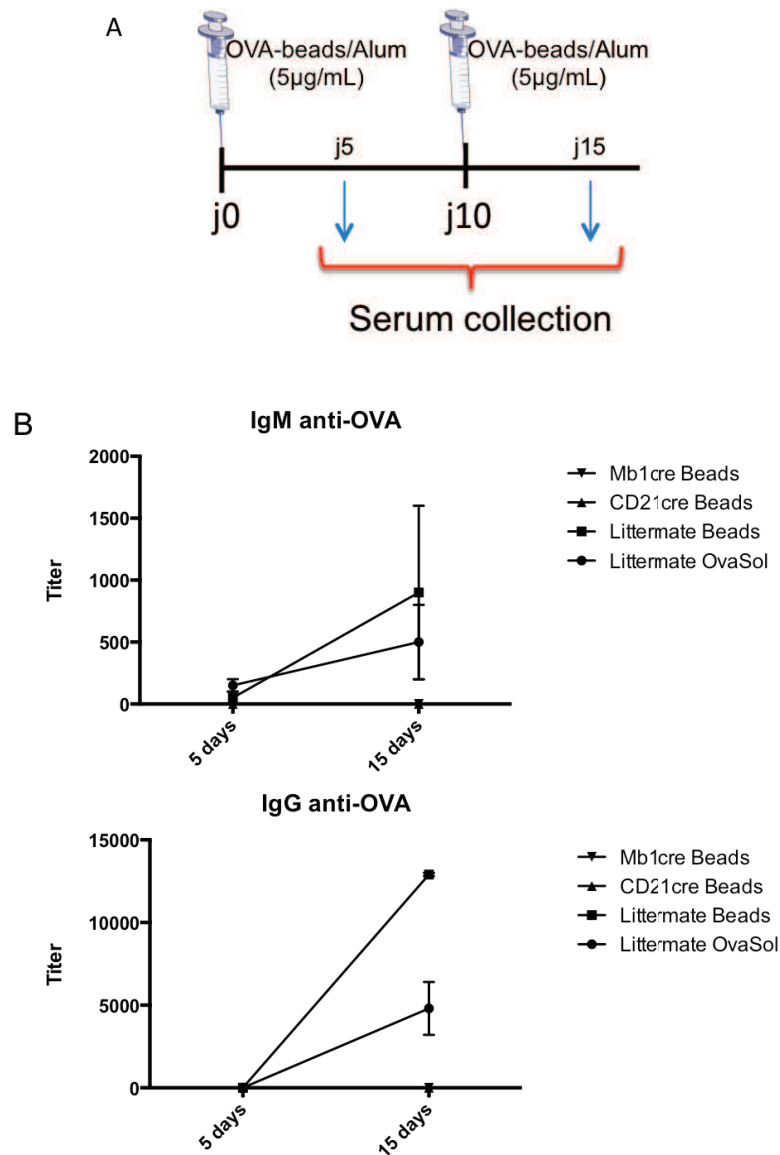


Figure S2 : ATG5 in B cells is necessary for the short term humoral immune response against T-dependent particulate antigens

A. Schematic representation of the immunization protocol used. Littermates, CD21cre, Mb1cre mice were injected intraperitoneal by soluble OVA (5µg) or OVA-beads (equivalent amount with 5 µg soluble OVA) in the presence of Alum at days 0 and 10. Serums were collected at days 5 and 15.

B. Measurement of anti-OVA IgM and IgG antibody titers in the serum from the immunized animals. Points represent the means and bars the SEM for n= 2 littermate mice OVA, n= 2 littermate mice OVA-beads, n=1 CD21cre mice OVA-beads and n=1 Mb1cre mice OVA-beads.

3.3 Commentaires

L'hyperactivation des LBs au cours du lupus peut être liée à l'engagement de récepteurs de l'immunité innée tels que les TLRs abaissant le seuil d'activation de la voie du BCR. L'autophagie joue un rôle dans la synergie des voies de signalisation du BCR et du TLR9 qui, d'ailleurs, a été associée au développement du lupus (Chaturvedi et al., 2008). L'autophagie permet en outre la présentation d'antigènes endogènes via les molécules du CMH II, alors que la voie initialement décrite de présentation par cette classe de CMH implique le chargement d'antigènes exogènes via la phagocytose. Ce mode d'apprêtement antigénique est décrit comme constitutif dans les cellules épithéliales thymiques et semble capital pour l'induction de tolérance centrale des LTs (Nedjic et al., 2008). Nous nous sommes donc ensuite intéressés à l'impact possible de l'autophagie sur la présentation antigénique du matériel internalisé par endocytose via le BCR. En effet, la machinerie autophagique, par le processus de LAP, est capable de favoriser la présentation d'antigènes exogènes par les molécules du CMH II dans un autre type d'APC, les macrophages. Enfin, l'autophagie dans les LBs est nécessaire à la présentation d'épitopes citrullinés d'antigènes internalisés par le BCR (Ireland and Unanue, 2011). Dans cette étude, les auteurs confirment une convergence du trafic intracellulaire du BCR avec la machinerie autophagique.

C'est pourquoi nous nous sommes engagés dans l'étude fondamentale de l'impact de l'autophagie sur le trafic du BCR dans le LB, sur sa polarisation et sur la présentation antigénique.

Cette étude réalisée dans deux modèles de délétion de l'autophagie spécifique aux LBs décrits dans la **publication 3**, montre que la protéine ATG5 joue un rôle déterminant dans le trafic du BCR, suite à l'engagement de ce dernier, en favorisant son regroupement spatial. Une relocalisation polarisée du CMH II, dépendante d'ATG5, a également pu être observée à la suite de l'engagement du BCR. Les différences de relocalisation du BCR et des molécules du CMH II, avec ou sans expression d'ATG5, peuvent avoir un impact direct sur la présentation antigénique. Dans l'étude citée précédemment (Ireland and Unanue, 2011), un faible impact négatif, non commenté, de l'inactivation de l'autophagie avait également été noté sur la présentation antigénique d'épitopes non citrullinés par les LBs. Dans ce travail, l'autophagie était inhibée par approche pharmacologique, moins spécifique, et n'affectant peut être que peu d'autres formes d'autophagie non-canonique. De plus, nous pouvons supposer que l'engagement du BCR par un antigène soluble nécessite peu la machinerie autophagique pour aboutir à la présentation antigénique par le CMH II. Dans notre cas, les expériences ont été menées par l'observation de l'internalisation de la relocalisation du BCR après avoir stimulé les LBs par un anticorps anti-IgM Fab'2 polyclonal, qui a la capacité de mimer partiellement la formation d'une synapse immunologique se formant lors de l'acquisition d'un antigène particulaire. Ce phénomène est appelé « capping » (Schreiner and Unanue, 1977; Taylor et

al., 1971).

De fait, nos résultats ne montrent aucune différence de présentation de l'antigène soluble aux LTs en absence ou en présence d'ATG5 dans les LBs. Il est à noter qu'une co-localisation partielle est observée entre le BCR et le CMH II, en absence d'ATG5 mais ce, de manière non polarisée. Ceci pourrait expliquer le faible impact de la délétion d'ATG5 sur la présentation d'un antigène soluble ayant, malgré tout, accès au CIIM après internalisation du BCR. Selon nos premiers résultats, la présentation d'un antigène immobilisé, mimant l'acquisition d'un antigène particulaire est, quant à elle, inhibée par l'absence d'ATG5, soulignant le rôle potentiel de la machinerie autophagique dans l'acquisition d'un antigène insoluble. Une présentation résiduelle est cependant observée. Ceci pourrait être dû à un relargage sous forme soluble du conjugué adsorbé au fil des trois jours de culture.

La rencontre du LB et de son antigène se fait principalement au niveau des OLS, au sein des follicules primaires. Dans les OLS, certains macrophages, cellules dendritiques conventionnelles ou folliculaires sont capables de présenter des antigènes particuliers sous la forme de complexes immuns ou d'antigènes recouverts de protéines du complément. Ces antigènes sont dégradés dans le domaine extracellulaire du LB, grâce à l'exocytose réalisée par des hydrolases lysosomiales, préalable à leur internalisation. Il est possible qu'ATG5 contribue à cette sécrétion lysosomale, ce qui expliquerait les différences observées en fonction de la nature de l'antigène. L'équipe d'Ana Maria Lennon-Duménil a montré qu'une stimulation du BCR induit la formation d'une synapse vers laquelle sont relocalisés les lysosomes (Yuseff *et al.*, 2011). Leur contenu est alors relargué dans le milieu extracellulaire au niveau de la synapse, permettant une dégradation extracellulaire d'antigènes particuliers de masse plus élevée ou intégrés à des membranes. Cette même équipe a démontré de plus que la protéine Par3 était impliquée dans la polarisation et la présentation d'antigènes particuliers contrairement aux antigènes internalisés par pinocytose (Reversat *et al.*, 2015).

La protéine LC3 constitue un candidat intéressant dans le mécanisme de recrutement des lysosomes. En effet, une étude du groupe de Johansen (Pankiv *et al.*, 2010) a démontré que LC3 était capable d'interagir avec la protéine FYCO1, elle-même interagissant avec des membres de la famille Rab. Cette interaction permet de relier les lysosomes et les vésicules autophagiques aux moteurs moléculaires (kinésine, dynéine) du réseau microtubulaire. Il est envisageable que suite à l'engagement du BCR, la protéine LC3 associée à certains partenaires moléculaires, dont ATG5, favorise le recrutement des lysosomes. Cette hypothèse permettrait d'expliquer la diminution de co-localisation de LAMP1 avec le BCR, observée en absence d'ATG5. LC3 interagit également avec Cdc42, une petite GTPase de la famille Rho (Chung *et al.*, 2012).

De manière intéressante, Cdc42 contribue à la polarisation des LTs, suite à l'engagement du TCR. La protéine kinase atypique ζ , un effecteur placé en aval de la voie de signalisation de Cdc42, est d'ailleurs impliquée dans la sécrétion polarisée des lysosomes, suite à l'engagement du BCR (Yuseff *et al.*, 2011). Une étude récente montre que Cdc42 est important dans la biologie dans les LBs puisque cette protéine joue un rôle central dans le cycle cellulaire. Il a été montré qu'une délétion de Cdc42 spécifiquement dans les LBs chez la souris engendre, outre de nombreux défauts de développement et d'homéostasie dans les LBs, un défaut de polarisation et de présentation d'antigènes particuliers.

Les protéines de la machinerie autophagique ont un effet sur le trafic lysosomal, ce qui permettrait d'expliquer nos résultats. Dans les cellules de Paneth (Cadwell *et al.*, 2008) ainsi que dans les ostéoclastes (DeSelm *et al.*, 2011), des études ont pu démontrer un impact de la machinerie autophagique sur le trafic des lysosomes vers la membrane plasmique et le fait que Cdc42 est impliquée dans ce mécanisme (Ito *et al.*, 2010). Dans les cellules de Paneth, ce phénomène permet la libération de peptides antimicrobiens (défensines, cathepsine G) contenus dans les lysosomes vers la lumière intestinale. Les ostéoclastes procèdent à l'exocytose des lysosomes afin de libérer dans le domaine extracellulaire des composants lysosomaux, tels que la cathepsine K et l'acide chlorhydrique, afin de dégrader la matrice osseuse. L'implication des protéines ATG5, ATG7, ATG4, LC3, Rab7 dans le trafic et la sécrétion des lysosomes dans le milieu extracellulaire a été démontrée. Le mécanisme, bien qu'incomplètement déterminé, semble impliquer une collaboration de la machinerie autophagique avec certaines protéines des voies d'endocytose/exocytose telles la dynamine. Corroborant cette hypothèse, nous avons pu observer une relocalisation d'ATG16L1 et LC3 suite à l'engagement du BCR.

ATG16L1 a été impliquée dans plusieurs phénomènes d'endocytose dont l'endocytose liée à la voie des clathrines. Le BCR étant endocyté par cette même voie, il est probable qu'ATG16L1 joue un rôle dans la formation des vésicules contenant le BCR et le CMH II. De plus, ATG16L1 interagit avec la connexine 43 (Bejarano *et al.*, 2014), une protéine impliquée dans la formation des jonctions communicantes interagissant elle-même avec le BCR (Falk *et al.*, 2014). Au sein des LBs, la connexine 43 est nécessaire et suffisante pour permettre le « spreading » du BCR après son engagement. Rap1 est activé suite à l'engagement du BCR et intervient également dans la polarisation des LBs. Or, la connexine 43 est nécessaire à l'activation de Rap1 (Machtaler *et al.*, 2011). Nous pouvons ainsi supposer que des composants de la machinerie autophagique, dont potentiellement ATG16L1 et LC3, soient en mesure de moduler les voies de ces GTPases, constituant ainsi un début de signalisation mise en place suite à l'activation du BCR.

Afin de vérifier l'implication des protéines LC3 et ATG16L1, nous souhaitons à l'avenir entreprendre des expériences de co-immunoprécipitation pour évaluer si ces protéines interagissent avec le BCR et/ou la connexine 43, cdc42 ou encore Rab7. Nous envisageons également de reproduire ces expériences sur des cellules de la lignée BJAB, une lignée lymphoblastoïde humaine, qui seraient traitées par des siARN, ciblant différents composants de la machinerie autophagique. Ceci permettrait d'identifier des partenaires potentiels d'ATG5 dans la polarisation du trafic du BCR et de ses partenaires. De plus, afin de valider l'absence de relocalisation des lysosomes en absence d'ATG5 comme causalité de la déficience en présentation antigénique d'antigènes particuliers, nous souhaitons entreprendre des expériences de dégradation antigénique, hors de la cellule, après engagement du BCR *in vitro*. Dans ces expériences, des LBs compétents ou non pour l'autophagie seront mis en culture avec un antigène adsorbé sur des plaques, mimant un antigène particulier. Après quoi, la quantité d'antigène adsorbé restant sur la plaque sera dosée et correspondra à la quantité proportionnelle inverse d'antigène « dégradé puis internalisée » par les LBs. Des expériences préliminaires ont montré que les LBs compétents pour l'autophagie parviennent à digérer une plus grande proportion d'antigène que les LBs déficients pour l'autophagie. Cette expérience encourageante doit être reproduite et renforcée par des données complémentaires.

Les questions soulevées par notre étude pourraient permettre ainsi de mieux comprendre l'initiation de la réponse humorale dans les OLS. Deux études récentes ont démontré l'implication de la machinerie autophagique dans la différenciation plasmocytaire (Pengo *et al.*, 2013) et la réponse B mémoire (Chen *et al.*, 2014b; Chen *et al.*, 2015). En revanche, et contrairement à ce que pourraient suggérer nos résultats, ces auteurs ne rapportent pas d'effet de la machinerie autophagique sur le fonctionnement des CG. Nous souhaitons maintenant évaluer *in vivo* la réponse immunitaire humorale face à des antigènes particuliers ne pouvant être endocytés par les LBs et nécessitant une digestion extracellulaire. Nos résultats préliminaires montrent une absence de production d'IgG anti-OVA par les souris dont les LBs sont déficients en ATG5, en réponse à une immunisation par des billes de 3 μm liées de manière covalente à l'ovalbumine. Ces résultats doivent être confirmés pour élargir le champ du rôle de l'autophagie dans les étapes précoces de l'activation des LB, liée à la présentation antigénique aux LTs et donc à la formation des CGs.

**CONCLUSIONS
ET
DISCUSSION**

Conclusions et Discussion

1 Historique de ma thèse

Je vous ai décrit tout au long de mon manuscrit que l'autophagie est un processus catabolique permettant la dégradation de composants cytoplasmiques dans des vésicules à double membrane fusionnant à terme avec les lysosomes (Feng *et al.*, 2014). Au-delà de son rôle dans la résistance au stress énergétique, l'autophagie intervient de manière essentielle dans de nombreuses fonctions vitales de la cellule. Entre autres, dans le SI (Deretic *et al.*, 2013), l'autophagie est indispensable au bon fonctionnement de l'immunité adaptative de par son rôle dans l'homéostasie lymphocytaire B et T ainsi que dans la présentation antigénique.

Lors de mon arrivée en 2010 pour mon stage de Master 2, l'équipe étudiait notamment l'étiologie d'une maladie auto-immune, le LED. Cette pathologie inflammatoire chronique et systémique est caractérisée par la production d'auto-anticorps dirigés majoritairement contre des composants nucléaires. Il s'avère que des polymorphismes du gène *ATG5*, gène indispensable à l'initiation de l'autophagie, ont été associés à une susceptibilité au développement de la maladie lupique (International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus *et al.*, 2008). De plus, des molécules thérapeutiques utilisées en thérapie comme l'hydroxychloroquine (Lee *et al.*, 2011), ou encore le peptide P140, découvert au laboratoire et actuellement en phase avancée d'essais cliniques (Macri *et al.*, 2015; Page *et al.*, 2011b; Zimmer *et al.*, 2013), ont un impact inhibiteur sur l'activité autophagique.

Au début de notre projet, aucune étude n'était encore publiée sur l'implication de l'autophagie dans le LED. Le travail de recherche que nous avons réalisé avait tout d'abord pour but de définir si l'autophagie était dérégulée au cours du LED, en particulier au niveau des lymphocytes, cellules centrales dans la physiopathologie de la maladie. Ce n'est que par la suite que nous avons cherché à comprendre le rôle de l'autophagie, au sens plus large, c'est à dire dans les réponses immunes humorales normales et pathologiques.

La première partie de ce travail a permis de montrer que l'autophagie était dérégulée dans les LTs de modèles murins de lupus et de patients atteints de LED (Gros *et al.*, 2012). Une augmentation de la quantité de compartiments autophagiques a été confirmée par d'autres études (Alessandri *et al.*, 2012; Clarke *et al.*, 2014; Talaber *et al.*, 2014). Par la suite, un article publié par un autre laboratoire

a, quant à lui, décrit une dérégulation de l'autophagie dans les LBs lupiques, provenant de patients ou de modèles murins (Clarke *et al.*, 2014). Ainsi, il paraît possible que la dérégulation de l'autophagie favorise la survie de LTs et LBs autoréactifs au cours du lupus. Les données publiées récente de l'équipe étayent le fait que la CMA est partiellement augmentée dans les LBs de souris MRL^{lpr/lpr}.

A la suite de ces travaux, nous avons pris la décision de chercher à mieux comprendre le rôle de l'autophagie dans les réponses humorales normales et pathologiques. Pour cela, nous avons produit trois modèles murins conditionnels délétant l'autophagie spécifiquement dans les LTs matures (utilisant la recombinaison Cre exprimée sous le contrôle du promoteur distal Lck) ou dans les LBs (utilisant la Mb1Cre ou la CD21Cre comme décrit précédemment). Ces deux modèles ont été générés, sur un fond génétique normal, C57BL/6 ou pathologique, C57BL/6^{lpr/lpr}. A ce stade, deux sujets de recherche se distinguaient, à savoir : poursuivre la compréhension du rôle de l'autophagie dans les LTs au cours du lupus ou aborder un nouveau projet plus large sur l'étude de l'autophagie dans les LBs en contexte normal ou pathologique.

En ce qui concerne les LTs, il a été montré que l'autophagie est induite suite à l'activation du TCR. Néanmoins, les mécanismes exacts conduisant à une augmentation de cette activité, notamment observés au cours de la maladie lupique, ne sont pas encore très bien compris. De ce fait, ce projet visait d'une part à cibler les voies de signalisation induites suite à la stimulation du TCR et leur éventuel rôle dans l'induction de l'autophagie, et d'autre part à évaluer l'effet de l'autophagie sur le phénotype général des LTs. Pour cela, le moyen le plus direct d'évaluer précisément si l'autophagie participe à la mort ou à la survie des LTs autoréactifs est la génération de modèles murins transgéniques de délétion tissu-spécifique (C57BL/6^{lpr/lpr} atg5^{ff} dLckcre). L'avantage de l'utilisation du promoteur dLck au lieu du promoteur CD4 ou Lck proximal, permet d'invalider l'autophagie seulement dans les T matures, contrairement aux stratégies précédentes qui permettait l'inactivation des LTs immatures pendant leurs développements. Nous souhaitons de ce fait pouvoir étudier *in vivo* le comportement des LTs matures avec moins de défauts potentiels liés à l'absence d'autophagie au cours du développement. L'analyse de ces souris nous permet actuellement d'évaluer le rôle réel de l'autophagie dans la survie et l'activation des LTs *in vivo*, en conditions normale, sur fond C57BL/6 et autoimmune grâce au fond C57BL/6^{lpr/lpr}.

En ce qui concernait le rôle de l'autophagie dans les LBs, peu de chose étaient connues sur l'impact *in vivo* de l'absence d'autophagie. Une seule étude montrait que l'autophagie pourrait être induite suite à l'activation du BCR (Watanabe *et al.*, 2008) et une autre étude démontrait que l'autophagie est nécessaire à la survie de la sous-population B1a et au cours du développement pour la transition

du stade pro-B au stade pré-B (Miller *et al.*, 2008). De plus, l'autophagie était décrite comme jouant un rôle dans la synergie des voies de signalisation du BCR et du TLR9 (Chaturvedi *et al.*, 2008).

Bien que le sujet sur les LTs paraissait être la suite logique de mon projet de Master 2, j'ai choisi de m'orienter sur l'étude de l'impact de l'autophagie dans les LBs, souhaitant me pencher en particulier sur les problématiques de trafic intracellulaire du BCR et les aborder par des méthodes d'imagerie. J'ai néanmoins participé à la suite du projet traitant de la biologie des LTs, projet repris par une doctorante de l'équipe.

La suite de mon travail de thèse s'est alors concentrée spécifiquement sur l'autophagie dans les LBs. Nous avons généré des modèles murins transgéniques permettant l'inactivation de l'autophagie spécifiquement dans les LBs à différents stades de leur développement, dès le stade pro-B dans la moelle osseuse ou seulement à partir du stade mature. Ces souris ont été générées d'une part sur un fond génétique non pathologique, le fond C57BL/6 et d'autre part, sur un fond auto-immun, C57BL/6^{*lpr/lpr*} possédant la mutation *lpr*. Cette mutation entraîne une dysfonction de la protéine FAS et conduit à une rupture de tolérance. Ainsi, ces souris présentent, dès l'âge de 6 mois des signes d'auto-immunité : hypergammaglobulinémie, taux élevé d'anticorps anti-nucléaires, dépôt d'immunoglobulines au niveau des reins.

Durant mes premières années de thèse, nous avons pu caractériser et comparer ces deux nouveaux modèles murins transgéniques de délétion de l'autophagie spécifiquement dans les LBs à partir d'un stade immatures et matures, les modèles *Atg5^{f/-} Mb1cre* et *Atg5^{f/-} CD21cre*, respectivement. Au début de ces travaux, un seul modèle de délétion de l'autophagie spécifique des LBs était connu, à savoir le modèle *Atg5^{ff} CD19cre*. Ce modèle ne présente qu'une délétion partielle de l'autophagie. Nous avons d'ailleurs également rencontré le problème d'une délétion partielle du gène au tout début des croisements avec les souris *Atg5^{ff} CD21cre*. En effet, ces souris présentaient encore une activité autophagique détectable dans les LBs, évaluée par immuno-empreintes des protéine ATG5 et LC3. Nous avons alors adopté une autre stratégie de délétion où l'un des allèles d'*Atg5* est constitutivement déficient alors que l'autre allèle est flanqué de séquences loxP. Cependant, même avec cette stratégie, la souris *Atg5^{f/-} CD21Cre* présente encore un niveau de LC3-II résiduel dans certains cas. De ce fait, le contrôle de la délétion de ces souris par immuno-empreinte a été systématique au cours de toutes les expérimentations. Pour le modèle de délétion précoce, nous avons procédé avec la même stratégie, à savoir croiser la souris *Atg5^{f/-}* avec une souris *Mb1cre*. Dans ce modèle, les protéines ATG5 et LC3-II sont de manière reproductible indétectables par immunoempreinte. Contrairement à ce qui a été montré par l'équipe de Heather Pua sur les souris chimères greffées au stade embryonnaire avec des cellules hématopoïtiques déficientes pour ATG5, nous avons pu montrer par nos deux modèles transgéniques que l'autophagie n'est pas

indispensable aux étapes précoces de développement des LBs. Il semble donc possible que les défauts de développement, décrits dans les travaux précédents soient dûs à un rôle plus précoce de l'autophagie au cours de l'hématopoïèse, fragilisant les précurseurs des cellules B en absence d'ATG5. En revanche, il semble qu'un niveau basal d'autophagie soit nécessaire pour maintenir un nombre normal de LBs matures comme le montrent les données obtenues avec la souris Mb1cre.

Afin de définir le rôle de l'autophagie dans la capacité des LBs périphériques, à établir une réponse humorale, nous avons immunisé des souris $Atg5^{f/f-}$ Mb1cre et $Atg5^{f/f-}$ CD21cre avec de l'OVA en présence d'adjuvant de Freund. Nous avons observé une diminution de la sécrétion d'anticorps anti-OVA, de type IgM, en absence d'autophagie dans les LBs. Ce phénomène est probablement lié à un défaut de survie des plasmocytes à courte durée de vie. A court terme, il apparaît que les sécrétions d'IgG anti-OVA sont, quant à elles normales, suggérant que l'autophagie n'est pas impliquée dans l'activation initiale des LBs face à un antigène T-dépendant impliquant leur passage dans les CGs. Cela explique pourquoi la commutation de classe n'est pas affectée. Nous avons alors étendu l'étude des réponses humorales à plus long terme et cela dans un modèle auto-immun.

Au début de ce projet, aucune publication ne décrivait l'impact de l'autophagie sur les plasmocytes à longue durée de vie ou LB mémoire. Le modèle murin C57BL/6^{lpr/lpr} développe une auto-immunité systémique. Nous n'observons aucune différence significative en présence ou en absence d'autophagie dans la survie des LBs et dans la formation des centres germinatifs. En revanche, la déficience en autophagie dans les LBs de souris C57BL/6 $Atg5^{f/f-}$ lpr/lpr CD21cre aboutit à une diminution de l'hyper-gammaglobulinémie et de la sécrétion d'anticorps anti-ADN double brin par rapport aux souris contrôles C57BL/6^{lpr/lpr}. De plus, nous avons mis en évidence une diminution du nombre de plasmocytes médullaires à longue durée de vie dans ces mêmes souris ainsi qu'un dépôt d'IgG au niveau des glomérules rénaux moins important. Il semble donc que la survie des plasmocytes à longue durée de vie soit compromise en absence d'autophagie et tout particulièrement dans un modèle auto-immun chronique de sécrétion d'auto-anticorps. Ces données corroborent aux articles parus récemment à ce sujet (Conway *et al.*, 2013; Pengo *et al.*, 2013). Nos résultats suggèrent donc un rôle préférentiel de l'autophagie dans la survie des plasmocytes par rapport à une influence dans l'activation initiale des LBs face à des antigènes solubles ou aux autoantigènes testés dans le modèle auto-immun C57BL6^{lpr/lpr}.

En parallèle de ces travaux, la littérature suggérait cependant que le BCR internalisé peut colocaliser avec des structures de types autophagiques et avec la molécule LC3. Il était donc possible que dans certaines circonstances, l'autophagie soit impliquée dans les étapes précoces d'activation des LBs après stimulation du BCR. A ce jour, aucune étude ne démontre une implication de l'autophagie dans les étapes précoces d'activation des LBs liée au le trafic du BCR ou dans la présentation antigénique,

hormis dans le cas des antigènes citrullinés. Nous avons donc cherché à approfondir, durant mes derniers mois de thèse, nos connaissances du rôle de l'autophagie dans le trafic du BCR et dans l'activation subséquente des LBs.

Nous avons tout d'abord observé qu'en condition de stimulation du BCR *in vitro* les LBs compétents pour l'autophagie présentent un rassemblement et une polarisation des molécules de BCR internalisées. Au contraire, les LBs issus de souris *Atg5^{f/f}-CD21* ou *Atg5^{f/f}-Mb1cre* internalisent le BCR mais sans polarisation notable. De plus, nous avons observé que des partenaires connus d'ATG5 pourraient être impliqués dans les différents phénomènes observés. Suite à l'engagement du BCR, deux protéines capitales dans l'initiation de l'autophagie, à savoir LC3 et ATG16L1 colocalisent avec le BCR internalisé, ce qui n'est pas le cas pour les LBs déficients en autophagie. Il semble donc que plusieurs composants de la machinerie autophagique participent au trafic intracellulaire du BCR.

Nous avons cependant noté une colocalisation, bien que plus faible, des molécules de BCR internalisées avec les molécules du CMH II, en absence d'autophagie dans les LBs. En revanche, les compartiments contenant des molécules du CMH de classe II n'étaient pas polarisés en absence d'ATG5, de la même manière que le BCR et les autres marqueurs étudiés. Nous nous sommes donc intéressés au rôle de l'autophagie dans la présentation antigénique d'antigènes exogènes, capturés par le BCR.

Nous avons alors testé la présentation d'antigènes exogènes internalisés via le BCR. Aucune différence de présentation antigénique n'a été observée pour des antigènes solubles. En revanche, nous avons noté que l'absence d'autophagie dans les LBs compromettait la présentation d'antigènes exogènes adsorbés sur une surface, situation expérimentale mimant l'acquisition d'antigènes particuliers. Nous émettons donc l'hypothèse que la machinerie autophagique contribuerait à la formation de la synapse immunologique liée à la capture d'antigènes particuliers par les LBs.

De plus, des travaux précédents avaient montré que les lysosomes sont relocalisés vers la région de polarisation du BCR après son engagement dans les LBs normaux. Notre étude a démontré que ce n'est pas le cas pour les LBs déficients en autophagie. Nous pouvons émettre l'hypothèse qu'en absence d'ATG5, la relocalisation des lysosomes est compromise. Cette relocalisation étant un phénomène important pour l'internalisation d'antigène particulaire, pourrait être la raison du déficit de présentation de ce type d'antigène aux LTs.

Nous cherchons actuellement l'impact *in vivo* d'un tel rôle de l'autophagie. Dernièrement, nous avons testé la présentation d'antigènes exogènes particuliers *in vivo* suite à l'immunisation de nos souris transgéniques avec de l'OVA liée de manière covalente à des billes de polystyrène non-internalisables par les LBs. Nous avons observé dans une première expérience que l'absence d'autophagie dans les LBs compromettait la sécrétion d'anticorps IgG anti-OVA dans cette situation expérimentale particulaire. Cela suggère que l'autophagie est nécessaire aux LBs lors d'une

présentation d'antigènes exogènes particulaires, et donc potentiellement dans une phase précoce de leur activation. Cette donnée s'ajoute à son rôle connu dans la génération des LBs mémoire et des plasmocytes.

2 Conclusion et discussion générale

L'autophagie apparaît aujourd'hui comme un mécanisme central dans un grand nombre de processus physiologiques et pathophysiologiques (Ravikumar *et al.*, 2010b).

La dérégulation de l'autophagie est de plus en plus désignée comme participant à l'étiologie de nombreuses maladies chez l'Homme. Plusieurs approches thérapeutiques visant à moduler l'autophagie sont à l'heure actuelle envisagées dans de nombreux types de pathologies.

Tou d'abord, pour le cas du cancer, il a été montré que l'altération de l'activité autophagique est aussi bien associée à la formation de tumeur que dans la répression des cellules tumorales déjà établies (Janku *et al.*, 2011). Un grand nombre d'études indique que l'autophagie est activée dans les cellules tumorales exposées à certains types de chimiothérapie. Puis, comme mentionné dans l'introduction de mon manuscrit, l'autophagie est également impliquée dans d'autres types de maladies telles que les maladies neurodégénératives (Mizushima *et al.*, 2008; Rubinsztein *et al.*, 2012). De plus, il apparaît maintenant de façon claire que l'autophagie est un mécanisme important pour l'élimination des microorganismes. De ce fait, une déficience en autophagie augmente la susceptibilité de contracter une infection. Enfin, la dérégulation de l'activité autophagique participe au développement des maladies auto-inflammatoires et sans doute au développement des maladies autoimmunes (Levine *et al.*, 2011).

L'autophagie est décrite, depuis sa découverte, comme un processus protecteur des cellules en condition de stress. Dans certains cas cependant, le rôle de l'autophagie est plus complexe notamment dans le développement de cancers (Meijer and Codogno, 2009).

L'association de l'autophagie et du cancer est complexe car ce processus joue des rôles opposés au cours des différentes étapes de la maladie. Dans les premiers stades du développement de la tumeur, l'autophagie combat l'instabilité génomique et supprime la croissance des cellules pré-cancéreuses alors que plus tardivement, l'autophagie favorise la survie des cellules cancéreuses en diminuant le stress de ces cellules (stress métabolique et dus à la chimiothérapie).

La régulation de l'autophagie est étroitement liée aux voies de signalisation de la tumorigénèse. Plusieurs gènes suppresseurs de tumeur sont impliqués dans l'inhibition en aval de la voie de signalisation de mTOR. En effet, les gènes *PTEN*, *TSCA*, *TSC2* et *p53*, suppresseurs de tumeur, stimulent l'autophagie et vont au contraire inhiber la voie mTOR. A l'inverse, des oncogènes tels que la PI3K de classe I, Akt et Bcl2 activent la voie de signalisation mTOR, inhibant ainsi l'autophagie (Levine and Kroemer, 2008). *p53*, gène suppresseur de tumeur muté dans plus de 50% des tumeurs humaines, régule de façon positive l'autophagie lorsque la cellule subit des dommages de l'ADN. Ce processus serait peut être dû à l'activation de l'AMPK du complexe TSC1/TSC2, qui induirait une inhibition de la voie mTOR. Une autre explication serait une augmentation d'expression de la protéine DRAM, une protéine lysosomale connue pour induire l'autophagie.

Le premier lien direct entre la machinerie autophagique et le cancer a été démontré en 1999 par l'équipe de Beth Levine. C'est à cette époque que le gène *Beclin1* a été décrit comme un gène suppresseur de tumeur à partir de la cartographie de loci de susceptibilité au développement de certains cancers. Une délétion mono-allélique de ce gène est corrélée au développement de plusieurs cancers (cancer du cerveau, des ovaires, de la prostate). De plus, plusieurs équipes ont montré qu'il y avait une baisse de l'expression de la protéine BECLIN1 dans les cancers du sein, des ovaires et du cerveau (Liang *et al.*, 1999). Il a été démontré que le transfert du gène *Beclin1* dans une lignée cellulaire tumorale inhibe sa croissance et sa prolifération *in vitro* (Qu *et al.*, 2003). De plus, les souris qui présentent une délétion mono-allélique de *Beclin1* présentent une diminution de l'activité autophagique corrélée à une occurrence importante de divers cancers.

La fonction suppresseur de tumeur de l'autophagie peut être indépendante de son potentiel pro-survie ou pro-mort. Certaines protéines ATG, comme la protéine Beclin1, sont impliquées dans le développement de tumeurs. Eileen White a proposé une hypothèse pour expliquer comment la perte d'autophagie, qui permet la survie cellulaire, stimule l'oncogénèse (White, 2012). La délétion des gènes ATGs engage une instabilité génomique lors d'un stress cellulaire métabolique, ce qui favorise l'oncogénèse et la progression tumorale. En effet si l'on délète la protéine Beclin1 dans une lignée cellulaire tumorale, cela entraîne notamment une augmentation des dommages de l'ADN, un centrosome anormal et une structure de chromosome aberrante. Toutes ces anomalies dues à l'absence de protéines ATGs aboutissent à une stimulation de la tumorigénèse. Dans d'autres cas, l'autophagie peut être bénéfique pour la tumeur. Il est possible que l'autophagie puisse contribuer à la survie cellulaire de ces cellules tumorales durant les premières étapes de la croissance tumorale ou de tumeur solide, comme par exemple, lors d'insuffisances de vascularisation qui limitent l'apport de nutriments.

Nous avons pu voir que l'autophagie peut à la fois participer à la régression cancéreuse en dégradant différentes protéines oncogènes, mais également participer à la survie de cellules tumorales en

dégradant une partie du cytoplasme de ces cellules afin de leur fournir de l'énergie pour leur survie. Ce bénéfice pour la tumeur est d'autant plus grand en condition de traitement chimiothérapeutique car, dans ce cas, l'autophagie peut être activée notamment à cause d'une augmentation du stress cellulaire. L'autophagie apparaît donc comme une cible thérapeutique prometteuse mais reste une approche complexe pour la thérapie du cancer.

La décision d'inhiber l'autophagie comme nouveau traitement anti-cancer est basée sur le fait que l'activité autophagique est augmentée dans les cellules cancéreuses établies. L'autophagie protège les cellules cancéreuses face aux stress cellulaires dus à l'hypoxie, une carence en acides aminés, la radiothérapie et la chimiothérapie. Par exemple, l'inhibition de l'autophagie dans un modèle murin du carcinome pancréatique par addition de chloroquine ou l'utilisation d'ADN interférence pour le gène *Atg5*, *in vitro*, inhibe la croissance tumorale (Yang *et al.*, 2011). D'autre part, comme je le relatais plus haut, les cellules cancéreuses sont sujettes à divers stress tels que la radiothérapie et la chimiothérapie. Dans ce cas, l'inhibition de l'autophagie par la chloroquine renforce les effets du traitement (Townsend *et al.*, 2012). Il a été montré que l'inhibition de l'autophagie améliore l'efficacité de la chimiothérapie en augmentant la mort cellulaire des cellules tumorales (Rouschop *et al.*, 2010). De plus, la suppression de l'autophagie par la délétion des gènes de l'autophagie ou par l'utilisation d'inhibiteurs de l'autophagie (3-méthyladénine, hydroxychloroquine) améliore la sensibilité des cellules tumorales à la chimiothérapie (Amaravadi *et al.*, 2007; Rubinsztein *et al.*, 2012).

Enfin, certains travaux suggèrent qu'augmenter l'activité autophagique permet de tuer les cellules tumorales. L'induction de l'autophagie dans les cellules sur le point de mourir a été suggérée comme une potentielle stratégie pour éradiquer les cellules tumorales (Levy and Thorburn, 2012). En fait, plusieurs médicaments anti-cancéreux ciblent l'augmentation de l'autophagie. La rapamycine, un inhibiteur de mTOR semble induire le processus autophagique (Crazzolara *et al.*, 2009; Takeuchi *et al.*, 2005) et agirait comme un anticancéreux sur des cellules de lymphome (Yazbeck *et al.*, 2008).

Le rôle de l'autophagie dans les maladies neurodégénératives telles que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson et la maladie de Huntington a été particulièrement bien étudié (Rubinsztein *et al.*, 2012). Ces maladies sont le plus souvent associées à une augmentation de débris ou d'agrégats protéiques dans les neurones. Un manque de dégradation de ces agrégats mène à un excès de mort des cellules neuronales et au déclenchement des maladies neurodégénératives. Il a été montré que l'augmentation de l'activité autophagique est considérée comme un mécanisme protecteur de la neurodégénération. A l'inverse, des expériences montrent que la réduction de l'activité autophagique, observée au cours du vieillissement participe au déficit de dégradation des protéines agrégées et crée, de ce fait, un désordre dans la fonction neuronale (Hara *et al.*, 2006; Komatsu *et*

al., 2006). Ainsi, l'accumulation d'agrégats protéiques dans le système nerveux central de souris déficientes pour *Atg7* s'accompagne d'une neurodégénération. De manière similaire, les souris déficientes pour *Atg5* dans les cellules neuronales montrent une accumulation de protéines toxiques. Des études récentes ont montré un lien entre le défaut de mitophagie et certaines formes de la maladie de Parkinson, aboutissant à une accumulation de mitochondries endommagées dans les neurones (Vives-Bauza *et al.*, 2010). Ainsi l'induction thérapeutique de l'autophagie pourrait améliorer la clairance des protéines toxiques et l'élimination des mitochondries non-fonctionnelles dans ce type de pathologies.

Des expériences ont montré que l'activation de l'autophagie par de la rapamycine améliore la clairance des agrégats protéiques toxiques pour la cellule et protège de la neurodégénérescence dans le modèle *D. melanogaster* (Ravikumar *et al.*, 2004). De plus, la rapamycine diminue la formation d'agrégats et ainsi réduit les symptômes dans un modèle murin de la maladie de Huntington (Ravikumar *et al.*, 2004). Ces résultats montrent un fort potentiel du rôle de l'activation de l'autophagie dans les maladies neurodégénératives. A ce jour, cependant, peu d'études cliniques chez l'Homme démontrent un effet bénéfique de la modulation de l'autophagie dans ces maladies.

L'induction de l'autophagie pourrait également être envisagée pour le traitement des maladies infectieuses. L'autophagie contribue à la défense contre les microorganismes via la dégradation des pathogènes et l'activation de l'immunité innée et adaptative (Levine *et al.*, 2011). Il a été observé que l'activité autophagique était augmentée lors de certaines infections bactériennes ou virales (Münz, 2009). Par exemple, l'infection de la lignée MEF par le virus Sindbis est accompagnée d'une augmentation de la quantité de protéine LC3 II (Orvedahl *et al.*, 2010). Chez *C. elegans*, les mutations des gènes de l'autophagie rendent plus sensible l'hôte à l'infection bactérienne (Jia *et al.*, 2009). De plus, la surexpression de Beclin1 permet d'inhiber la réplication du virus Sindbis. Cela suggère que l'autophagie joue un rôle dans la défense de l'hôte contre l'infection virale (Liang *et al.*, 1998). L'autophagie permet également la délivrance de microorganismes aux lysosomes via le processus de xénophagie (Mizushima *et al.*, 2008). Ce processus cellulaire permet la dégradation de pathogènes intracellulaires (Nakagawa *et al.*, 2004). Plusieurs études ont montré que l'autophagie contribuait au contrôle de la bactérie *M. tuberculosis*. En plus de dégrader les agents infectieux, l'autophagie améliore la mise en place des réponses immunes innée et adaptative (Deretic, 2005). Tout d'abord, l'autophagie permet d'améliorer la réponse de l'immunité innée via les PRRs. Comme je le décrivais dans l'introduction de mon manuscrit, plusieurs études ont démontré que des ligands microbiens étaient capables d'activer l'autophagie par l'intermédiaire des PRRs tels que les TLRs et NLRs (Fabri *et al.*, 2011). En dégradant les pathogènes intracellulaires, l'autophagie améliore la survie cellulaire lors de l'infection. Il est à noter qu'un certain nombre de virus sont capables d'interagir avec les

composants de la machinerie autophagique et de la bloquer. C'est le cas du virus de la grippe. En effet, la protéine virale M2 de ce virus est capable de bloquer la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Gannage *et al.*, 2009).

L'autophagie est ainsi impliquée dans la défense de l'hôte contre les pathogènes. Il serait intéressant de savoir si l'autophagie peut servir de cible thérapeutique efficace contre les maladies infectieuses. Il a été montré que la forme la plus active de vitamine D, qui augmente l'activité autophagique, inhibe la réplication du virus de l'immunodéficience humaine (VIH) dans des macrophages humains (Campbell and Spector, 2012). De plus, dans les cellules infectées par *M. tuberculosis*, l'induction de l'autophagie est corrélée avec l'activité antimicrobienne (Kim *et al.*, 2012). Il est possible que certains médicaments déjà utilisés en clinique pour lutter contre les maladies infectieuses induisent partiellement l'autophagie (Gros and Muller, 2014). Mais la plupart de ces arguments proviennent d'expériences *in vitro* ou de modèles animaux. Il n'est pas encore possible de transposer ces résultats à l'Homme. Tat-Beclin1, un peptide qui induit l'autophagie, possède un potentiel thérapeutique dans le traitement des maladies infectieuses (Shoji-Kawata *et al.*, 2013). Cette étude, développée par Beth Levine, montre que ce peptide diminue la réplication de plusieurs pathogènes. Ainsi le traitement par Tat-Beclin1 réduit la mort des souris infectées par le virus chikungunya ou le virus du Nil occidental. Il serait intéressant d'analyser l'efficacité de ce peptide inducteur d'autophagie dans un essai clinique.

En plus de dégrader des pathogènes, l'autophagie régule l'immunité (Kuballa *et al.*, 2012). L'autophagie participe au trafic qui délivre les acides nucléiques et antigènes microbiens vers les compartiments endosomes/lysosomes, participant ainsi à l'activation de l'immunité innée (Schmid and Münz, 2007). Dans une DC n'exprimant pas *Atg5*, la délivrance de MAMPs viraux au TLR7 est compromise et les sécrétions d'IFN- α et d'IL-12 sont diminuées (Lee *et al.*, 2007a). Il a été montré de plus que l'autophagie favorise la présentation antigénique d'antigènes endogènes d'origine virale. Par exemple, lors de l'infection par le HSV-1, l'autophagie augmente la présentation d'antigènes viraux aux LTs CD8+ via les molécules du CMH I (English *et al.*, 2009). L'autophagie améliore également la présentation antigénique via les molécules du CMH II aux LTs CD4+ (Schmid *et al.*, 2007). De plus, l'autophagie est impliquée dans le développement et l'homéostasie des LTs.

Ces différents arguments suggèrent qu'augmenter l'activité autophagique pourrait améliorer la réponse immune. Il faut cependant garder à l'esprit que l'autophagie inhibe la sécrétion de cytokines antivirales et pro-inflammatoires. Ainsi le bénéfice d'augmenter l'autophagie pourrait être contrebalancé par une diminution de l'inflammation dommageable à la réponse immune.

Au contraire, il a été montré dans de nombreuses études que l'autophagie était augmentée et avait

un rôle néfaste dans les maladies auto-immunes. Je rappelle ici que dans la PR, la stimulation par le TNF α augmente l'autophagie dans les fibroblastes et les ostéoclastes (Connor *et al.*, 2012). L'autophagie est également retrouvée augmentée dans l'EAE (Kovacs *et al.*, 2012). Le rôle de la dérégulation de l'autophagie est de ce fait grandement suspecté dans le développement de maladies auto-immunes telles que la PR ou le LED. Nous avons d'ailleurs pu mettre en évidence une dérégulation de l'autophagie dans les LTs de souris lupiques et de patients atteints d'un LED (Alessandri *et al.*, 2012; Gros *et al.*, 2012). De plus, on sait maintenant que l'autophagie est aussi augmentée dans les LBs de ces mêmes patients (Clarke *et al.*, 2014). L'autophagie est également impliquée dans la présentation d'antigènes citrullinés en périphérie par les DCs, macrophages et LBs (Ireland and Unanue, 2011). De manière intéressante, la fréquence de lymphocytes qui réagit aux peptides citrullinés augmente chez les patients atteints d'une PR. Nous avons de plus montré que l'autophagie pourrait être impliquée dans les étapes précoces de l'activation des LBs, notamment au niveau de leur capacité à présenter l'antigène aux LTs et donc à la constitution des CGs (**Publication 2**). De plus, nous avons mis en évidence, dans un modèle de susceptibilité au lupus, une diminution du nombre de plasmocytes médullaires à longue durée de vie ainsi qu'une réduction des dépôts d'IgG au niveau des glomérules rénaux lorsque l'autophagie est délétée dans les LBs. Il semble donc que la survie des plasmocytes à longue durée de vie soit compromise en absence d'autophagie et tout particulièrement dans un modèle auto-immun chronique de sécrétion d'auto-anticorps (Conway *et al.*, 2013; Pengo *et al.*, 2013) (**Publication 2**). Ces différents arguments suggèrent que diminuer l'activité autophagique pourrait améliorer les symptômes de certaines maladies auto-immunes à auto-anticorps.

D'autres travaux montrent par ailleurs que l'autophagie est dérégulée dans plusieurs maladies autoimmunes. Ainsi, les travaux d'Alessandri et collaborateurs suggèrent que l'activité autophagique est bloquée dans les LTs de patients atteints de LED. Bien qu'ils observent comme nous-même une augmentation du nombre de compartiments autophagiques dans les LTs, ils montrent que la stimulation des LTs lupiques par du sérum contenant des auto-anticorps est incapable d'amplifier l'autophagie. Cette activation est pourtant observée lorsque l'expérience est réalisée avec des LTs de sujet sains. De plus dans ce travail, les LTs n'ont pas été stimulés via des récepteurs impliqués lors de maladies autoimmunes, comme le TCR. Quoiqu'il en soit, même si notre travail montre que l'activité autophagique n'est pas totalement bloquée dans les LTs lupiques, il reste possible que l'accumulation de compartiments autophagiques soit le résultat d'une trop forte génération d'autophagosomes associée à une dégradation lysosomale insuffisante ou qualitativement différente. Il est aussi possible qu'une activité autophagique déficiente contribue à l'apoptose accrue des LTs observée au cours de la PR et du LED. Ainsi, dans le futur, d'autres travaux seront nécessaires

pour évaluer si l'augmentation ou l'inhibition de l'autophagie est souhaitable dans le traitement des maladies autoimmunes systémiques.

Pour aller plus en avant dans cette réflexion, notons que des molécules thérapeutiques utilisées fréquemment comme l'hydroxychloroquine (Lee *et al.*, 2011), le bortezomib, la rapamycine ou encore le peptide P140, découvert au laboratoire et actuellement en phase d'essais cliniques (Page *et al.*, 2011b), ont un impact parfois inverse sur l'activité autophagique (Gros and Muller, 2014).

Certaines thérapies aboutissent à augmenter l'activité autophagique comme la rapamycine ou l'inhibiteur du protéasome bortezomib. Ce dernier a été montré comme diminuant les glomérulonéphrites chez les patients atteints de LED et de souris lupiques en réduisant le nombre de plasmocytes et la production d'auto-anticorps (Fang *et al.*, 2012). L'effet du bortezomib est cependant peut-être majoritairement lié à son effet toxique sur les plasmocytes.

La rapamycine, un inhibiteur de mTOR (Ravikumar *et al.*, 2004), induit l'autophagie quant à elle en inhibant mTORC1 et mTORC2. Elle est utilisée en tant qu'immunosuppresseur dans le rejet de greffet et son usage a été envisagé dans le traitement du LED. Le traitement par la rapamycine de souris lupiques réduit le taux d'anticorps IgG anti-ADN, normalise la fonction rénale et la protéinurie. L'uvéite autoimmune, est une maladie inflammatoire de l'œil et deux essais cliniques traitent ces patients par de la rapamycine (Zhang *et al.*, 2012). L'étude de modèles expérimentaux peut révéler un effet « dual » intéressant de la rapamycine. Un test a été réalisé sur un modèle murin induit d'uvéite par l'injection de « interphotoreceptor retinoid-binding protein peptide », IRBP. Les souris ont été traitées soit avec une faible dose, soit une forte dose de rapamycine. Les animaux ayant reçu une faible dose de rapamycine montre une aggravation notable des signes cliniques de la maladie alors que ceux ayant reçu une forte dose de rapamycine bénéficient d'une atténuation des symptômes. On peut noter que la faible dose de rapamycine induit une augmentation des LTs spécifiques de l'antigène IRBP, également corrélée à une augmentation de l'activité autophagique. Comme décrit précédemment, l'augmentation de l'activité autophagique peut dans certains cas stimuler la réponse immunitaire. On peut penser que la faible dose de rapamycine peut accentuer l'uvéite en augmentant l'autophagie (Jagannath *et al.*, 2009). Ces travaux soulèvent ainsi la question de l'implication réelle de l'autophagie dans le traitement par la rapamycine à dose élevée, dose efficace pour le traitement. Observons cependant que l'effet thérapeutique de la rapamycine pourrait être lié son effet immunosuppresseur, indépendamment de l'activité l'autophagique.

Le peptide thérapeutique P140 correspond à la séquence 131-151 de la ribonucléoprotéine nucléaire U1-70K dont le résidu 140 est une phosphosérine. L'administration de ce peptide lors d'essais cliniques peut diminuer de façon significative le taux d'anticorps IgG anti-ADN et l'activité de la

maladie (Muller *et al.*, 2008; Zimmer *et al.*, 2013). De plus, l'expérimentation menée chez la souris lupique MRL^{lpr/lpr} suggère que le P140 diminue l'expression de la protéine chaperone HSPA8 et la stabilité du dimère des molécules du CMH II. Le flux autophagique est ainsi diminué dans les LBs contribuant potentiellement à un défaut de la présentation d'antigène endogène et aboutissant à une diminution de l'activation des LTs (Page *et al.*, 2011a; Page *et al.*, 2011b). Enfin l'utilisation d'hydroxychloroquine, inhibiteur puissant du flux autophagique montre un bénéfice thérapeutique considérable dans le traitement du LED. La question de l'influence de l'autophagie dans les bénéfices thérapeutiques reste néanmoins en suspens. De plus comme évoqué précédemment, le blocage systémique de l'autophagie peut mener à la sécrétion accrue de cytokines pro-inflammatoires et anti-virales, qui pourraient être néfastes à long terme pour le patient.

Finalement, il semble important de définir si la stratégie de stimulation de l'autophagie ou d'inhibition de l'autophagie est la plus appropriée. Ce choix dépend étroitement de la pathologie et du type cellulaire ciblé.

Notre étude s'inscrit maintenant au sein d'un cadre plus large qui vise à comprendre le rôle de l'autophagie dans les réponses immunitaires humorales T dépendantes. Nos premiers résultats mettent en évidence des implications de la machinerie autophagique dans l'activation des LBs et l'initiation de la réponse humorale face à certains antigènes et à la survie des plasmocytes. Une meilleure compréhension de ces événements devrait nous orienter vers la mise au point de traitements ciblant l'autophagie pour moduler l'activation des LBs et leur différenciation en plasmocytes. Cette approche permettrait de diminuer les sécrétions chroniques d'auto-anticorps pathogènes caractéristiques de pathologies auto-immunes systémiques comme le LED, sans affecter les LBs sains/non autoréactifs.

ANNEXE

Annexe

1 Publication 4

Autophagy in chronic inflammation

Johan Arnold, Diane Murera and Frédéric Gros

Springer-Collection Networks in inflammation

1.1 Avant-propos

Dans cet article de revue, actuellement sous presse, nous avons exposé l'état de l'art concernant l'impact de l'autophagie dans l'inflammation chronique. Nous y récapitulons les données publiées relatives à l'autophagie dans diverses situations inflammatoires (maladies autoinflammatoires telles que la maladie de Crohn, le syndrome métabolique et les maladies auto-immunes) et abordons les mécanismes de régulation des voies autophagiques. Les éléments de cette revue rédigée par trois auteurs (Arnold *et al.*) ont été largement repris dans l'introduction de mon mémoire.

1.2 Autophagy in chronic inflammation

Johan Arnold, Diane Murera and Frédéric GROS

CNRS UPR3572- Immunopathologie et Chimie Thérapeutique

Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire. Strasbourg.

Université de Strasbourg- France

Correspondence

Frédéric GROS, Institut de Biologie Moléculaire et Cellulaire, UPR3572 CNRS

Immunopathologie et Chimie Thérapeutique

Abbreviations

HMGB1, high-mobility group 1 protein; ATP, adenosine tri-phosphate; ROS, reactive oxygen species; CMA, chaperone mediated autophagy; ATG, autophagy-related genes; UPR, unfolded protein response; ER, endoplasmic reticulum; MAMP, microbe-associated molecular pattern; PRR, pattern recognition receptors; RLR, retinoic acid induced gene (RIG)-like receptors; IFN, interferon; CDS, cytosolic DNA sensor; NLRP3, NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3; IL, interleukin; TLR, toll-like receptor; LC3, light chain 3 standing for microtubule-associated protein 1 light chain 3B; STING, CDS-activated proteins stimulator of IFN gene; TNF, tumour necrosis factor; TRAF, TNF receptor-associated factor; TBK1, TRAF family member-associated nuclear factor-kB activator-binding kinases abbreviated; NOD, nucleotide oligomerization domain; GWAS, genome-wide analysis studies; CD, Crohn's disease; IBD, inflammatory bowel disease; PBMC, peripheral blood mononuclear cells; Th, t helper; Treg, regulatory T cell; ILC, innate lymphoid cells; SNP, single nucleotide polymorphism; IRGM, immunity-related GTPase M; MiR, micro RNA; APC, antigen presenting cells; MHC, major histocompatibility complex; DCs, dendritic cells; HM, hypomorphic; NRV, norovirus; DSS, dextran sodium sulphate; TIID, type II diabetes; HFD, high fat diet; IAPP, islet amyloid peptide; FoxO, forkhead homeobox type protein O; FFA, free fatty acids; AMPK, AMP-activated protein kinase; LPS, lipopolysaccharide; LDL, low density lipoproteins; VSMC, vascular smooth muscle cells; LAP, LC3-associated phagocytosis; SLE, systemic lupus erythematosus; RA, rheumatoid arthritis; MS, multiple sclerosis; pDCs, plasmacytoid dendritic cells; NET, neutrophil extracellular trap; RASF, RA synovial fibroblasts; TEC, thymic epithelial cell; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; TCR, T cell receptor; PFKFB3, 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3;

Abstract

Autophagy is a catabolic process consisting in the formation of cytoplasmic vacuoles, fusing with lysosomes and leading to the degradation of their content. Part of the autophagy machinery is also involved in specialized forms of endocytosis and vesicle trafficking. The role of autophagy, initially described as a response to energetic stress, has now been extended to other stress signals like tissue damage and infection. Autophagy is indeed deeply involved in the regulation of inflammation and in the biology of immune cells. Autophagy regulates cell metabolism and integrates it to the elimination of microorganisms, to the fine-tuning of inflammation and to the activation of the adaptive immune system. The inflammatory response aims at controlling pathogen invasion and at initiating tissue repair. If unrestricted, inflammation can become chronic and be the source of the so-called autoinflammatory and autoimmune pathologies. These complex disorders result from a combination of genetic and environmental factors. A clear genetic link between Crohn's disease and autophagy deregulation has been demonstrated. Autophagy deregulation provoked by environmental triggers like nutrient excess or by aging, are also linked to low-grade inflammation observed during metabolic syndrome, especially in the case of type II diabetes and atherosclerosis. Both genetic causes and environmental triggers could also link autophagy deregulation to autoimmune pathologies like rheumatoid arthritis, systemic lupus erythematosus and multiple sclerosis. The emerging causality between autophagy deregulation and chronic inflammation, subject of intense studies as it could lead to new therapeutic options, will be described in this chapter.

Autophagy in the regulation of inflammation

Inflammation is a physiological process, shared by higher animal eukaryotes, triggered by several stress signals. First, entry of microorganisms in otherwise sterile tissues, changes in the composition of the bacterial flora on epithelia, for example in the gut, can initiate inflammation. Secondly, inflammation can also be triggered by cytokines, themselves inducible by infection, or by danger signals, like the ones delivered by intracellular components released in the extracellular milieu (nuclear components like high mobility group 1 (HMGB1) protein or adenosine tri-phosphate (ATP) release). Oxygen stress induced by intra or extracellular reactive oxygen species (ROS) is also a potent stimulant of inflammation. Regulated inflammation leads to tissue repair and to the initiation of an immune response aiming at controlling infection. Inflammation and the subsequent immune response, which can further participate in inflammation, must be down regulated at the end of the process. If not, chronic inflammation can lead to disorders linked to aberrant tissue remodelling, excessive cell death and tissue damage, sometimes associated to an autoimmune reaction. Inflammation is thus at the crossroads between metabolic-stress, control or elimination of pathogens by the immune response, and tissue homeostasis.

Autophagy is a process linked to self-digestion by cells of their own components via lysosomal degradation. Several forms of autophagy coexist in animal cells. Chaperone-mediated autophagy (CMA), and microautophagy both allow direct translocation of cytosolic material inside lysosomes. The relations of CMA and microautophagy with inflammation are plausible although not yet proven and will thus not be discussed in this chapter.

Macroautophagy, the best-characterized form of autophagy, will be hereafter called autophagy. It involves the formation of double membranes vesicles fusing with lysosomes to degrade their content. The proteins encoded by autophagy-related genes (*ATG*), play major role in canonical autophagy but also in other processes like endocytosis and vesicle trafficking (Codogno *et al.*, 2012). Autophagy was initially described as a catabolic mechanism involved in metabolic stress response, like deprivation of amino acids. It is becoming increasingly clear that in higher eukaryotes autophagy is also involved in other cellular stress responses, like ROS reaction (Harijith *et al.*, 2014), hypoxia (Goda and Kanai, 2012), unfolded protein response (UPR) and endoplasmic reticulum (ER)-stress (Deegan *et al.*, 2013), genotoxic stress (Vessoni *et al.*, 2013) and pathogen recognition (Tang *et al.*, 2012). All these responses are main actors in the inflammation process and sometimes impact the subsequent immune response. It is thus not surprising that autophagy is a fundamental player in the inflammation process.

A very ancestral function of autophagy, beyond its role as sensor of energy stress, is probably the elimination of pathogens, particularly intracellular ones. This very particular aspect of autophagy is

called xenophagy, when autophagic machinery directly engulfs pathogens or facilitates their translocation and degradation into lysosomes (Gomes and Dikic, 2014). Autophagy is triggered in that case by metabolic stress induced by pathogen invasion, or by direct recognition of microbe associated molecular patterns (MAMP) by pattern recognition receptors (PRR). This autophagy is induced in that case upon inflammation, and contributes to its resolution, by eliminating pathogens. Interestingly, autophagy is tightly linked to mitochondrial homeostasis. Mitochondria are issued from ancestral proteobacterias, having adopted intracellular life in compartmented cells. It is a very seducing concept that evolution, initially dedicating autophagy to controlling invading pathogens, drove this degradative pathway toward the regulation of symbiotic organelle homeostasis. With respect to the regulation of inflammation, the maintenance of well functioning mitochondria is of great interest. First, balanced autophagic activity limits ROS produced by damaged mitochondria (Zhou *et al.*, 2011a), dampening pro inflammatory stimulus. Secondly, mitochondria removal leads to the degradation of PRR associated to their membrane, like retinoic acid induced gene (RIG)-like receptors (RLR). As a consequence inhibition of autophagy can lead to hyper-responsiveness to cytosolic double stranded RNA in terms of type I interferon (IFN) secretion (Jounai *et al.*, 2007).

Autophagy also regulates the recognition of cytosolic DNA. In certain circumstances, mitochondrial DNA can be released in the cytosol, especially of PRR-stimulated macrophages (Nakahira *et al.*, 2011). In this publication, an unidentified cytosolic DNA sensor (CDS) leads to the activation of the NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NALP3) inflammasome and to the subsequent production of the pro-inflammatory cytokines interleukin (IL)-1 β and IL-18. Another publication reported a contribution of toll-like receptor (TLR) 9 to that respect (Oka *et al.*, 2012).

Considering the growing literature on this subject, autophagy is more widely linked to the regulation of cytosolic DNA recognition. Interestingly, not only mitochondria associated anti-viral PRR can be regulated by autophagy machinery. ATG9a protein activity and microtubule associated protein light chain 3, often abbreviated as LC3, both associate with the CDS-activated proteins stimulator of IFN gene (STING) and prevents its trafficking from ER to compartments containing tumour necrosis factor (TNF) receptor-associated factor (TRAF) family member-associated nuclear factor-kB activator-binding kinases, abbreviated as TBK1 (Saitoh *et al.*, 2009). This non-canonical autophagic function of ATG9a contributes to limit inflammatory response toward cytosolic DNA.

Type I IFNs are secreted early after viral infection by both immune and non-immune cells. Autophagy, as introduced above, can also regulate pro-inflammatory cytokine secretion, especially in phagocytes. One of the first reports showing a link between inflammasome and the autophagy machinery was published by Saitoh and colleagues (Saitoh *et al.*, 2008). They showed that *Atg16L1*-deficient macrophages secreted higher amounts of IL-1 β after TLR stimulation than controls. They showed that this deregulated secretion was linked to a higher activity of the inflammasome. Kehrl's

group showed more recently that the assembled inflammasome was subjected to ubiquitination and targeted to autophagy-related lysosomal degradation via sequestosome1/p62 binding (Shi *et al.*, 2012). It was also shown that ATG16L1 activity might indirectly control TRAF6 level via p62, then downregulating the intensity of IL1- β receptor signalling (Lee *et al.*, 2012b). Autophagy also limits inflammasome activity by preventing ROS production by damaged mitochondria (Zhou *et al.*, 2011a). Interestingly, a recent publication showed that during viral infection by influenza, receptor-interacting serine-threonine kinase 2 and nucleotide oligomerization domain 2 (NOD2) mediated degradation of damaged mitochondria by autophagy, limiting the activation of NLRP3 inflammasome by intracellular ROS (Lupfer *et al.*, 2013).

On the onset of an immune response, innate immunity is the main first actor in the induction of immunity. Although the subsequent adaptive immune response is dependent on this first wave of pro-inflammatory signals, adaptive immune cells can also contribute to the maintenance of inflammation by the cytokines they secrete and by the tissue damage they induce. In certain circumstances, in addition to the initial inflammation, an antigen, sometimes encoded by self-genetic information, can be recognized by cognate T or B lymphocytes. These immune reactions mediated by antibodies or by cytotoxic cells, accompanying inflammation, can be responsible for tissue degradation. Autophagy can contribute to the abnormal activation of the adaptive immune system and to the maintenance of inflammation. First autophagy contributes to endogenous and exogenous/antigen presentation to T cells (Romao *et al.*, 2013a), and thus probably also to autoantigen presentation. Autophagy machinery as discussed later, may play a role for dead cell clearance limiting the access to autoantigen (Martinez *et al.*, 2011). Moreover, autophagy is a key player in the regulation of lymphocyte survival and activation (Puleston and Simon, 2014) and by this mean is suspected to regulate inflammation related to the activity of adaptive immunity.

Considering the increasing evidence that autophagy is a key player in immunity, it does not seem now surprising that the link between human immune diseases and autophagy deregulation is emerging.

Autophagy and Crohn's disease

The first era of identification of candidate genes for autoinflammatory and autoimmune diseases, before genome-wide analysis studies (GWAS), strongly relied on linkage disequilibrium studies. One of them identified three variants of *NOD2* genes, strongly associated with Crohn's disease development (CD, Hugot *et al.*, 2001): one frameshift mutation, also identified on another independent study (Ogura *et al.*, 2001) and two nonsense variations, altering the leucine-rich repeat domain. In several independent studies, *NOD2* polymorphisms, are strongly linked to the

development of inflammatory bowel disease (Yao, 2013). The most common mutated variants are characteristic of patients suffering from CD rather than ulcerative colitis. IBD in general and CD in particular, are related to hyper inflammation caused by environmental factors like an abnormal commensal flora or abnormal reaction against the flora. Genetic predisposition participates in the inflammation process. Loss-of-function mutations of NOD2 lead to a decrease of IL-6, IL-8 and TNF- α response against cytosolic microbial products probably implying an impaired clearance of pathogens (Netea *et al.*, 2004; van Heel *et al.*, 2005). This diminished inflammatory acute response is suspected to lead paradoxically to increase chronic immune response at term. This could be due to pathogen overload linked to changes in the composition of the flora, but also to skewing of the adaptive immune response toward excessive T helper (Th)1/Th17 patterns. Indeed, loss of function of NOD2 mutants in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from CD patients showed impaired IL-10 production leading to the hypothesis that NOD2 participates to the global down regulation of Th cell activity (Netea *et al.*, 2004). In the same line, reduced regulatory T (Treg) cell numbers and survival have been found in CD patients with NOD2 loss of function mutation (Rahman *et al.*, 2010). NOD2 is also highly expressed on innate lymphoid cell (ILC) population from the intestine. These ILC may contribute to homeostasis via their cytolytic activity against infected cells but also by the production of regulatory cytokines like IL-22, known to decrease inflammatory symptoms in a mouse model of colitis. Finally NOD2 mutations are linked to a decrease in antibacterial peptides secretion by Paneth cells in response to bacterial invasion (Wehkamp *et al.*, 2004). This decrease in defensin production is eager to contribute to the increased bacterial load in the intestine, favouring hyper inflammation.

GWAS greatly contributed to the identification of new candidate genes for complex chronic inflammatory diseases, often of polygenic origin. One of the first genetic evidence pointing out a role for autophagy machinery in chronic inflammation was found in the context of CD. These studies confirmed *NOD2* as a candidate gene for CD development as single nucleotide polymorphisms (SNPs) were found strongly associated with the disease. Strikingly, these studies identified SNPs in the *ATG16L1* gene region, strongly correlated with CD development (Barrett *et al.*, 2008; Hampe *et al.*, 2007; Rioux *et al.*, 2007). The more frequent coding variant of *ATG16L1* leads to a substitution of a threonine to an alanine (T300A) and is located at the vicinity of the WD-repeat domain. Another candidate gene was also described: the immune related GTPase M (McCarroll *et al.*, 2008; Parkes *et al.*, 2007). The latter protein is described as an inducer of xenophagy, particularly important in IFN- γ induced response toward mycobacteria and viruses (Petkova *et al.*, 2012). Interestingly, one of the exonic variants for *IRGM*, although conservative in terms of amino acid sequence, leads to an increased sensitivity to down-regulation by micro RNA (MiR) 196 that is overexpressed in CD (Brest *et al.*, 2011).

From this discovery, autophagy was a matter of great interest in the field of CD research. Interestingly, several studies showed common potential relations between ATG16L1 polymorphisms and NOD2 loss-of-function. First, autophagy is directly linked to the elimination of pathogens as it is involved in xenophagy (Figure 1, frame 1). The first study showing a link between NOD receptors and autophagy was published by Travassos and colleagues (Travassos *et al.*, 2010). They first found that muramyl dipeptide (MDP), ligand for NOD2, was able to induce autophagic activity. Moreover, during infection by invasive bacteria, NOD1 is recruited at the plasma membrane along with ATG16L1. This core-ATG protein favoured the elimination of *Shigella flexneri* after its capture at the plasma membrane, and was physically associated with both NOD1 and NOD2. Of much interest, the authors showed that the most common NOD2 mutant associated with CD was unable to lead to ATG16L1 recruitment at the plasma membrane and failed to induce autophagy. In addition, the T300A variant of ATG16L1 protein was inefficient to induce LC3 punctate structure in response to MDP while no difference was seen under rapamycin stimulation. This suggests a selective effect of the T300A mutant on this type of xenophagy in regard to other specialized forms of autophagy. This very elegant study, proposing a rationale for a role of autophagy, in conjunction with NOD2 in the control of gut flora, was followed by another study published by Cooney and colleagues (Cooney *et al.*, 2010). In conjunction with insufficient elimination of invasive bacteria after NOD stimulation, they propose that ATG16L1 and autophagy induction impair the regulatory function of antigen presenting cells (APC; Figure 1, frame 2). Their study on dendritic cells (DCs) cells showed that MDP stimulation induced autophagy, through a NOD2-dependent mechanism. This increase of LC3-decorated membrane load, needed the canonical core-machinery proteins ATG5 and ATG7, and promoted presentation by major histocompatibility complex (MHC) class II molecules of *Salmonella enterica*-associated antigens to T cells. They unambiguously show that the most common NOD2 and the ATG16L1^{T300A} variants, associated to CD, also led to impaired presentation in the same assay. Thus in addition to eliciting the efficacy of xenophagy, the authors propose that the ATG16L1-related autophagy induced by NOD2 also prime adaptive immune response to control gut pathogens. With respect to antigen presentation, autophagy could also regulate the activation of cognate T cells by APCs, via regulation of the stability of the immune synapse. Wildenberg and collaborators showed that DCs derived from patients carrying the ATG16L1^{T300A} allele induced more stable synapses with T cells during antigen presentation, favouring Th17 cell differentiation (Wildenberg *et al.*, 2012). They confirm the possible involvement of ATG16L1 in this phenomenon and suggest IRGM as also implicated, by knock down experiments. Autophagy deregulation could thus impair the control of gut flora both by innate and adaptive immunity.

Another interesting point linking NOD2 with ATG16L1 in CD pathogenesis, is their described role in intestinal epithelium homeostasis and especially in Paneth cell function (Figure 1, frame 3). Pr

Virgin's team generated mice bearing a hypomorphic (*HM*) allele of *Atg16L1* by gene trap strategy (Cadwell *et al.*, 2008). As ATG16L1 complete deficiency is lethal in mice, this new model allowed studying *in vivo* the consequences of a diminished expression of this essential autophagy gene. The authors compared *Atg16L1^{HM}* mice with transgenic mice with conditional deletion of *Atg5* in cells expressing CRE recombinase, under the control of the Villin promoter, restricting autophagy deficiency to the intestinal epithelium. This work showed that both ATG5 and ATG16L1, and thus part of autophagic machinery, were integral to granule exocytosis by Paneth cells. Moreover, the adipocytokines leptin and adiponectin are increased at the transcriptional level in Paneth cells from *Atg16L1^{HM}* mice. Interestingly, the production of these cytokines is increased in patients suffering from CD. The same study validated the abnormal granule production or cytoplasmic localization in biological samples from patients carrying the T300A risk allele. The impact of this most common variant found in CD on Paneth cell function was confirmed by Xavier's team, using a mouse model knock-in for *Atg16L1* locus, with the T300A allele (Lassen *et al.*, 2014). Cadwell and colleagues published two years after their initial description of *Atg16L1^{HM}* mice, that when they re-derived breeders from embryos in an enhanced barrier animal facility, they did not find any Paneth cell defect in the progeny, contrary to what they had previously described (Cadwell *et al.*, 2010). Most interestingly, virus infection by CR6 strains of norovirus (NRV) leading to a persistent intestinal infection, and present in the former conventional animal facility, recapitulated previously observed granule abnormalities in Paneth cells. This virus plus susceptibility gene interaction necessary for Paneth cell abnormalities, did however not spontaneously induced colitis, pointing out a role for another environmental trigger, additionally to the genetic background and viral infection. The authors thus provoked colitis by chemical-induced injury after dextran sodium sulphate (DSS) treatment. They described that *Atg16L1^{HM}* mice, infected by NRV CR6 strain exhibited aberrant response to DSS in the colon leading to atrophy of the mucosa. Inhibiting TNF- α and IFN- γ , which is quite relevant considering CD characteristic inflammation and its treatment, reduced tissue damage. Other stimulus like ER-stress, seems to be able to trigger intestinal inflammation. Using mice deficient for *Xbp1* specifically in the intestinal epithelium, Blumberg's team showed that ER-stress induced autophagy in this tissue (Adolph *et al.*, 2013). Invalidation of *Atg16L1* simultaneously with *Xpb1* deletion in intestinal epithelium led to enteritis originating from Paneth cells. Two reports investigated in details autophagic activity in Paneth cells from CD patients (Ciccia *et al.*, 2014; Thachil *et al.*, 2012). They paradoxically found an increased autophagic activity in Paneth cells. An aberrant distribution of granules in the cytoplasm was nevertheless confirmed, associated to detectable crinophagy, mechanism targeting secretory granules toward autolysosomes. From these studies it seems that a deregulated or aberrantly targeted autophagy, rather than simply diminished autophagy, contributes to abnormal granule exocytosis in CD.

Aside impaired bacterial clearance resulting from defective xenophagy, adaptive immunity, and antibacterial peptide secretion, several studies investigated the potential role that autophagy deregulation could play on inflammatory mediators (Figure 1, frame 4). As mentioned earlier, autophagy limits inflammasome activation. In the previously cited publication by Saitoh and colleagues (Saitoh *et al.*, 2008), *Atg16L1* deficiency was shown to favour increased IL-1 β and IL-18 secretions by macrophages in response to lipopolysaccharide (LPS). Foetal liver chimeric mice with hematopoietic cells deficient for ATG16L1, exhibited more severe DSS-induced colitis than wild type counterparts. This phenomenon was at least in part dependent on IL-1 β and IL-18 secretion.

The role of inflammasome in the development of CD is controversial, as IL-1 β secretion is also believed to be necessary for tissue repair. As a matter of fact, DSS-induced colitis, partly dependent on inflammasome activation, does not totally recapitulate CD inflammation. Moreover, NLRP3 variants linked to the development of CD, are correlated to low mRNA levels (Villani *et al.*, 2009) arguing against an increased inflammasome activity during CD. It remains however possible that IL-1 β secretion above homeostatic level contributes to CD inflammation when autophagy is impaired. Mihai Netea's group thus showed that PBMCs from patients carrying the *ATG16L1*^{T300A} allele, expressed higher levels of IL-1 β after NOD2 stimulation (Plantinga *et al.*, 2011). This increased production did not seem in that case correlated with pro-IL1 β processing by caspase 1. Lassen and colleagues proved that *Atg16L1*^{T300A} mice were more susceptible to IL-1 β -linked inflammation induced by bacteria. This suggests again a role for inflammasome activation in the regulation of response toward intestinal pathogens or commensal flora (Lassen *et al.*, 2014).

Interestingly, this latter work showed that the T300A allele modulated ATG16L1 expression by rendering it more susceptible to degradation by caspase 3. A study published the same year also describes enhanced degradation of ATG16L1^{T300A} protein variant by caspase 3 (Murthy *et al.*, 2014). This loss of stability is responsible for enhanced pro-inflammatory cytokine secretion by macrophages and defective clearance of *Y. enterocolitica* in the intestine. This mechanism is caspase-dependent as suppression of the mutation-associated caspase cleavage site abolishes hyper inflammation.

Thus apart from its major role in regulating xenophagy, antigen presentation and inflammasome activity, ATG16L1 expression level seems in general linked to pro-inflammatory cytokine secretion. A recent study showed that this regulatory role could be partly played by autophagy-independent mechanisms. Sorbara and colleagues studied in details the interaction between NOD1 and NOD2 receptors with ATG16L1 (Sorbara *et al.*, 2013). They showed that an ATG16L1 protein incapable to induce autophagy was still able to down regulate cytokine production in response to NOD1 and NOD2 stimulations. They further show that the ATG16L1^{T300A} contributes to increase IL-8 signalling in response to *Shigella* infection, in a way independent from autophagy. This points out again a role for

ATG proteins in regulating inflammation independently of canonical autophagy as proved for the regulation of STING-TBK1 association by ATG9a or of RLR store level by ATG5-ATG12 conjugates.

Autophagy inflammation associated to metabolic syndrome

Metabolic syndrome in human consists in a combination of clinical factors linked to deregulated metabolism. It includes obesity, high insulin level, hypertension, and high cholesterol level. These parameters can lead to pathologies tightly linked to inflammation, like type II diabetes (TIID), atherosclerosis and other cardiovascular diseases. According to the central role autophagy plays on both regulation of metabolism and inflammation, great attention has been paid to this field.

Indeed, autophagy is known to be downregulated under high energetic diet, increased in frequency with modern western style alimentation. Autophagy also decreases with age, when metabolic syndrome prevalence increases (Figure 2, frame 1). These statements led to the hypothesis that autophagy impairment could participate in the development of pathologies associated to metabolic syndrome.

A pioneer study in the field of TIID showed that β -cells from rat under high fat diet (HFD), exhibited abnormal ubiquitin protein aggregates (Kaniuk *et al.*, 2007). Interestingly, these aggregates could be reproduced *in vitro* in a pancreatic cell line, under high glucose treatment, and were shown to be dependent on oxidative stress. These aggregates, not related with aggresomes as their formation is actin and microtubule independent, are increased after 3-methyladenine treatment, an inhibitor of autophagy. Autophagy may thus be involved in their clearance (Figure 2, frame 2). This suggested protective role of autophagy was confirmed by another study in mice. C57BL/6 mice under HFD and db/db mouse, models for TIID, exhibited increased autophagic activity in pancreatic β -cells (Ebato *et al.*, 2008). This finding was reminiscent of a publication by Li and colleagues describing autophagosomes in β -cells from Zucker diabetic fatty rats (Li *et al.*, 2006b). A later work described that genetic ablation of autophagy genes specifically in β -cells, compromised islet cell structure and survival (Jung *et al.*, 2008). This leads to a loss of glucose tolerance and insulin secretion, exacerbated under HFD. These results were confirmed by another study showing that autophagy deficiency in β -cells led to ER-stress correlated with progression toward obesity in mice (Quan *et al.*, 2012). The progressive decreased activity of protective autophagy in TIID, could be linked to the accumulation of islet amyloid peptide (IAPP), as shown by Costes' group (Rivera *et al.*, 2014). IAPP aggregates, co-expressed with insulin, are associated with obesity and block autophagic flux. The direct link *in vivo*, between increased IAPP accumulation and impaired autophagy was recently demonstrated in a mouse model with specific expression of IAPP in β -cells, concomitant with *Atg7* deletion (Kim *et al.*, 2014). Autophagy thus allows the degradation of IAPP aggregates, preventing β -cell apoptosis and

diabetes. Interestingly, enhancement of autophagy by trehalose administration to HFD mice improved glucose tolerance, validating autophagy as a seducing target for treatment of TIID.

Autophagy is also important in the regulation of lipid metabolism (Figure 2, frame 3). A mechanism called lipophagy, is particularly important to control the load of lipid droplets in the adipose tissue. Ciriolo's team showed that the forkhead homeobox type protein O1 (FoxO1) was activated under nutrient restriction in a murine adipocyte cell line (Lettieri Barbato *et al.*, 2013). FoxO transcription factors are related to the regulation of lysosomal processes in general, and autophagy in particular, at the transcriptional level. In this context, FoxO1 activation led to improved lysosomal degradation of lipid droplets via lipophagy. The drug metformin used as a treatment for TIID, and known, to induce autophagy, led to the same effect. Thus autophagy regulates fat mass, lipid metabolism and the release of free fatty acids (FFA) by adipocytes.

The importance of autophagy on the onset of diabetes is not restricted to adipocytes and pancreatic islet cells. Mobilization of energy from muscles is also involved in TIID development and autophagy plays here a regulatory role also (Figure 2, frame 3). Beth Levine's group demonstrated that preventing Beclin1-induced autophagy upon starvation and exercise, compromised glucose metabolism in skeletal and cardiac muscles, predisposing to glucose intolerance (He *et al.*, 2012a).

In addition to the increasing evidence about the protective role of autophagy on pancreatic β -cell survival under stress, several studies highlighted a direct link between autophagy impairment and chronic inflammation characteristic of diabetes (Figure 2, frame 4). IL-1 β is known to participate in insulin resistance, by directly inhibiting Akt signalling after insulin receptor stimulation, and by TNF- α , also known to limit insulin effect. The uptake of the saturated fatty acid palmitate, has been shown to induce NALP3 inflammasome activation in macrophages via NADPH oxidase activation and ROS generation (Wen *et al.*, 2011). Inflammasome activation in HFD regimen is here shown to induce insulin resistance *in vivo*. In homeostatic condition, the AMP-activated protein kinase (AMPK) activity can limit ROS generation by favouring β -oxidation of FFA. Strikingly, palmitate treatment in addition to LPS stimulation led to a decrease of AMPK activation, and an inhibition of autophagic activity. This decrease is suspected to impair mitophagy and to favour mitochondrial ROS release as mentioned above, participating in the overexpression of IL-1 β .

In contrast an uncontrolled activation of autophagy could have deleterious effects on inflammation, in non-immune cells. The mouse beta cell line INS-1(823/13) treated with palmitate, over-expressed cathepsin B in an *Atg7*-dependent manner, cathepsin B being a lysosomal protease responsible for increased pro-inflammatory cytokine expression (Li *et al.*, 2013). Inflammasome activation in that case may be favoured by excessive autophagy, and IL-1 β production, contributing to cell stress and limited insulin secretion in response to glucose stimulation. Thus autophagy must be tightly regulated to prevent excessive inflammasome activation and IL-1 β production.

The majority of the previously cited studies, focused on one cells type either immune or non-immune. A recent report showed that global decrease of autophagic activity modelled by *Atg7^{+/-}* mice, led to low-grade inflammation associated to TIID after crossing with *ob/ob* mice (Lim *et al.*, 2014). This could explain why the risk to develop TIID increases with age when autophagic activity declines, and validate systemic autophagy modulation as a valuable therapeutic strategy.

Another manifestation of the metabolic syndrome tightly linked to inflammation is atherosclerosis (Figure 2, frame 5). HFD can lead to the accumulation of lipids under the arterial epithelium, in a region called intima. This region then expands while the activation of the epithelium leads to cytokine secretion that attracts monocytes, which will further differentiate into macrophages. Native or oxidized lipids, low density lipoproteins (LDL), are then uptaken via scavenger receptors by macrophages. Macrophages then accumulate, perpetuating inflammation by cytokine or ROS release, which will further oxidize lipids. Macrophages can also differentiate into foam cells, containing elevated stores of lipids. These cells are prone to apoptosis and necrosis, generating debris that will also contribute to fuelling inflammation.

As endothelial cells, vascular smooth muscle cells (VSMC) are also directly sensitive to inflammatory cytokines. Jia and colleagues showed that TNF- α activated autophagy in VSMC isolated from atherosclerotic plaques (Jia *et al.*, 2006). In this context autophagy is suspected to participate in plaque instability by contributing to stress and cell death. Interestingly, autophagosome formation and LC3 processing are detected in cells of the intima of atherosclerotic plaques, including macrophages (Martinet *et al.*, 2004; Martinet and De Meyer, 2009). To delineate the potential roles of autophagy activation in the plaque, two studies generated and described mouse models deficient for *Atg5* in macrophages, on a pro-atherosclerosis background (apolipoprotein null mice or LDL-receptor deficient mice; Liao *et al.*, 2012; Razani *et al.*, 2012). As expected, ATG5-deficient macrophages secreted larger amounts of IL-1 β after LPS stimulation than wild-type counterparts. Of note co-incubation with cholesterol crystals, abundant components of the plaque also activated the inflammasome probably via impairment of lysosomal degradation, what impacts autophagy. The inflammation induced by cytokines released from activated macrophages attracts immune cells and is accompanied by an increase in cell death.

Efferocytosis, phagocytic process dedicated to the elimination of cell debris, is also frequently described as defective in atherosclerotic plaques. Inhibited autophagy, in the work of Liao and collaborators, leads to sensitization of macrophages to cell death after treatment with an oxisterol found in plaques and known to induce ER-stress. At the same time oxidative stress is increased in macrophages deficient for autophagy, rendering them less sensitive to clearance by surrounding phagocytes.

Autophagy is also important for lipid degradation by lysosomes in foam cells and for the subsequent cholesterol efflux (Ouimet *et al.*, 2011). In this context the induction of autophagy is induced in macrophages by the regulation of the ataxia telangiectasia mutated (Atm)-mammalian target of rapamycin pathway (Le Guezennec *et al.*, 2012). In line with this observation, impaired autophagy in advanced plaques, could contribute to foam cell apoptosis, lipid release, and cell debris accumulation, again contributing to inflammation. Autophagy can thus protect cells from death or contribute to their elimination although the latter mechanism is not totally understood. Autophagy in phagocytes also contributes to efferocytosis and defects in this specialized LC3-assisted phagocytosis (LAP) could also be involved in plaque formation (Martinez *et al.*, 2011).

Thus autophagy appears as an induced protective mechanism against plaque formation. Its progressive down regulation may participate to plaque evolution although the causes are not totally understood. Progressive inhibition of autophagy with age by increase of MiR-216a expression in endothelial cells may be a causal factor (Menghini *et al.*, 2014). Aside from aging, and MiR expression, complex genetic background could participate in atherosclerosis susceptibility. A better understanding of the role of autophagy in metabolic disorders in general, partly linked to life-style and alimentation, could improve the existing treatments by limiting chronic inflammation.

Autophagy and autoimmune chronic inflammation

Autoinflammatory diseases are chronic inflammation, clearly involving immune reaction toward autoantigens, *i.e.* molecules encoded by the self-genome. These disorders, as other auto inflammatory conditions, are linked to a combination between environmental factors and genetic background. Both innate and adaptive immunity deregulation are prone to trigger autoimmunity. Pro-inflammatory background is eager to favour autoimmunity occurrence, and here again autophagy is central.

As for CD, GWAS designated new candidate genes for the development of autoimmunity (Figure 3, frame 1). Among them several were linked to the development of systemic lupus erythematosus (SLE). This systemic autoimmune disease is characterized by the production of autoantibodies directed against nuclear auto antigens. Antibody deposits lead to chronic inflammation in several tissues like skin, kidney, cardiovascular system, and nervous system. In 2008, SNPs in *ATG5* gene locus were linked to the development of SLE (Harley *et al.*, 2008). Other studies confirmed the potential association in Asian population (Zhou *et al.*, 2011b) while other failed to identify *ATG5* polymorphisms in a Finnish cohort of patients (Jarvinen *et al.*, 2012).

The functional relevance of SNPs identified in *ATG5* locus is not proven. One study demonstrated that one allelic variant more frequent in SLE patients was associated with increased *ATG5* mRNA

expression (Zhou *et al.*, 2011b). Interestingly, another study focusing on asthma, also described SNPs in *ATG5* locus associated with the pathology, and with an increased activity of the promoter (Martin *et al.*, 2012). Correlatively, *ATG5* mRNA expression is increased in acute asthma. Although the direct link between *ATG5* allelic variants and its expression in SLE is not established, other genes regulating autophagy have been identified in GWAS such as DNA-damage regulated autophagy modulator 1 (Yang *et al.*, 2013a), which is involved in autophagy induction upon genetic stress via p53 activation.

Genetic links with other autoimmune diseases are less clear. Polymorphisms on *ATG5* were identified in rheumatoid arthritis (RA) context but could not be definitely confirmed after stringent statistical correction (Orozco *et al.*, 2011). RA is characterized by autoantibody secretion responsible for systemic manifestations and T cell-related inflammation, directly linked to cartilage destruction. Genetic predisposition in relation to autophagy has also been suggested for multiple sclerosis (MS). This organ-specific pathology results from damage in the nervous system by inflammation-induced demyelination. T cells are the main pathogenic actors in this context. SNPs in the putative *ATG5* promoter region have been recently described as associated with MS (Mayes *et al.*, 2014) while another study failed to prove any association with the disease (Cai *et al.*, 2014). As for lupus, even if direct genetic predisposition linked to *ATGs* cannot be formally proved for RA and MS, indirect causes could impair autophagic activity, and favour chronic inflammation in these contexts.

Systemic pathologies like SLE and RA are linked to aberrant production of and/or reaction towards type I IFN and TNF- α respectively (Figure 3, frame 2). Given the important relationship between *ATG5/ATG12* and IFN-I secretion, by regulation of RLR and TLR availability for their ligands, it is possible that impairment of autophagic activity contributes to increased IFN-I production. Plasmacytoid dendritic cells (pDC) are important producers of IFN- α , especially via recognition by the intracellular sensor TLR9. Interestingly, a form of LAP has been linked in these cells to translocation of antibody-associated DNA complexes after recognition via Fc receptors (Henault *et al.*, 2012). Autophagy machinery in this context was shown to contribute to translocation of endocytosed DNA to TLR9 positive compartments, inducing IFN- α secretion. A deregulation in this traffic route could be relevant in SLE as insufficient clearance of nuclear debris, associated to antibodies, are thought to trigger and/or to sustain inflammation. Aside for insufficient clearance of debris resulting from apoptotic cells, DNA can also be released from activated neutrophils. These neutrophil-extracellular traps (NETs), produced in excess, could contribute to provide TLR9 ligands phagocytosed by pDCs (Lande *et al.*, 2011). Interestingly, autophagy has been shown to participate in NET release (Remijsen *et al.*, 2011). Future studies should be done on lupus animal models or with SLE patient's sample to assess a potential link between deregulated autophagy and IFN-I secretion.

In contrast more experimental results have been obtained regarding the interplays between TNF- α , autophagy and RA. TNF- α is an inducer of autophagy in several cell types as vascular smooth muscles

(Jia *et al.*, 2006), skeletal muscles (Keller *et al.*, 2011), epithelial cells but also in immune cells like macrophages (Andrade *et al.*, 2006). TNF- α has been shown to induce autophagy in RA synovial fibroblasts (RASf) isolated from patients (Connor *et al.*, 2012). These cells are central to the development of cartilage inflammation thanks to the inflammatory cytokines and growth factors they secrete. These results are in line with other studies (Kato *et al.*, 2014; Shin *et al.*, 2010), which showed that autophagy is induced under ER-stress and further increased by TNF- α . Autophagy protects fibroblasts from cell death, in concert with CCAAT/-enhancer-binding protein homologous protein under-expression, and probably contributes to their abnormal survival and secretion of growth factors. The microbial product LPS in complexes with damage associated molecular pattern HMGB1, are known to trigger experimental arthritis in mice. In the human pathology, these complexes could result from cell debris on a non-sterile inflammation site. LPS-HMGB1 complexes favour the differentiation and survival of RASf, concomitant with autophagy activation (Qin *et al.*, 2014), again pointing out a protective role of autophagy on RASf and thus on the maintenance of inflammation. Autophagic vacuoles and expression of Beclin1 and ATG7 are also increased in osteoclasts from RA patients (Lin *et al.*, 2013). Autophagy in this work was shown to help osteoclastogenesis and contribute to bone-resorption in a TNF α -dependent manner.

SLE and RA have in common the chronic generation of cellular debris at the site of inflammation. Adequate clearance of cell remnants is thought to be central to the prevention of autoimmunity. Numerous mouse models deficient for apoptotic cell clearance are prone to lupus-like pathologies. A specialized form of LAP, involving LC3, has been shown to be implicated in the elimination of dead cells by macrophages (Martinez *et al.*, 2011). Invalidation of this pathway leads to increased pro-inflammatory cytokine production by macrophages. The *in vivo* relevance of this observation and the potential link with human SLE are still to be demonstrated.

The existence of a pro-inflammatory background contributes to break the tolerance against auto antigens. A chronic inflammatory microenvironment is eager to activate APCs that become abnormally able to prime T cells against self-peptides. Autophagy plays an important role in antigen presentation, both by MHC class I and II molecules. Autophagy has been shown to be necessary for the presentation of endogenous self-peptides by thymic epithelial cells (TECs). Mice with autophagy-deficient thymus (Nedjic *et al.*, 2008) or conditionally deleted for *Atg5* specifically in TECs (Aichinger *et al.*, 2013), exhibit abnormal central selection of T cells. The first study describes an autoimmune phenotype consisting on colitis. Defects in central tolerance are not formally proved in the majority of autoimmune diseases. It remains however possible that defects in autophagy activity in the thymus, associated for example with age (when inflammatory diseases become more frequent), contributes to skew T cell repertoire toward autoimmunity. Moreover, defects in Treg generation and survival are associated with colitis, autoimmune phenotype observed on the study published by

Nedjic and colleagues (Nedjic *et al.*, 2008). It is thus possible that autophagy defects in the thymus contribute to abnormal peripheral tolerance.

A role for autophagy in autoantigen presentation in the periphery is also plausible. Indeed, autophagy contributes to the presentation of cytosolic epitopes to CD4 T cells, including self-epitopes, which could be quite relevant for autoantigen presentation. A recent study showed that specific deletion of autophagy in DCs limits the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), murine model for human MS (Bhattacharya *et al.*, 2014). The amelioration of the clinical score was correlated with a decrease of CD4 T cell priming. Although not yet proven in the case of RA, autophagy could contribute to autoepitope presentation. Unanue's group showed that autophagy in APCs, i.e. DCs, macrophages and B lymphocytes, contributed to the presentation of citrullinated epitopes (Ireland and Unanue, 2011). Interestingly citrullinated peptides are common antigens in RA, and aberrant autophagy could contribute to generate such autoantigens. Autophagic activity has been shown to be upregulated in B cells from SLE patients and mouse models for lupus (Clarke *et al.*, 2014). Increased autophagy could then contribute to autoantigen presentation, including citrullinated epitopes, but to date, no experimental proof has been provided.

The initial peripheral break of tolerance in autoimmune diseases leads to abnormal autoreactive lymphocyte survival (Figure 3, frame 3). Here again, deregulated autophagy can contribute to the chronicity of autoimmune inflammation. Autophagy plays an important role in T lymphocyte survival and polarization. The first study suggesting a link between deregulated autophagy in lymphocytes was performed in T cells from MS patients. ATG5 expression was found increased in T cells isolated from EAE mice and MS patients (Alirezai *et al.*, 2009). A work performed in our laboratory identified autophagy deregulation in T cells from both mouse models for lupus and SLE patients (Gros *et al.*, 2012). The autophagic vacuole load in T cells was mainly observable under T cell receptor (TCR) related stimulation in mice and was increasing with age, contrary to control mice. An increase in autophagic compartments in SLE T cells was confirmed by three other studies (Alessandri *et al.*, 2012; Caza *et al.*, 2014; Clarke *et al.*, 2014). Interestingly the study by Alessandri and colleagues showed an increase in the autophagosome-associated marker LC3, especially in naive CD4 T cells suggesting a predisposed deregulation. Our study including induction of systemic acute inflammation in normal mice showed that the activation of T cells in this context, was not sufficient to increase autophagy. Pierdomonici's group conclude that accumulation of autophagosomes is due to a blockade of autophagy rather than increased autophagy induction. We cannot formally exclude this hypothesis as our observation could result from disequilibrium between induction and degradation of autophagic vacuoles. However in our setting, the blockade was not total as LC3 was still accumulated after treatment with lysosomal protease inhibitors. Moreover Alessandri and colleagues use starvation or treatment with autologous serum from SLE patients, as triggers of autophagy.

Interestingly, they show that SLE serum can induce autophagy in normal T cells, reminiscent of another study identifying the pro-autophagic impact of SLE serum on neuronal cell line (Towns *et al.*, 2005), but not in SLE T cells. It is possible however that SLE T cells cannot further increase autophagy under metabolic demand or when re-exposed to their already stimulating environment. It is also possible that other pathways like the TCR pathway, relevant for auto reactive T cell activation, can contribute to elevate LC3 levels. In any case, further investigation is needed to discriminate at which level the deregulation occurs, and if an increase in autophagosome generation or a decrease in degradation, or both, could be involved. Furthermore, metabolic versus antigen-induced autophagic stimulations should be distinguished as their regulations and outcomes may be different.

The regulation of autophagy in T cells from RA has also been recently studied. Weyand's team described a deficiency in glucose metabolism in CD4 T cells from RA, in response to TCR stimulation (Yang *et al.*, 2013b). This was associated with insufficient 6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase 3 (PFKFB3) induction. This impairment in energy mobilization could explain part of the apoptosis-prone phenotype of RA T cells. Interestingly, autophagy was also impaired by PFKFB3 deficiency, contributing to the difficulty to mobilize energy during activation.

Thus autophagy could play dual roles in autoreactive T cells, contributing to their abnormal survival when increased and sensitizing to apoptosis when impaired. In the context of MS, inhibiting autophagy in T cells from autoimmune diseases could be a therapeutic option as shown in the study by Kovacs and colleagues. They demonstrate that mice with specific deletion of Beclin1 in T cells are less sensitive to EAE induction. This was correlated by increased cell death, especially for Th1 cells, pointing out an interesting regulatory role of autophagy on Th cell polarization. The induction of apoptosis in the absence of autophagy could be related, in this experimental model to increased stores of pro-caspases.

In RA, and SLE, autoantibody secretion is part of the pathology. Deregulation of B lymphocyte homeostasis is thus one typical feature of these systemic autoimmune diseases. Clarke and colleagues were the first to describe autophagy increase in B cells from lupus prone mouse model NZB/W, and from SLE patients (Clarke *et al.*, 2014). Two major studies showed a role for autophagy in memory B cell and plasma cell survival (Chen *et al.*, 2014b; Pengo *et al.*, 2013). An increase in autophagy could contribute to the abnormal survival of autoreactive B lymphocytes and autoantibody secreting plasma cells. It thus appears that modulation of autophagy in lymphocytes could be a beneficial strategy to limit auto reactive lymphocyte survival. Moreover, autophagy is suspected to play a role in the relocalization of DNA containing antigenic complexes toward TLR9 positive endosomes (Chaturvedi *et al.*, 2008). Autophagy machinery could thus contribute to B cell hyperactivity against nuclear antigens. Studies on mouse models with autoimmune-prone

backgrounds, also deficient for autophagy in lymphocytes, could help decipher the role of ATGs on the development of the pathology.

Of much interest, therapies like rapamycin, hydroxychloroquine or P140 peptide (Page *et al.*, 2011a), are known to modulate autophagic activity. It would be interesting to investigate if such therapeutic effects are actually linked to modulation of autophagy in immune cells like APCs or lymphocytes.

Conclusion

Autophagy is a physiological response, at the crossroads between energy sensing, and reaction to stress induced by tissue damage and/or by infection. This mechanism is thus a master integrator of both innate and adaptive immunity to the surrounding environment, by regulation of inflammation. Both genetic and environmental factors could contribute to the deregulation of autophagy. Allelic variations on autophagy genes seem to be strongly related to the susceptibility to develop autoinflammatory diseases like CD. Other polymorphisms on ATGs suggest a role for autophagy deregulation in autoimmune diseases, like SLE, RA and MS, although the functional relevance of these variants remains to be fully determined. Environmental factors like infection, or changes in metabolic equilibrium linked to diet, or genetically programmed like aging, can contribute to provide a low-grade inflammatory environment, prone to trigger chronic inflammation. Autophagy involvement in preventing inflammation linked to these three causes, linked to TIID and atherosclerosis, is now clearly demonstrated. Apart from RA, MS, SLE and CD, other inflammatory pathologies could also imply autophagy deregulation. Interestingly, therapeutic molecules modulating the autophagy process have shown efficacy in autoinflammatory diseases like metformin for TIID, rapamycin, hydroxychloroquine and P140 peptide, in autoimmune diseases. A better understanding about the precise roles of autophagy in chronic inflammation will help design new molecules, and new therapeutic approaches, to treat these complex diseases.

Legend to Figures

Figure 1: possible involvement of autophagy in CD development

1. During bacterial infection of phagocytes or epithelial cells, ATG16L1 is recruited to the plasma membrane and can associate with NOD1 or NOD2. This induces the elimination of the bacteria through xenophagy. NOD-dependent xenophagy is compromised when ATG16L1^{T300A} protein variant is expressed. ATG16L1^{T300A} variant is more sensitive to degradation by caspase 3 and interact less with NOD1/NOD2. The *IRGM*, identified as a candidate gene in CD development, encodes a protein known to also induce xenophagy in response to mycobacterial infection. *IRGM* variants may also be involved in xenophagy impairment and thus in decreased bacterial clearance.

2. MDP induces autophagy in a NOD2-dependant manner, in APCs. Autophagy proteins ATG16L1, ATG5 and ATG7 are implicated in antigen presentation via MHC-II molecules. NOD2 and ATG16L1^{T300A} variants are associated to decreased antigen presentation of bacteria associated antigens. This could contribute to abnormal regulation of adaptive immunity and control of the commensal flora. ATG16L1 and *IRGM* deficiencies are correlated with increased duration of synpatic contact between T cells and dendritic cells, skewing T cell polarization toward Th17 pro-inflammatory phenotype.

3. NOD2 loss of function mutations lead to a decreased secretion of antibacterial peptides by Paneth cells located in the gut epithelium, inhibiting bacterial clearance thus contributing to a hyper inflammatory environment. Autophagy proteins ATG16L1 and ATG5 are involved in granule exocytosis by Paneth cells, in response to NOD2 stimulation, contributing to bacterial clearance in the gut. ATG16L1^{T300A} polymorphism is linked to reduced antimicrobial peptide secretion, particularly under ER-stress and/or viral infection.

4. ATG16L1 deficiency in macrophages is associated with an increased pro-inflammatory cytokine (IL-1 β and IL18) secretion dependent on inflammasome activation after PRR stimulation. Autophagy proteins ATG5, ATG7 and ATG16L1 are known to downregulate inflammasome activity. ATG16L1 deficient and ATG16L1^{T300A} mice are more prone to activate inflammasome, suggesting the importance of autophagy in inflammation response regulation in CD. An autophagy-independent role for ATG16L1 is the control of IL-8 secretion in response to NOD receptors stimulation.

Abbreviations: ATG, autophagy-related genes; NOD, nucleotide oligomerization domain; IRGM, immune related GTPase; CD, Crohn's disease; MDP, muramyl dipeptide; MHC-II, major histocompatibility complex class II; IL, interleukin; PRR, pattern recognition receptors.

Figure 2: implications of autophagy in the metabolic syndrome

1. Autophagy activity declines with age and can be downregulated by HFD.
2. Autophagy directly contributes to islet beta survival and function by limiting accumulation of protein aggregates and ER-stress.
3. Lipophagy, a form of autophagy involved in lipid droplets elimination, regulating fat mass and lipid release, could also be impaired by autophagic activity decline. Moreover autophagic activity, specially induced during exercise, is also important for glucose tolerance in muscles.
4. Inflammasome activity in macrophages is increased by HFD, including by the direct impact of lipid uptake, like fatty acids and cholesterol. This inflammatory activity is further increased by autophagy decline. IL-1 β released in this context can interfere with insulin signaling, contributing to glucose intolerance.
5. During atherosclerotic plaque formation, inflammation contributes to the recruitment of macrophages that can differentiate into foam cells. Autophagy impairment contributes to inflammation, recruitment of inflammatory cells and foam cell apoptosis. The debris generated by dead cells and the lipids released in the intima can further enhance inflammation. IL-1 β , over produced by macrophages when autophagy is impaired, can also inhibit efferocytosis, which contributes to the accumulation of debris.

Abbreviations: HFD, high fat diet; ER, endoplasmic reticulum; IL, interleukin.

Figure 3: mechanisms relating autophagy deregulation to autoimmune disorders

1. Environmental factors and genetic background could contribute to the deregulation of autophagy. Polymorphisms of unknown functional relevance have been linked to SLE and MS susceptibility. Autophagy deregulation can affect both innate and adaptive immune responses.

2. Autophagy could be involved in the deregulation of innate immunity. Autophagy regulates IFN- λ production in response to nucleic acid-containing antigens, which is relevant to SLE. Autophagy is induced in RASF upon TNF- α stimulation. TNF- α is overexpressed in RA. Autophagy in response to TNF- α contributes to survival of RASF and activates osteoclastogenesis, leading to bone resorption. Autophagy contributes to clearance of dead cells by macrophages. The latter mechanism is defective in SLE and its impairment could also contribute to fuel inflammation in RA and MS. Excessive NETs release by neutrophils, mechanism dependent on autophagy, could also lead to accumulation of debris containing nucleic acids, eliciting inflammation in SLE. Autophagy impacts antigen presentation by macrophages and DCs and could participate in autoantigen presentation in RA and SLE. This has been shown for the EAE model. Autophagy is also involved in the presentation of citrullinated epitopes, frequent in RA, to T cells.

3. A part from antigen presentation, defects of autophagy, intrinsic to adaptive immune system, could contribute to autoimmune disorders. Autophagy is implicated in T lymphocyte homeostasis and in the survival of memory B cells and plasma cells. This could contribute to abnormal autoreactive T cell survival in RA, SLE and in MS leading to tissue damage. In RA and SLE, it could contribute to the chronic secretion of pathogenic autoantibodies.

Abbreviations: Atg, autophagy-related gene; DRAM1, DNA damaged-related autophagy modulator 1; IFN, interferon; SLE, systemic lupus erythematosus; MS, multiple sclerosis; RA, rheumatoid arthritis; IFN, interferon; TNF, tumour necrosis factor; RA, rheumatoid arthritis; RASF, RA synovial fibroblasts; NET, neutrophil extracellular trap; DC, dendritic cells; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis.

Acknowledgments

The authors, all working in Pr Sylviane's Muller group, would like to thank her for scientific and material support, as well as for fruitful discussions. Research in SM's laboratory is financially supported by the French Centre National de la Recherche Scientifique and the Laboratory of Excellence Medalis (ANR-10-LABX-0034), Initiative of Excellence (IdEx), Strasbourg University. DM is a recipient of a PhD fellowship from Fond National de Recherche, Luxembourg. JA is a recipient of a PhD grant from Association de Recherche contre le Cancer (ARC)

We thank the authours of Servier Medical arts, providing precious frames used in our figures.

Conflicts of interests

The authors declare no conflicts of interests

Figure 1

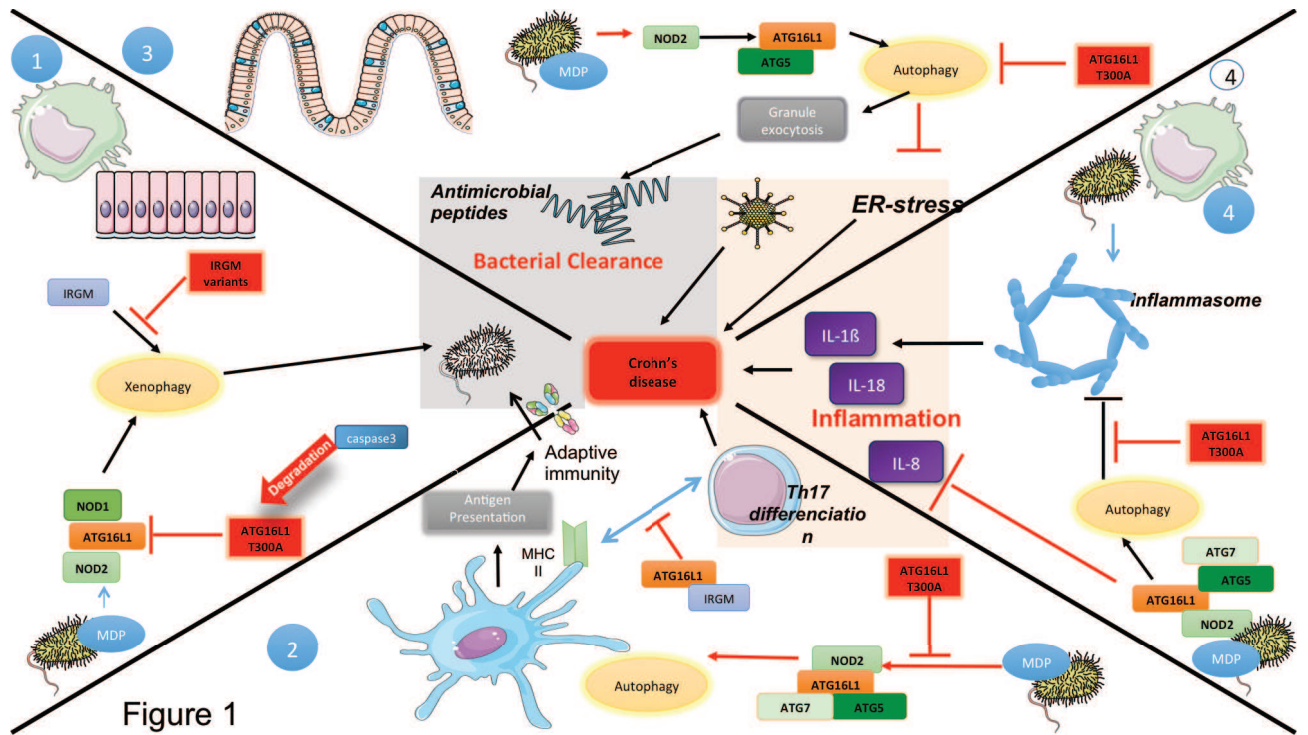


Figure 2

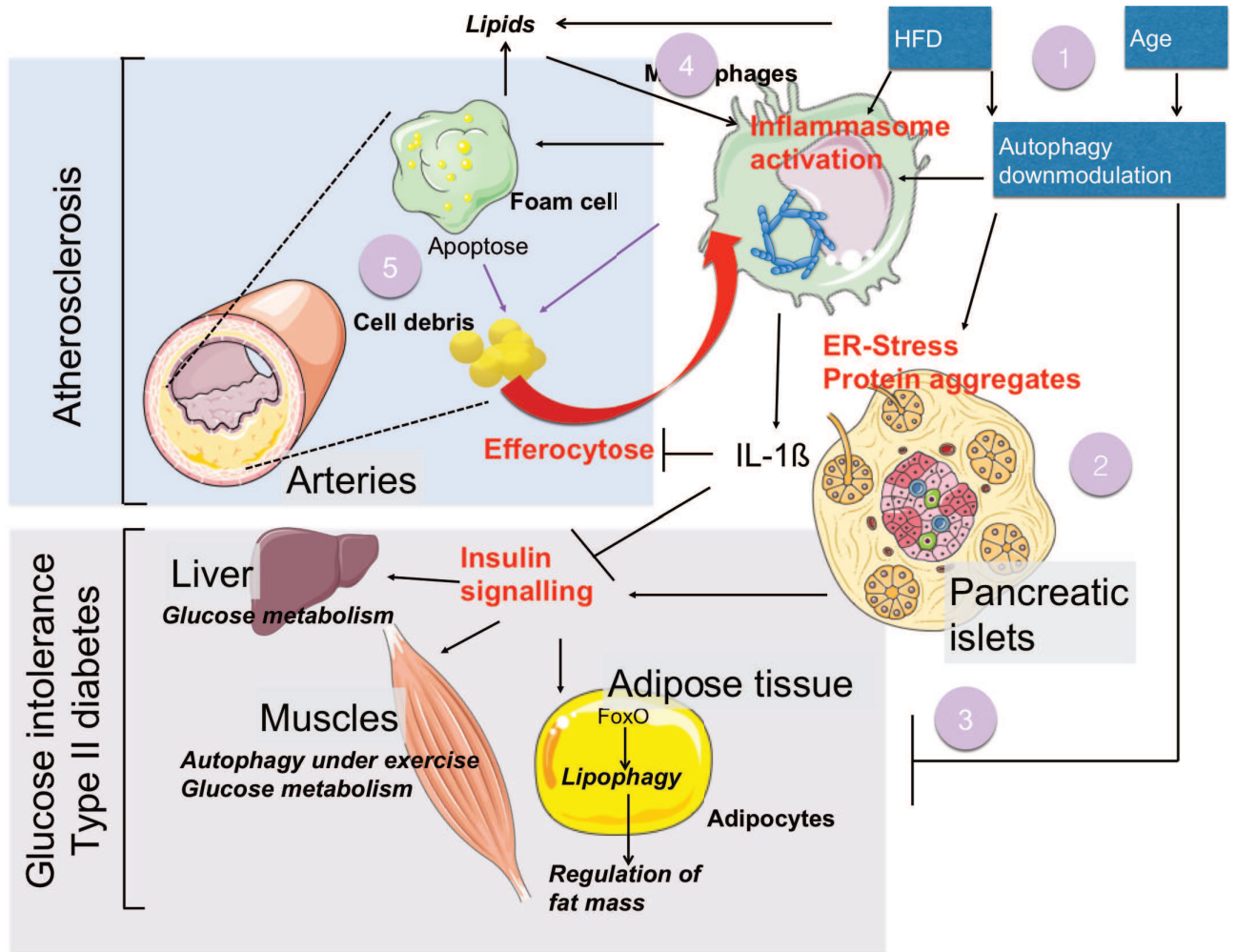
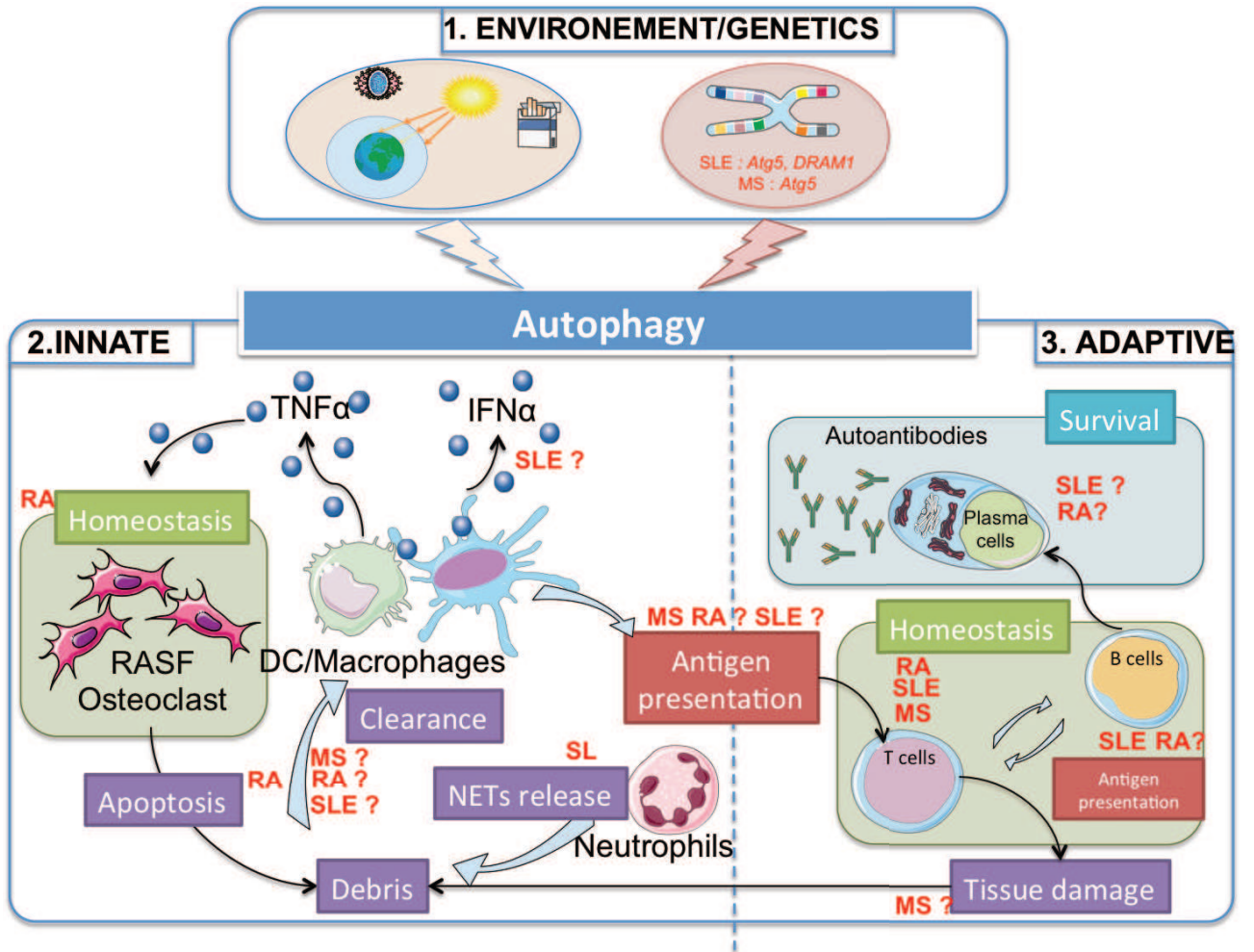


Figure 3



BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

Adolph, T.E., Tomczak, M.F., Niederreiter, L., Ko, H.J., Bock, J., Martinez-Naves, E., Glickman, J.N., Tschurtschenthaler, M., Hartwig, J., Hosomi, S., *et al.* (2013). **Paneth cells as a site of origin for intestinal inflammation.** *Nature* 503, 272-276.

Aguilera, M.O., Beron, W., and Colombo, M.I. (2012). **The actin cytoskeleton participates in the early events of autophagosome formation upon starvation induced autophagy.** *Autophagy* 8, 1590-1603.

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

Alessandri, C., Barbati, C., Vacirca, D., Piscopo, P., Confaloni, A., Sanchez, M., Maselli, A., Colasanti, T., Conti, F., Truglia, S., *et al.* (2012). **T lymphocytes from patients with systemic lupus erythematosus are resistant to induction of autophagy.** *FASEB J* 26, 4722-4732.

Alirezai, M., Fox, H.S., Flynn, C.T., Moore, C.S., Hebb, A.L., Frausto, R.F., Bhan, V., Kiosses, W.B., Whitton, J.L., Robertson, G.S., *et al.* (2009). **Elevated ATG5 expression in autoimmune demyelination and multiple sclerosis.** *Autophagy* 5, 152-158.

Amaravadi, R.K., Yu, D., Lum, J.J., Bui, T., Christophorou, M.A., Evan, G.I., Thomas-Tikhonenko, A., and Thompson, C.B. (2007). **Autophagy inhibition enhances therapy-induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma.** *J Clin Invest* 117, 326-336.

Anand, P.K., Tait, S.W., Lamkanfi, M., Amer, A.O., Nunez, G., Pages, G., Pouyssegur, J., McGargill, M.A., Green, D.R., and Kanneganti, T.D. (2011). **TLR2 and RIP2 pathways mediate autophagy of *Listeria monocytogenes* via extracellular signal-regulated kinase (ERK) activation.** *J Biol Chem* 286, 42981-42991.

Andrade, R.M., Wessendarp, M., Gubbels, M.-J., Striepen, B., and Subauste, C.S. (2006). **CD40 induces macrophage anti-*Toxoplasma gondii* activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes.** *The Journal of Clinical Investigation* 116, 2366-2377.

Arsov, I., Adebayo, A., Kucerova-Levisohn, M., Haye, J., MacNeil, M., Papavasiliou, F.N., Yue, Z., and Ortiz, B.D. (2011). **A role for autophagic protein beclin 1 early in lymphocyte development.** *J Immunol* 186, 2201-2209.

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

Ashrafi, G., and Schwarz, T.L. (2013). **The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria.** *Cell Death Differ* 20, 31-42.

Atlashkin, V., Kreykenbohm, V., Eskelinen, E.L., Wenzel, D., Fayyazi, A., and Fischer von Mollard, G. (2003). **Deletion of the SNARE vti1b in mice results in the loss of a single SNARE partner, syntaxin 8.** *Mol Cell Biol* 23, 5198-5207.

Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H.L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N.T. (2008). **Autophagosome formation from membrane compartments enriched in**

phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *The Journal of Cell Biology* 182, 685-701.

Baba, M., Osumi, M., and Ohsumi, Y. (1995). **Analysis of the membrane structures involved in autophagy in yeast by freeze-replica method.** *Cell Struct Funct* 20, 465-471.

Baba, M., Osumi, M., Scott, S.V., Klionsky, D.J., and Ohsumi, Y. (1997). **Two distinct pathways for targeting proteins from the cytoplasm to the vacuole/lysosome.** *J Cell Biol* 139, 1687-1695.

Baerga, R., Zhang, Y., Chen, P.-H., Goldman, S., and Jin, S.V. (2014). **Targeted deletion of autophagy-related 5 (atg5) impairs adipogenesis in a cellular model and in mice.** *Autophagy* 5, 1118-1130.

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

Barrett, J.C., Hansoul, S., Nicolae, D.L., Cho, J.H., Duerr, R.H., Rioux, J.D., Brant, S.R., Silverberg, M.S., Taylor, K.D., Barmada, M.M., *et al.* (2008a). **Genome-wide association defines more than 30 distinct susceptibility loci for Crohn's disease.** *Nat Genet* 40, 955-962.

Batista, F.D., Iber, D., and Neuberger, M.S. (2001). **B cells acquire antigen from target cells after synapse formation.** *Nature* 411, 489-494.

Batista, F.D., and Neuberger, M.S. (2000). **B cells extract and present immobilized antigen: implications for affinity discrimination,** *The EMBO J* 19, No.4 pp. 513-520.

Baumann, I., Kolowos, W., Voll, R.E., Manger, B., Gaipf, U., Neuhuber, W.L., Kirchner, T., Kalden, J.R., and Herrmann, M. (2002). **Impaired uptake of apoptotic cells into tingible body macrophages in germinal centers of patients with systemic lupus erythematosus.** *Arthritis Rheum* 46, 191-201.

Beaulaton, J., and Lockshin, R.A. (1977). **Ultrastructural study of the normal degeneration of the intersegmental muscles of *Antheraea polyphemus* and *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera) with particular reference of cellular autophagy.** *J Morphol* 154, 39-57.

Bejarano, E., Yuste, A., Patel, B., Stout Jr, R.F., Spray, D.C., and Cuervo, A.M. (2014). **Connexins modulate autophagosome biogenesis.** *Nat Cell Biol* 16, 401-414.

Berberich, S., Förster, R., and Pabst, O. (2007). **The peritoneal micromilieu commits B cells to home to body cavities and the small intestine,** *Blood* 109, 4627-34.

Bernales, S., McDonald, K.L., and Walter, P. (2006). **Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response.** *PLoS Biol* 4, e423.

Beutler, B. (2004). **Innate immunity: an overview.** *Molecular Immunology* 40, 845-859.

Bhattacharya, A., Parillon, X., Zeng, S., Han, S., and Eissa, N.T. (2014). **Deficiency of autophagy in dendritic cells protects against experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J Biol Chem* 289, 26525-26532.

Bijl, M., Reefman, E., Horst, G., Limburg, P.C., and Kallenberg, C.G. (2006). **Reduced uptake of apoptotic cells by macrophages in systemic lupus erythematosus: correlates with decreased serum levels of complement.** *Ann Rheum Dis* 65, 57-63.

Bjorkoy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Overvatn, A., Stenmark, H., and Johansen, T. (2005). **p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death.** *J Cell Biol* 171, 603-614.

Blander, J.M., and Medzhitov, R. (2004). **Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors.** *Science* 304, 1014-1018.

Blum, J.S., Wearsch, P.A., and Cresswell, P. (2013). **Pathways of antigen processing.** *Annu Rev Immunol* 31, 443-473.

Bolender, R.P., and Weibel, E.R. (1973). **A morphometric study of the removal of phenobarbital-induced membranes from hepatocytes after cessation of threatment.** *J Cell Biol* 56, 746-761.

Bostrom, P., Andersson, L., Rutberg, M., Perman, J., Lidberg, U., Johansson, B.R., Fernandez-Rodriguez, J., Ericson, J., Nilsson, T., Boren, J., *et al.* (2007). **SNARE proteins mediate fusion between cytosolic lipid droplets and are implicated in insulin sensitivity.** *Nat Cell Biol* 9, 1286-1293.

Brest, P., Lapaquette, P., Souidi, M., Lebrigand, K., Cesaro, A., Vouret-Craviari, V., Mari, B., Barbry, P., Mosnier, J.F., Hebuterne, X., *et al.* (2011). **A synonymous variant in IRGM alters a binding site for miR-196 and causes deregulation of IRGM-dependent xenophagy in Crohn's disease.** *Nat Genet* 43, 242-245.

Bruns, C., McCaffery, J.M., Curwin, A.J., Duran, J.M., and Malhotra, V. (2011). **Biogenesis of a novel compartment for autophagosome-mediated unconventional protein secretion.** *J Cell Biol* 195, 979-992.

Burbage, M., Keppler, S.J., Gasparrini, F., Martínez-Martín, N., Gaya, M., Feest, C., Domart, M.-C., Brakebusch, C., Collinson, L., Bruckbauer, A., *et al.* (2015). **Cdc42 is a key regulator of B cell differentiation and is required for antiviral humoral immunity.** *The Journal of Experimental Medicine* 212, 53-72.

Cabral, M., Anjard, C., Malhotra, V., Loomis, W.F., and Kuspa, A. (2010). **Unconventional secretion of AcbA in Dictyostelium discoideum through a vesicular intermediate.** *Eukaryot Cell* 9, 1009-1017.

Cadwell, K., Liu, J.Y., Brown, S.L., Miyoshi, H., Loh, J., Lennerz, J.K., Kishi, C., Kc, W., Carrero, J.A., Hunt, S., *et al.* (2008). **A key role for autophagy and the autophagy gene Atg16L1 in mouse and human intestinal Paneth cells.** *Nature* 456, 259-263.

Cadwell, K., Patel, K.K., Komatsu, M., Virgin, H.W.t., and Stappenbeck, T.S. (2009). **A common role for Atg16L1, Atg5 and Atg7 in small intestinal Paneth cells and Crohn disease.** *Autophagy* 5, 250-252.

Cadwell, K., Patel, K.K., Maloney, N.S., Liu, T.C., Ng, A.C., Storer, C.E., Head, R.D., Xavier, R., Stappenbeck, T.S., and Virgin, H.W. (2010). **Virus-plus-susceptibility gene interaction determines Crohn's disease gene Atg16L1 phenotypes in intestine.** *Cell* 141, 1135-1145.

Cai, P.P., Wang, H.X., Zhuang, J.C., Liu, Q.B., Zhao, G.X., Li, Z.X., and Wu, Z.Y. (2014). **Variants of autophagy-related gene 5 are associated with neuromyelitis optica in the Southern Han Chinese population.** *Autoimmunity*, 1-4.

Campbell, G.R., and Spector, S.A. (2012). **Vitamin D inhibits human immunodeficiency virus type 1 and *Mycobacterium tuberculosis* infection in macrophages through the induction of autophagy.** *PLoS Pathog* 8, e1002689.

Cariappa, A., Mazo, I.B., Chase, C., Shi, H.N., Liu, H., Li, Q., Rose, H., Leung, H., Cherayil, B.J., Russell, P., *et al.* (2005). **Perisinusoidal B Cells in the Bone Marrow Participate in T-Independent Responses to Blood-Borne Microbes.** *Immunity* 23, 397-407.

Carrasco, Y.R., and Batista, F.D. (2007). **B cells acquire particulate antigen in a macrophage-rich area at the boundary between the follicle and the subcapsular sinus of the lymph node.** *Immunity* 27, 160-171.

Castillo, E.F., Dekonenko, A., Arko-Mensah, J., Mandell, M.A., Dupont, N., Jiang, S., Delgado-Vargas, M., Timmins, G.S., Bhattacharya, D., Yang, H., *et al.* (2012). **Autophagy protects against active tuberculosis by suppressing bacterial burden and inflammation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, E3168-3176.

Caza, T.N., Fernandez, D.R., Talaber, G., Oaks, Z., Haas, M., Madaio, M.P., Lai, Z.W., Miklossy, G., Singh, R.R., Chudakov, D.M., *et al.* (2014). **HRES-1/Rab4-mediated depletion of Drp1 impairs mitochondrial homeostasis and represents a target for treatment in SLE.** *Ann Rheum Dis* 73, 1888-1897.

Carboni, S., Gentili, M., and Manel, N. (2013). **Diversity of pathogen sensors in dendritic cells.** *Adv Immunol* 120, 211-237.

Chaturvedi, A., Dorward, D., and Pierce, S.K. (2008). **The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyperresponses to DNA-containing antigens.** *Immunity* 28, 799-809.

Chaugule, V.K., Burchell, L., Barber, K.R., Sidhu, A., Leslie, S.J., Shaw, G.S., and Walden, H. (2011). **Autoregulation of Parkin activity through its ubiquitin-like domain.** *EMBO J* 30, 2853-2867.

Chen, G., Han, Z., Feng, D., Chen, Y., Chen, L., Wu, H., Huang, L., Zhou, C., Cai, X., Fu, C., *et al.* (2014a). **A regulatory signaling loop comprising the PGAM5 phosphatase and CK2 controls receptor-mediated mitophagy.** *Mol Cell* 54, 362-377.

Chen, M., Hong, M.J., Sun, H., Wang, L., Shi, X., Gilbert, B.E., Corry, D.B., Kheradmand, F., and Wang, J. (2014b). **Essential role for autophagy in the maintenance of immunological memory against influenza infection.** *Nat Med* 20, 503-510.

Chen, M., Kodali, S., Jang, A., Kuai, L., and Wang, J. (2015). **Requirement for Autophagy in the Long-Term Persistence but not Initial Formation of Memory B cells.** *J Immunol* 194, 2607-2615.

Cheong, H., Lindsten, T., Wu, J., Lu, C., and Thompson, C.B. (2011). **Ammonia-induced autophagy is independent of ULK1/ULK2 kinases.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 11121-11126.

Cheong, H., Yorimitsu, T., Reggiori, F., Legakis, J.E., Wang, C.W., and Klionsky, D.J. (2005). **Atg17 regulates the magnitude of the autophagic response.** *Mol Biol Cell* 16, 3438-3453.

Chew, K.C., Matsuda, N., Saisho, K., Lim, G.G., Chai, C., Tan, H.M., Tanaka, K., and Lim, K.L. (2011). **Parkin mediates apparent E2-independent monoubiquitination in vitro and contains an intrinsic activity that catalyzes polyubiquitination.** *PLoS One* 6, e19720.

Chin, L.S., Olzmann, J.A., and Li, L. (2010). **Parkin-mediated ubiquitin signalling in aggresome formation and autophagy.** *Biochem Soc Trans* 38, 144-149.

Ciccia, F., Accardo-Palumbo, A., Rizzo, A., Guggino, G., Raimondo, S., Giardina, A., Cannizzaro, A., Colbert, R.A., Alessandro, R., and Triolo, G. (2014). **Evidence that autophagy, but not the unfolded protein response, regulates the expression of IL-23 in the gut of patients with ankylosing spondylitis and subclinical gut inflammation.** *Ann Rheum Dis* 73, 1566-1574.

Ciechanover, A. (2009). **Tracing the history of the ubiquitin proteolytic system: the pioneering article.** *Biochem Biophys Res Commun* 387, 1-10.

Clarke, A.J., Ellinghaus, U., Cortini, A., Stranks, A., Simon, A.K., Botto, M., and Vyse, T.J. (2014). **Autophagy is activated in systemic lupus erythematosus and required for plasmablast development.** *Ann Rheum Dis*.

Codogno, P., Mehrpour, M., and Proikas-Cezanne, T. (2012). **Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating?** *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 7-12.

Cohen, P.L., and Eisenberg, R.A. (1991). **Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease.** *Annu Rev Immunol* 9, 243-269.

Comb, W.C., Cogswell, P., Sitcheran, R., and Baldwin, A.S. (2011). **IKK-dependent, NF-kappaB-independent control of autophagic gene expression.** *Oncogene* 30, 1727-1732.

Connor, A.M., Mahomed, N., Gandhi, R., Keystone, E.C., and Berger, S.A. (2012). **TNFalpha modulates protein degradation pathways in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.** *Arthritis Res Ther* 14, R62.

Conway, K.L., Kuballa, P., Khor, B., Zhang, M., Shi, H.N., Virgin, H.W., and Xavier, R.J. (2013). **ATG5 regulates plasma cell differentiation.** *Autophagy* 9, 528-537.

Cooney, R., Baker, J., Brain, O., Danis, B., Pichulik, T., Allan, P., Ferguson, D.J., Campbell, B.J., Jewell, D., and Simmons, A. (2010). **NOD2 stimulation induces autophagy in dendritic cells influencing bacterial handling and antigen presentation.** *Nat Med* 16, 90-97.

Crazzolara, R., Bradstock, K.F., and Bendall, L.J. (2009). **RAD001 (Everolimus) induces autophagy in acute lymphoblastic leukemia.** *Autophagy* 5, 727-728.

Cresswell, P. (1996). **Invariant chain structure and MHC class II function.** *Cell* 84, 505-507.

Crighton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P.R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T., and Ryan, K.M. (2006). **DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis.** *Cell* 126, 121-134.

Criollo, A., Senovilla, L., Authier, H., Maiuri, M.C., Morselli, E., Vitale, I., Kepp, O., Tasdemi, E., Galluzzi, L., Shen, S., *et al.* (2010). **The IKK complex contributes to the induction of autophagy.** *EMBO J* 29, 619-631.

Crotzer, V.L., and Blum, J.S. (2008). **Cytosol to lysosome transport of intracellular antigens during immune surveillance.** *Traffic* 9, 10-16.

Crotzer, V.L., and Blum, J.S. (2010). **Autophagy and adaptive immunity.** *Immunology* 131, 9-17.

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

Cuervo, A.M., and Dice, J.F. (2000b). **Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms.** *J Cell Sci* 113 Pt 24, 4441-4450.

Cuervo, A.M., and Wong, E. (2014). **Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging.** *Cell Res* 24, 92-104.

De Luca, A., Iannitti, R.G., Bozza, S., Beau, R., Casagrande, A., D'Angelo, C., Moretti, S., Cunha, C., Giovannini, G., Massi-Benedetti, C., *et al.* (2012). **CD4(+) T cell vaccination overcomes defective cross-presentation of fungal antigens in a mouse model of chronic granulomatous disease.** *J Clin Invest* 122, 1816-1831.

Deegan, S., Saveljeva, S., Gorman, A.M., and Samali, A. (2013). **Stress-induced self-cannibalism: on the regulation of autophagy by endoplasmic reticulum stress.** *Cell Mol Life Sci* 70, 2425-2441.

Delgado, M.A., Elmaoued, R.A., Davis, A.S., Kyei, G., and Deretic, V. (2008). **Toll-like receptors control autophagy.** *EMBO J* 27, 1110-1121.

Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Muller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., *et al.* (2005). **Autophagy promotes MHC class II presentation of peptides from intracellular source proteins.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7922-7927.

Deosaran, E., Larsen, K.B., Hua, R., Sargent, G., Wang, Y., Kim, S., Lamark, T., Jauregui, M., Law, K., Lippincott-Schwartz, J., *et al.* (2013). **NBR1 acts as an autophagy receptor for peroxisomes.** *J Cell Sci* 126, 939-952.

Deretic, V. (2005). **Autophagy in innate and adaptive immunity.** *Trends Immunol* 26, 523-528.

Deretic, V. (2011). **Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes.** *Immunol Rev* 240, 92-104.

Deretic, V. (2012). **Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors.** *Curr Opin Immunol* 24, 21-31.

Deretic, V., Saitoh, T., and Akira, S. (2013). **Autophagy in infection, inflammation and immunity.** *Nat Rev Immunol* 13, 722-737.

DeSelm, C.J., Miller, B.C., Zou, W., Beatty, W.L., van Meel, E., Takahata, Y., Klumperman, J., Tooze, S.A., Teitelbaum, S.L., and Virgin, H.W. (2011). **Autophagy proteins regulate the secretory component of osteoclastic bone resorption.** *Dev Cell* 21, 966-974.

Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C., Giunta, L., *et al.* (2010). **The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy.** *J Cell Biol* 191, 155-168.

Ding, W.X., Ni, H.M., Gao, W., Yoshimori, T., Stolz, D.B., Ron, D., and Yin, X.M. (2007). **Linking of autophagy to ubiquitin-proteasome system is important for the regulation of endoplasmic reticulum stress and cell viability.** *Am J Pathol* 171, 513-524.

Doria, A., Zen, M., Bettio, S., Gatto, M., Bassi, N., Nalotto, L., Ghirardello, A., Iaccarino, L., and Punzi, L. (2012). **Autoinflammation and autoimmunity: bridging the divide.** *Autoimmun Rev* 12, 22-30.

Drummond, D.A., and Wilke, C.O. (2008). **Mistranslation-induced protein misfolding as a dominant constraint on coding-sequence evolution.** *Cell* 134, 341-352.

Dugast, M., Toussaint, H., Dousset, C., and Benaroch, P. (2005). **AP2 clathrin adaptor complex, but not AP1, controls the access of the major histocompatibility complex (MHC) class II to endosomes.** *J Biol Chem* 280, 19656-19664.

Dumortier, H., Monneaux, F., Jahn-Schmid, B., Briand, J.P., Skriner, K., Cohen, P.L., Smolen, J.S., Steiner, G., and Muller, S. (2000). **B and T cell responses to the spliceosomal heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2 and B1 in normal and lupus mice.** *J Immunol* 165, 2297-2305.

Dupont, N., Jiang, S., Pilli, M., Ornatowski, W., Bhattacharya, D., and Deretic, V. (2011). **Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1beta.** *EMBO J* 30, 4701-4711.

Duran, J.M., Anjard, C., Stefan, C., Loomis, W.F., and Malhotra, V. (2010). **Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes.** *J Cell Biol* 188, 527-536.

Ebato, C., Uchida, T., Arakawa, M., Komatsu, M., Ueno, T., Komiya, K., Azuma, K., Hirose, T., Tanaka, K., Kominami, E., *et al.* (2008). **Autophagy is important in islet homeostasis and compensatory increase of beta cell mass in response to high-fat diet.** *Cell Metab* 8, 325-332.

Egan, D.F., Shackelford, D.B., Mihaylova, M.M., Gelino, S., Kohnz, R.A., Mair, W., Vasquez, D.S., Joshi, A., Gwinn, D.M., Taylor, R., *et al.* (2011). **Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy.** *Science* 331, 456-461.

English, L., Chemali, M., Duron, J., Rondeau, C., Laplante, A., Gingras, D., Alexander, D., Leib, D., Norbury, C., Lippe, R., *et al.* (2009). **Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on MHC class I molecules during HSV-1 infection.** *Nat Immunol* 10, 480-487.

Erenpreisa, J., Huna, A., Salmina, K., Jackson, T.R., and Cragg, M.S. (2014). **Macroautophagy-aided elimination of chromatin.** *Autophagy* 8, 1877-1881.

Erjavec, N., Larsson, L., Grantham, J., and Nystrom, T. (2007). **Accelerated aging and failure to segregate damaged proteins in Sir2 mutants can be suppressed by overproducing the protein aggregation-remodeling factor Hsp104p.** *Genes Dev* 21, 2410-2421.

Eskelinen, E.L., Schmidt, C.K., Neu, S., Willenborg, M., Fuertes, G., Salvador, N., Tanaka, Y., Lullmann-Rauch, R., Hartmann, D., Heeren, J., *et al.* (2004). **Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts.** *Mol Biol Cell* 15, 3132-3145.

Fabri, M., Realegeno, S.E., Jo, E.K., and Modlin, R.L. (2011). **Role of autophagy in the host response to microbial infection and potential for therapy.** *Curr Opin Immunol* 23, 65-70.

Fader, C.M., Sanchez, D., Furlan, M., and Colombo, M.I. (2008). **Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells.** *Traffic* 9, 230-250.

Fader, C.M., Sanchez, D.G., Mestre, M.B., and Colombo, M.I. (2009). **TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways.** *Biochim Biophys Acta* 1793, 1901-1916.

Falk, L., Dang-Lawson, M., Vega, J.L., Pournia, F., Choi, K., Jang, C., Naus, C.C., and Matsuuchi, L. (2014). **Mutations of Cx43 that affect B cell spreading in response to BCR signaling.** *Biol Open* 3, 185-194.

Fang, J., Rhyasen, G., Bolanos, L., Rasch, C., Varney, M., Wunderlich, M., Goyama, S., Jansen, G., Cloos, J., Rigolino, C., *et al.* (2012). **Cytotoxic effects of bortezomib in myelodysplastic syndrome/acute myeloid leukemia depend on autophagy-mediated lysosomal degradation of TRAF6 and repression of PSMA1.** *Blood* 120, 858-867.

Fang, L., Wu, H.M., Ding, P.S., and Liu, R.Y. (2014). **TLR2 mediates phagocytosis and autophagy through JNK signaling pathway in Staphylococcus aureus-stimulated RAW264.7 cells.** *Cell Signal* 26, 806-814.

Fass, E., Shvets, E., Degani, I., Hirschberg, K., and Elazar, Z. (2006). **Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting and fusion with lysosomes.** *J Biol Chem* 281, 36303-36316.

Feng, D., Liu, L., Zhu, Y., and Chen, Q. (2013). **Molecular signaling toward mitophagy and its physiological significance.** *Exp Cell Res* 319, 1697-1705.

Feng, Y., He, D., Yao, Z., and Klionsky, D.J. (2014). **The machinery of macroautophagy.** *Cell Res* 24, 24-41.

Fernandez, D., and Perl, A. (2009). **Metabolic control of T cell activation and death in SLE.** *Autoimmun Rev* 8, 184-189.

Filimonenko, M., Stuffers, S., Raiborg, C., Yamamoto, A., Malerod, L., Fisher, E.M., Isaacs, A., Brech, A., Stenmark, H., and Simonsen, A. (2007). **Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease.** *J Cell Biol* 179, 485-500.

Franchi, L., Munoz-Planillo, R., and Nunez, G. (2012). **Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes.** *Nat Immunol* 13, 325-332.

Gaipl, U.S., Munoz, L.E., Grossmayer, G., Lauber, K., Franz, S., Sarter, K., Voll, R.E., Winkler, T., Kuhn, A., Kalden, J., *et al.* (2007). **Clearance deficiency and systemic lupus erythematosus (SLE).** *J Autoimmun* 28, 114-121.

Ganley, I.G., Lam du, H., Wang, J., Ding, X., Chen, S., and Jiang, X. (2009). **ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling and is essential for autophagy.** *J Biol Chem* 284, 12297-12305.

Ganley, I.G., Wong, P.M., Gammoh, N., and Jiang, X. (2011). **Distinct autophagosomal-lysosomal fusion mechanism revealed by thapsigargin-induced autophagy arrest.** *Mol Cell* 42, 731-743.

Gannage, M., Dormann, D., Albrecht, R., Dengjel, J., Torossi, T., Ramer, P.C., Lee, M., Strowig, T., Arrey, F., Conenello, G., *et al.* (2009). **Matrix protein 2 of influenza A virus blocks autophagosome fusion with lysosomes.** *Cell Host Microbe* 6, 367-380.

Garcia-Mata, R., Bebok, Z., Sorscher, E.J., and Sztul, E.S. (1999). **Characterization and dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera.** *J Cell Biol* 146, 1239-1254.

Garcia-Mata, R., Gao, Y.S., and Sztul, E. (2002). **Hassles with taking out the garbage: aggravating aggresomes.** *Traffic* 3, 388-396.

Gegg, M.E., Cooper, J.M., Chau, K.Y., Rojo, M., Schapira, A.H., and Taanman, J.W. (2010). **Mitofusin 1 and mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy.** *Hum Mol Genet* 19, 4861-4870.

Geisler, S., Holmstrom, K.M., Skujat, D., Fiesel, F.C., Rothfuss, O.C., Kahle, P.J., and Springer, W. (2010). **PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1.** *Nat Cell Biol* 12, 119-131.

Giancetti, E., Delfino, D.V., and Fierabracci, A. (2014). **Recent insights on the putative role of autophagy in autoimmune diseases.** *Autoimmun Rev* 13, 231-241.

Giovannetti, A., Pierdominici, M., Di Iorio, A., Cianci, R., Murdaca, G., Puppo, F., Pandolfi, F., and Paganelli, R. (2008). **Apoptosis in the homeostasis of the immune system and in human immune mediated diseases.** *Curr Pharm Des* 14, 253-268.

Goda, N., and Kanai, M. (2012). **Hypoxia-inducible factors and their roles in energy metabolism.** *Int J Hematol* 95, 457-463.

Gomes, L.C., and Dikic, I. (2014). **Autophagy in antimicrobial immunity.** *Mol Cell* 54, 224-233.

Gong, L., Devenish, R.J., and Prescott, M. (2012). **Autophagy as a macrophage response to bacterial infection.** *IUBMB Life* 64, 740-747.

Greene, A.W., Grenier, K., Aguilera, M.A., Muise, S., Farazifard, R., Haque, M.E., McBride, H.M., Park, D.S., and Fon, E.A. (2012). **Mitochondrial processing peptidase regulates PINK1 processing, import and Parkin recruitment.** *EMBO Rep* 13, 378-385.

Gros, F., Arnold, J., Page, N., Decossas, M., Korganow, A.S., Martin, T., and Muller, S. (2012). **Macroautophagy is deregulated in murine and human lupus T lymphocytes.** *Autophagy* 8, 1113-1123.

Gros, F., and Muller, S. (2014). **Pharmacological regulators of autophagy and their link with modulators of lupus disease.** *Br J Pharmacol* 171, 4337-4359.

Gualtierotti, R., Biggioggero, M., Penatti, A.E., and Meroni, P.L. (2010). **Updating on the pathogenesis of systemic lupus erythematosus.** *Autoimmun Rev* 10, 3-7.

Gurumurthy, S., Xie, S.Z., Alagesan, B., Kim, J., Yusuf, R.Z., Saez, B., Tzatsos, A., Oszolak, F., Milos, P., Ferrari, F., *et al.* (2010). **The Lkb1 metabolic sensor maintains haematopoietic stem cell survival.** *Nature* 468, 659-663.

Gutierrez, M.G., Master, S.S., Singh, S.B., Taylor, G.A., Colombo, M.I., and Deretic, V. (2004a). **Autophagy is a defense mechanism inhibiting BCG and Mycobacterium tuberculosis survival in infected macrophages.** *Cell* 119, 753-766.

Gutierrez, M.G., Munafo, D.B., Beron, W., and Colombo, M.I. (2004b). **Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells.** *J Cell Sci* 117, 2687-2697.

Hailey, D.W., Rambold, A.S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P.K., and Lippincott-Schwartz, J. (2010). **Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation.** *Cell* 141, 656-667.

Hainfeld, J.F., and Powell, R.D. (2000). **New Frontiers in Gold Labeling.** *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 48, 471-480.

Hampe, J., Franke, A., Rosenstiel, P., Till, A., Teuber, M., Huse, K., Albrecht, M., Mayr, G., De La Vega, F.M., Briggs, J., *et al.* (2007). **A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1.** *Nat Genet* 39, 207-211.

Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., *et al.* (2006). **Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice.** *Nature* 441, 885-889.

Hara, T., Takamura, A., Kishi, C., Iemura, S., Natsume, T., Guan, J.L., and Mizushima, N. (2008). **FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells.** *J Cell Biol* 181, 497-510.

Hara-Kuge, S., and Fujiki, Y. (2008). **The peroxin Pex14p is involved in LC3-dependent degradation of mammalian peroxisomes.** *Exp Cell Res* 314, 3531-3541.

Hardie, D.G. (2004). **The AMP-activated protein kinase pathway--new players upstream and downstream.** *J Cell Sci* 117, 5479-5487.

Harding, T.M., Morano, K.A., Scott, S.V., and Klionsky, D.J. (1995). **Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway.** *J Cell Biol* 131, 591-602.

Hardy, R.R., Carmack, C.E., Shinton, S.A., Kemp, J.D., and Hayakawa, K. (1991). **Resolution and characterization of pro-B and pre-pro-B cell stages in normal mouse bone marrow.** *J Exp Med* 173, 1213-1225.

Harijith, A., Ebenezer, D.L., and Natarajan, V. (2014). **Reactive oxygen species at the crossroads of inflammasome and inflammation.** *Front Physiol* 5, 352.

Harley, J.B., Alarcon-Riquelme, M.E., Criswell, L.A., Jacob, C.O., Kimberly, R.P., Moser, K.L., Tsao, B.P., Vyse, T.J., and Langefeld, C.D. (2008). **Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PXK, KIAA1542 and other loci.** *Nat Genet* 40, 204-210.

- Harris, J. (2011). **Autophagy and cytokines**. *Cytokine* 56, 140-144.
- Harris, J. (2013). **Autophagy and IL-1 Family Cytokines**. *Front Immunol* 4, 83.
- Hartleben, B., Godel, M., Meyer-Schwesinger, C., Liu, S., Ulrich, T., Kobler, S., Wiech, T., Grahmmer, F., Arnold, S.J., Lindenmeyer, M.T., *et al.* (2010). **Autophagy influences glomerular disease susceptibility and maintains podocyte homeostasis in aging mice**. *J Clin Invest* 120, 1084-1096.
- Hasson, S.A., Kane, L.A., Yamano, K., Huang, C.H., Sliter, D.A., Buehler, E., Wang, C., Heman-Ackah, S.M., Hessa, T., Guha, R., *et al.* (2013). **High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of parkin upstream of mitophagy**. *Nature* 504, 291-295.
- Hastings, W.D., Tumang, J.R., Behrens, T.W., and Rothstein, T.L. (2006). **Peritoneal B-2 cells comprise a distinct B-2 cell population with B-1b-like characteristics**. *Eur J Immunol* 36, 1114-1123.
- He, C., Bassik, M.C., Moresi, V., Sun, K., Wei, Y., Zou, Z., An, Z., Loh, J., Fisher, J., Sun, Q., *et al.* (2012a). **Exercise-induced BCL2-regulated autophagy is required for muscle glucose homeostasis**. *Nature* 481, 511-515.
- He, C., and Levine, B. (2010). **The Beclin 1 interactome**. *Curr Opin Cell Biol* 22, 140-149.
- He, M.X., McLeod, I.X., Jia, W., and He, Y.W. (2012b). **Macroautophagy in T lymphocyte development and function**. *Front Immunol* 3, 22.
- Henault, J., Martinez, J., Riggs, J.M., Tian, J., Mehta, P., Clarke, L., Sasai, M., Latz, E., Brinkmann, M.M., Iwasaki, A., *et al.* (2012). **Noncanonical autophagy is required for type I interferon secretion in response to DNA-immune complexes**. *Immunity* 37, 986-997.
- Henson, S.M., Lanna, A., Riddell, N.E., Franzese, O., Macaulay, R., Griffiths, S.J., Puleston, D.J., Watson, A.S., Simon, A.K., Tooze, S.A., *et al.* (2014). **p38 signaling inhibits mTORC1-independent autophagy in senescent human CD8(+) T cells**. *J Clin Invest* 124, 4004-4016.
- Herrero-Martin, G., Hoyer-Hansen, M., Garcia-Garcia, C., Fumarola, C., Farkas, T., Lopez-Rivas, A., and Jaattela, M. (2009). **TAK1 activates AMPK-dependent cytoprotective autophagy in TRAIL-treated epithelial cells**. *EMBO J* 28, 677-685.
- Hobeika, E., Thiemann, S., Storch, B., Jumaa, H., Nielsen, P.J., Pelanda, R., and Reth, M. (2006). **Testing gene function early in the B cell lineage in mb1-cre mice**. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, 13789-13794.
- Hoffmann, M.H., Trembleau, S., Muller, S., and Steiner, G. (2010). **Nucleic acid-associated autoantigens: pathogenic involvement and therapeutic potential**. *J Autoimmun* 34, 1178-206.
- Hosokawa, N., Sasaki, T., Iemura, S., Natsume, T., Hara, T., and Mizushima, N. (2009). **Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13**. *Autophagy* 5, 973-979.
- Hou, Y.C., Chittaranjan, S., Barbosa, S.G., McCall, K., and Gorski, S.M. (2008). **Effector caspase Dcp-1 and IAP protein Bruce regulate starvation-induced autophagy during Drosophila melanogaster oogenesis**. *J Cell Biol* 182, 1127-1139.

Huang, S., and Houghton, P.J. (2001). **Mechanisms of resistance to rapamycins**. *Drug Resist Updat* 4, 378-391.

Hubbard, V.M., Valdor, R., Patel, B., Singh, R., Cuervo, A.M., and Macian, F. (2010). **Macroautophagy regulates energy metabolism during effector T cell activation**. *J Immunol* 185, 7349-7357.

Hugot, J.P., Chamaillard, M., Zouali, H., Lesage, S., Cezard, J.P., Belaiche, J., Almer, S., Tysk, C., O'Morain, C.A., Gassull, M., *et al.* (2001). **Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease**. *Nature* 411, 599-603.

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

Ichimura, Y., Kumanomidou, T., Sou, Y.S., Mizushima, T., Ezaki, J., Ueno, T., Kominami, E., Yamane, T., Tanaka, K., and Komatsu, M. (2008). **Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy**. *J Biol Chem* 283, 22847-22857.

Iguchi, M., Kujuro, Y., Okatsu, K., Koyano, F., Kosako, H., Kimura, M., Suzuki, N., Uchiyama, S., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2013). **Parkin-catalyzed ubiquitin-ester transfer is triggered by PINK1-dependent phosphorylation**. *J Biol Chem* 288, 22019-22032.

International Consortium for Systemic Lupus Erythematosus, G., Harley, J.B., Alarcon-Riquelme, M.E., Criswell, L.A., Jacob, C.O., Kimberly, R.P., Moser, K.L., Tsao, B.P., Vyse, T.J., Langefeld, C.D., *et al.* (2008). **Genome-wide association scan in women with systemic lupus erythematosus identifies susceptibility variants in ITGAM, PTK, KIAA1542 and other loci**. *Nat Genet* 40, 204-210.

Ireland, J.M., and Unanue, E.R. (2011). **Autophagy in antigen-presenting cells results in presentation of citrullinated peptides to CD4 T cells**. *J Exp Med* 208, 2625-2632.

Ishibashi, K., Uemura, T., Waguri, S., and Fukuda, M. (2012). **Atg16L1, an essential factor for canonical autophagy, participates in hormone secretion from PC12 cells independently of autophagic activity**. *Mol Biol Cell* 23, 3193-3202.

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

Ito, Y., Teitelbaum, S.L., Zou, W., Zheng, Y., Johnson, J.F., Chappel, J., Ross, F.P., and Zhao, H. (2010). **Cdc42 regulates bone modeling and remodeling in mice by modulating RANKL/M-CSF signaling and osteoclast polarization**. *J Clin Invest* 120, 1981-1993.

Ivanov, S., and Roy, C.R. (2009). **NDP52: the missing link between ubiquitinated bacteria and autophagy**. *Nat Immunol* 10, 1137-1139.

Iwata, A., Riley, B.E., Johnston, J.A., and Kopito, R.R. (2005). **HDAC6 and microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin**. *J Biol Chem* 280, 40282-40292.

Izui, S., Kelley, V.E., Masuda, K., Yoshida, H., Roths, J.B., and Murphy, E.D. (1984). **Induction of various autoantibodies by mutant gene *lpr* in several strains of mice**. *J Immunol* 133, 227-233.

Jagannath, C., Lindsey, D.R., Dhandayuthapani, S., Xu, Y., Hunter, R.L., Jr., and Eissa, N.T. (2009). **Autophagy enhances the efficacy of BCG vaccine by increasing peptide presentation in mouse dendritic cells.** *Nat Med* 15, 267-276.

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

Jahreiss, L., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2008). **The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-and-run fusion with lysosomes.** *Traffic* 9, 574-587.

Janeway, C.A., Jr. (1989). **Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology.** *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 54 Pt 1, 1-13.

Janku, F., McConkey, D.J., Hong, D.S., and Kurzrock, R. (2011). **Autophagy as a target for anticancer therapy.** *Nat Rev Clin Oncol* 8, 528-539.

Jarvinen, T.M., Hellquist, A., Zucchelli, M., Koskenmies, S., Panelius, J., Hasan, T., Julkunen, H., D'Amato, M., and Kere, J. (2012). **Replication of GWAS-identified systemic lupus erythematosus susceptibility genes affirms B-cell receptor pathway signalling and strengthens the role of IRF5 in disease susceptibility in a Northern European population.** *Rheumatology (Oxford)* 51, 87-92.

Jia, G., Cheng, G., Gangahar, D.M., and Agrawal, D.K. (2006). **Insulin-like growth factor-1 and TNF-[alpha] regulate autophagy through c-jun N-terminal kinase and Akt pathways in human atherosclerotic vascular smooth cells.** *Immunol Cell Biol* 84, 448-454.

Jia, K., Thomas, C., Akbar, M., Sun, Q., Adams-Huet, B., Gilpin, C., and Levine, B. (2009). **Autophagy genes protect against Salmonella typhimurium infection and mediate insulin signaling-regulated pathogen resistance.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 14564-14569.

Jia, W., and He, Y.W. (2011). **Temporal regulation of intracellular organelle homeostasis in T lymphocytes by autophagy.** *J Immunol* 186, 5313-5322.

Jia, W., Pua, H.H., Li, Q.J., and He, Y.W. (2011). **Autophagy regulates endoplasmic reticulum homeostasis and calcium mobilization in T lymphocytes.** *J Immunol* 186, 1564-1574.

Jiang, P., Nishimura, T., Sakamaki, Y., Itakura, E., Hatta, T., Natsume, T., and Mizushima, N. (2014). **The HOPS complex mediates autophagosome-lysosome fusion through interaction with syntaxin 17.** *Mol Biol Cell* 25, 1327-1337.

Jin, S.M., Lazarou, M., Wang, C., Kane, L.A., Narendra, D.P., and Youle, R.J. (2010). **Mitochondrial membrane potential regulates PINK1 import and proteolytic destabilization by PARL.** *J Cell Biol* 191, 933-942.

Jin, S.M., and Youle, R.J. (2012). **PINK1- and Parkin-mediated mitophagy at a glance.** *J Cell Sci* 125, 795-799.

Joffre, O., Nolte, M.A., Sporri, R., and Reis e Sousa, C. (2009). **Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity.** *Immunol Rev* 227, 234-247.

Joffre, O.P., Segura, E., Savina, A., and Amigorena, S. (2012). **Cross-presentation by dendritic cells.** *Nat Rev Immunol* 12, 557-569.

Johansen, T., and Lamark, T. (2014). **Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins.** *Autophagy* 7, 279-296.

Johnston, J.A., Ward, C.L., and Kopito, R.R. (1998). **Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins.** *J Cell Biol* 143, 1883-1898.

Jounai, N., Kobiyama, K., Shiina, M., Ogata, K., Ishii, K.J., and Takeshita, F. (2011). **NLRP4 negatively regulates autophagic processes through an association with beclin1.** *J Immunol* 186, 1646-1655.

Jounai, N., Takeshita, F., Kobiyama, K., Sawano, A., Miyawaki, A., Xin, K.-Q., Ishii, K.J., Kawai, T., Akira, S., Suzuki, K., *et al.* (2007). **The Atg5-Atg12 conjugate associates with innate antiviral immune responses.** *Proc Natl Acad Sci* 104, 14050-14055.

Jung, H.S., Chung, K.W., Won Kim, J., Kim, J., Komatsu, M., Tanaka, K., Nguyen, Y.H., Kang, T.M., Yoon, K.H., Kim, J.W., *et al.* (2008). **Loss of autophagy diminishes pancreatic beta cell mass and function with resultant hyperglycemia.** *Cell Metab* 8, 318-324.

Junt, T., Moseman, E.A., Iannacone, M., Massberg, S., Lang, P.A., Boes, M., Fink, K., Henrickson, S.E., Shayakhmetov, D.M., Di Paolo, N.C., *et al.* (2007). **Subcapsular sinus macrophages in lymph nodes clear lymph-borne viruses and present them to antiviral B cells.** *Nature* 450, 110-114.

Kabeya, Y., Kamada, Y., Baba, M., Takikawa, H., Sasaki, M., and Ohsumi, Y. (2005). **Atg17 functions in cooperation with Atg1 and Atg13 in yeast autophagy.** *Mol Biol Cell* 16, 2544-2553.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). **LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing.** *EMBO J* 19, 5720-5728.

Kahn, B.B., Alquier, T., Carling, D., and Hardie, D.G. (2005). **AMP-activated protein kinase: ancient energy gauge provides clues to modern understanding of metabolism.** *Cell Metab* 1, 15-25.

Kang, R., Zeh, H.J., Lotze, M.T., and Tang, D. (2011). **The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis.** *Cell Death Differ* 18, 571-580.

Kaniuk, N.A., Kiraly, M., Bates, H., Vranic, M., Volchuk, A., and Brumell, J.H. (2007). **Ubiquitinated-protein aggregates form in pancreatic beta-cells during diabetes-induced oxidative stress and are regulated by autophagy.** *Diabetes* 56, 930-939.

Kasai, M., Kominami, E., and Mizuochi, T. (1998). **The antigen presentation pathway in medullary thymic epithelial cells, but not that in cortical thymic epithelial cells, conforms to the endocytic pathway.** *Eur J Immunol* 28, 1867-1876.

Kasai, M., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Seki, S., Ikeda, T., and Mizuochi, T. (2009). **Autophagic compartments gain access to the MHC class II compartments in thymic epithelium.** *J Immunol* 183, 7278-7285.

Kato, M., Ospelt, C., Gay, R.E., Gay, S., and Klein, K. (2014). **Dual role of autophagy in stress-induced cell death in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts.** *Arthritis Rheumatol* 66, 40-48.

Kaushik, S., Rodriguez-Navarro, J.A., Arias, E., Kiffin, R., Sahu, S., Schwartz, G.J., Cuervo, A.M., and Singh, R. (2011). **Autophagy in hypothalamic AgRP neurons regulates food intake and energy balance.** *Cell Metab* 14, 173-183.

Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A., and Yao, T.P. (2003). **The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress.** *Cell* 115, 727-738.

Kawajiri, S., Saiki, S., Sato, S., Sato, F., Hatano, T., Eguchi, H., and Hattori, N. (2010). **PINK1 is recruited to mitochondria with parkin and associates with LC3 in mitophagy.** *FEBS Lett* 584, 1073-1079.

Keller, C.W., Fokken, C., Turville, S.G., Lunemann, A., Schmidt, J., Münz, C., and Lunemann, J.D. (2011). **TNF-alpha induces macroautophagy and regulates MHC class II expression in human skeletal muscle cells.** *J Biol Chem* 286, 3970-3980.

Khandpur, R., Carmona-Rivera, C., Vivekanandan-Giri, A., Gizinski, A., Yalavarthi, S., Knight, J.S., Friday, S., Li, S., Patel, R.M., Subramanian, V., *et al.* (2013). **NETs are a source of citrullinated autoantigens and stimulate inflammatory responses in rheumatoid arthritis.** *Sci Transl Med* 5, 178ra140.

Kim, J., Cheon, H., Jeong, Y.T., Quan, W., Kim, K.H., Cho, J.M., Lim, Y.M., Oh, S.H., Jin, S.M., Kim, J.H., *et al.* (2014). **Amyloidogenic peptide oligomer accumulation in autophagy-deficient beta cells induces diabetes.** *J Clin Invest* 124, 3311-3324.

Kim, J., Huang, W.P., Stromhaug, P.E., and Klionsky, D.J. (2002). **Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation.** *J Biol Chem* 277, 763-773.

Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.L. (2011). **AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1.** *Nat Cell Biol* 13, 132-141.

Kim, J.J., Lee, H.M., Shin, D.M., Kim, W., Yuk, J.M., Jin, H.S., Lee, S.H., Cha, G.H., Kim, J.M., Lee, Z.W., *et al.* (2012). **Host cell autophagy activated by antibiotics is required for their effective antimycobacterial drug action.** *Cell Host Microbe* 11, 457-468.

Kimura, S., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). **Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes.** *Cell Struct Funct* 33, 109-122.

Kinseth, M.A., Anjard, C., Fuller, D., Guizzunti, G., Loomis, W.F., and Malhotra, V. (2007). **The Golgi-associated protein GRASP is required for unconventional protein secretion during development.** *Cell* 130, 524-534.

Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). **Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast.** *J Cell Biol* 147, 435-446.

Kirisako, T., Ichimura, Y., Okada, H., Kabeya, Y., Mizushima, N., Yoshimori, T., Ohsumi, M., Takao, T., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2000). **The reversible modification regulates the membrane-binding state of Apg8/Aut7 essential for autophagy and the cytoplasm to vacuole targeting pathway.** *J Cell Biol* 151, 263-276.

Kirkin, V., Lamark, T., Sou, Y.S., Bjorkoy, G., Nunn, J.L., Bruun, J.A., Shvets, E., McEwan, D.G., Clausen, T.H., Wild, P., *et al.* (2009a). **A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates.** *Mol Cell* 33, 505-516.

Kirkin, V., McEwan, D.G., Novak, I., and Dikic, I. (2009b). **A role for ubiquitin in selective autophagy.** *Mol Cell* 34, 259-269.

Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., Yokochi, M., Mizuno, Y., and Shimizu, N. (1998). **Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism.** *Nature* 392, 605-608.

Klionsky, D.J., Abdalla, F.C., Abeliovich, H., Abraham, R.T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J.A., *et al.* (2012). **Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy.** *Autophagy* 8, 445-544.

Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn, W.A., Jr., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., *et al.* (2003). **A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes.** *Dev Cell* 5, 539-545.

Kochl, R., Hu, X.W., Chan, E.Y., and Tooze, S.A. (2006). **Microtubules facilitate autophagosome formation and fusion of autophagosomes with endosomes.** *Traffic* 7, 129-145.

Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., *et al.* (2006). **Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice.** *Nature* 441, 880-884.

Komatsu, M., Waguri, S., Koike, M., Sou, Y.S., Ueno, T., Hara, T., Mizushima, N., Iwata, J., Ezaki, J., Murata, S., *et al.* (2007). **Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice.** *Cell* 131, 1149-1163.

Komatsu, M., Waguri, S., Ueno, T., Iwata, J., Murata, S., Tanida, I., Ezaki, J., Mizushima, N., Ohsumi, Y., Uchiyama, Y., *et al.* (2005). **Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice.** *J Cell Biol* 169, 425-434.

Kondapalli, C., Kazlauskaitė, A., Zhang, N., Woodroof, H.I., Campbell, D.G., Gourlay, R., Burchell, L., Walden, H., Macartney, T.J., Deak, M., *et al.* (2012). **PINK1 is activated by mitochondrial membrane potential depolarization and stimulates Parkin E3 ligase activity by phosphorylating Serine 65.** *Open Biol* 2, 120080.

Kondylis, V., van Nispen Tot Pannerden, H.E., van Dijk, S., Ten Broeke, T., Wubbolts, R., Geerts, W.J., Seinen, C., Mutis, T., and Heijnen, H.F. (2013). **Endosome-mediated autophagy: an unconventional MIIC-driven autophagic pathway operational in dendritic cells.** *Autophagy* 9, 861-880.

Konya, C., Paz, Z., and Tsokos, G.C. (2014). **The role of T cells in systemic lupus erythematosus: an update.** *Curr Opin Rheumatol* 26, 493-501.

Kopito, R.R. (2000). **Aggresomes, inclusion bodies and protein aggregation.** *Trends Cell Biol* 10, 524-530.

Kopitz, J., Kisen, G.O., Gordon, P.B., Bohley, P., and Seglen, P.O. (1990). **Nonselective autophagy of cytosolic enzymes by isolated rat hepatocytes.** *J Cell Biol* 111, 941-953.

Korolchuk, V.I., Mansilla, A., Menzies, F.M., and Rubinsztein, D.C. (2009). **Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates.** *Mol Cell* 33, 517-527.

Korolchuk, V.I., Saiki, S., Lichtenberg, M., Siddiqi, F.H., Roberts, E.A., Imarisio, S., Jahreiss, L., Sarkar, S., Futter, M., Menzies, F.M., *et al.* (2011). **Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses.** *Nat Cell Biol* 13, 453-460.

Kovacs, J.R., Li, C., Yang, Q., Li, G., Garcia, I.G., Ju, S., Roodman, D.G., Windle, J.J., Zhang, X., and Lu, B. (2012). **Autophagy promotes T-cell survival through degradation of proteins of the cell death machinery.** *Cell Death Differ* 19, 144-152.

Kraft, C., Deplazes, A., Sohrmann, M., and Peter, M. (2008). **Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease.** *Nat Cell Biol* 10, 602-610.

Kraft, C., Peter, M., and Hofmann, K. (2010). **Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond.** *Nat Cell Biol* 12, 836-841.

Kraus, M., Pao, L.I., Reichlin, A., Hu, Y., Canono, B., Cambier, J.C., Nussenzweig, M.C., and Rajewsky, K. (2001). **Interference with immunoglobulin (Ig)alpha immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM) phosphorylation modulates or blocks B cell development, depending on the availability of an Igbeta cytoplasmic tail.** *J Exp Med* 194, 455-469.

Kuballa, P., Nolte, W.M., Castoreno, A.B., and Xavier, R.J. (2012). **Autophagy and the immune system.** *Annu Rev Immunol* 30, 611-646.

Kuma, A., Hatano, M., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakaya, H., Yoshimori, T., Ohsumi, Y., Tokuhiya, T., and Mizushima, N. (2004). **The role of autophagy during the early neonatal starvation period.** *Nature* 432, 1032-1036.

Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., and Ohsumi, Y. (2002). **Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast.** *J Biol Chem* 277, 18619-18625.

Lande, R., Ganguly, D., Facchinetti, V., Frasca, L., Conrad, C., Gregorio, J., Meller, S., Chamilos, G., Sebasigari, R., Ricciardi, V., *et al.* (2011). **Neutrophils activate plasmacytoid dendritic cells by releasing self-DNA-peptide complexes in systemic lupus erythematosus.** *Sci Transl Med* 3, 73ra19.

Lassen, K.G., Kuballa, P., Conway, K.L., Patel, K.K., Becker, C.E., Peloquin, J.M., Villablanca, E.J., Norman, J.M., Liu, T.C., Heath, R.J., *et al.* (2014). **Atg16L1 T300A variant decreases selective autophagy resulting in altered cytokine signaling and decreased antibacterial defense.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 111, 7741-7746.

Lazarou, M., Jin, S.M., Kane, L.A., and Youle, R.J. (2012). **Role of PINK1 binding to the TOM complex and alternate intracellular membranes in recruitment and activation of the E3 ligase Parkin.** *Dev Cell* 22, 320-333.

Le Guezennec, X., Brichtkina, A., Huang, Y.F., Kostromina, E., Han, W., and Bulavin, D.V. (2012). **Wip1-dependent regulation of autophagy, obesity, and atherosclerosis.** *Cell Metab* 16, 68-80.

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

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

Lee, I.H., Kawai, Y., Fergusson, M.M., Rovira, I., Bishop, A.J., Motoyama, N., Cao, L., and Finkel, T. (2012a). **Atg7 modulates p53 activity to regulate cell cycle and survival during metabolic stress.** *Science* 336, 225-228.

Lee, J., Kim, H.R., Quinley, C., Kim, J., Gonzalez-Navajas, J., Xavier, R., and Raz, E. (2012b). **Autophagy suppresses interleukin-1beta (IL-1beta) signaling by activation of p62 degradation via lysosomal and proteasomal pathways.** *J Biol Chem* 287, 4033-4040.

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

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

Lee, J.Y., Nagano, Y., Taylor, J.P., Lim, K.L., and Yao, T.P. (2010c). **Disease-causing mutations in parkin impair mitochondrial ubiquitination, aggregation, and HDAC6-dependent mitophagy.** *J Cell Biol* 189, 671-679.

Lee, S.J., Silverman, E., and Bargman, J.M. (2011). **The role of antimalarial agents in the treatment of SLE and lupus nephritis.** *Nat Rev Nephrol* 7, 718-729.

Lemasters, J.J., Nieminen, A.L., Qian, T., Trost, L.C., Elmore, S.P., Nishimura, Y., Crowe, R.A., Cascio, W.E., Bradham, C.A., Brenner, D.A., *et al.* (1998). **The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis and autophagy.** *Biochim Biophys Acta* 1366, 177-196.

Lettieri Barbato, D., Tatulli, G., Aquilano, K., and Ciriolo, M.R. (2013). **FoxO1 controls lysosomal acid lipase in adipocytes: implication of lipophagy during nutrient restriction and metformin treatment.** *Cell Death Dis* 4, e861.

Levine, B., and Kroemer, G. (2008). **Autophagy in the pathogenesis of disease.** *Cell* 132, 27-42.

Levine, B., Mizushima, N., and Virgin, H.W. (2011). **Autophagy in immunity and inflammation.** *Nature* 469, 323-335.

Levy, J.M., and Thorburn, A. (2012). **Modulation of pediatric brain tumor autophagy and chemosensitivity.** *J Neurooncol* 106, 281-290.

Li, B., Lei, Z., Lichty, B.D., Li, D., Zhang, G.M., Feng, Z.H., Wan, Y., and Huang, B. (2010). **Autophagy facilitates major histocompatibility complex class I expression induced by IFN-gamma in B16 melanoma cells.** *Cancer Immunol Immunother* 59, 313-321.

Li, C., Capan, E., Zhao, Y., Zhao, J., Stolz, D., Watkins, S.C., Jin, S., and Lu, B. (2006a). **Autophagy Is Induced in CD4+ T Cells and Important for the Growth Factor-Withdrawal Cell Death.** *The Journal of Immunology* 177, 5163-5168.

Li, H., Li, Y., Jiao, J., and Hu, H.M. (2011). **Alpha-alumina nanoparticles induce efficient autophagy-dependent cross-presentation and potent antitumour response.** *Nat Nanotechnol* 6, 645-650.

Li, S., Du, L., Zhang, L., Hu, Y., Xia, W., Wu, J., Zhu, J., Chen, L., Zhu, F., Li, C., *et al.* (2013). **Cathepsin B contributes to autophagy-related 7 (Atg7)-induced nod-like receptor 3 (NLRP3)-dependent proinflammatory response and aggravates lipotoxicity in rat insulinoma cell line.** *J Biol Chem* 288, 30094-30104.

Li, W.W., Li, J., and Bao, J.K. (2012). **Microautophagy: lesser-known self-eating.** *Cell Mol Life Sci* 69, 1125-1136.

Li, X., Zhang, L., Meshinchi, S., Dias-Leme, C., Raffin, D., Johnson, J.D., Treutelaar, M.K., and Burant, C.F. (2006b). **Islet Microvasculature in Islet Hyperplasia and Failure in a Model of Type 2 Diabetes.** *Diabetes* 55, 2965-2973.

Li, Y., Wang, L.X., Yang, G., Hao, F., Urba, W.J., and Hu, H.M. (2008). **Efficient cross-presentation depends on autophagy in tumor cells.** *Cancer Res* 68, 6889-6895.

Liang, C., Lee, J.S., Inn, K.S., Gack, M.U., Li, Q., Roberts, E.A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., *et al.* (2008). **Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking.** *Nat Cell Biol* 10, 776-787.

Liang, Q., Seo, G.J., Choi, Y.J., Kwak, M.J., Ge, J., Rodgers, M.A., Shi, M., Leslie, B.J., Hopfner, K.P., Ha, T., *et al.* (2014). **Crosstalk between the cGAS DNA sensor and Beclin-1 autophagy protein shapes innate antimicrobial immune responses.** *Cell Host Microbe* 15, 228-238.

Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). **Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1.** *Nature* 402, 672-676.

Liang, X.H., Kleeman, L.K., Jiang, H.H., Gordon, G., Goldman, J.E., Berry, G., Herman, B., and Levine, B. (1998). **Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein.** *J Virol* 72, 8586-8596.

Liao, X., Sluimer, J.C., Wang, Y., Subramanian, M., Brown, K., Pattison, J.S., Robbins, J., Martinez, J., and Tabas, I. (2012). **Macrophage autophagy plays a protective role in advanced atherosclerosis.** *Cell Metab* 15, 545-553.

Lim, Y.M., Lim, H., Hur, K.Y., Quan, W., Lee, H.Y., Cheon, H., Ryu, D., Koo, S.H., Kim, H.L., Kim, J., *et al.* (2014). **Systemic autophagy insufficiency compromises adaptation to metabolic stress and facilitates progression from obesity to diabetes.** *Nat Commun* 5, 4934.

Lin, N.Y., Beyer, C., Giessel, A., Kireva, T., Scholtysek, C., Uderhardt, S., Munoz, L.E., Dees, C., Distler, A., Wirtz, S., *et al.* (2013). **Autophagy regulates TNFalpha-mediated joint destruction in experimental arthritis.** *Ann Rheum Dis* 72, 761-768.

Liu, F., Lee, J.Y., Wei, H., Tanabe, O., Engel, J.D., Morrison, S.J., and Guan, J.L. (2010). **FIP200 is required for the cell-autonomous maintenance of fetal hematopoietic stem cells.** *Blood* 116, 4806-4814.

Liu, L., Feng, D., Chen, G., Chen, M., Zheng, Q., Song, P., Ma, Q., Zhu, C., Wang, R., Qi, W., *et al.* (2012). **Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells.** *Nat Cell Biol* 14, 177-185.

Longatti, A., and Tooze, S.A. (2009). **Vesicular trafficking and autophagosome formation.** *Cell Death Differ* 16, 956-965.

Lupfer, C., Thomas, P.G., Anand, P.K., Vogel, P., Milasta, S., Martinez, J., Huang, G., Green, M., Kundu, M., Chi, H., *et al.* (2013). **Receptor interacting protein kinase 2-mediated mitophagy regulates inflammasome activation during virus infection.** *Nat Immunol* 14, 480-488.

Machtaler, S., Dang-Lawson, M., Choi, K., Jang, C., Naus, C.C., and Matsuuchi, L. (2011). **The gap junction protein Cx43 regulates B-lymphocyte spreading and adhesion.** *J Cell Sci* 124, 2611-2621.

Macri, C., Wang, F., Tasset, I., Schall, N., Page, N., Briand, J.P., Cuervo, A.M., and Muller, S. (2015). **Modulation of deregulated chaperone-mediated autophagy by a phosphopeptide.** *Autophagy* 11:3, 486.

Maejima, I., Takahashi, A., Omori, H., Kimura, T., Takabatake, Y., Saitoh, T., Yamamoto, A., Hamasaki, M., Noda, T., Isaka, Y., *et al.* (2013). **Autophagy sequesters damaged lysosomes to control lysosomal biogenesis and kidney injury.** *EMBO J* 32, 2336-2347.

Maiuri, M.C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J.C., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., *et al.* (2007). **Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1.** *EMBO J* 26, 2527-2539.

Mamane, Y., Petroulakis, E., LeBacquer, O., and Sonenberg, N. (2006). **mTOR, translation initiation and cancer.** *Oncogene* 25, 6416-6422.

Mammucari, C., Milan, G., Romanello, V., Masiero, E., Rudolf, R., Del Piccolo, P., Burden, S.J., Di Lisi, R., Sandri, C., Zhao, J., *et al.* (2007). **FoxO3 controls autophagy in skeletal muscle in vivo.** *Cell Metab* 6, 458-471.

Manjithaya, R., Anjard, C., Loomis, W.F., and Subramani, S. (2010a). **Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation.** *J Cell Biol* 188, 537-546.

Manjithaya, R., Nazarko, T.Y., Farre, J.C., and Subramani, S. (2010b). **Molecular mechanism and physiological role of pexophagy.** *FEBS Lett* 584, 1367-1373.

Marchesini, G., Brizi, M., Bianchi, G., Tomassetti, S., Bugianesi, E., Lenzi, M., McCullough, A.J., Natale, S., Forlani, G., and Melchionda, N. (2001). **Nonalcoholic fatty liver disease: a feature of the metabolic syndrome.** *Diabetes* 50, 1844-1850.

Marino, G., Niso-Santano, M., Baehrecke, E.H., and Kroemer, G. (2014). **Self-consumption: the interplay of autophagy and apoptosis.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 81-94.

Martin, L.J., Gupta, J., Jyothula, S.S.S.K., Butsch Kovacic, M., Biagini Myers, J.M., Patterson, T.L., Ericksen, M.B., He, H., Gibson, A.M., Baye, T.M., *et al.* (2012). **Functional Variant in the Autophagy-Related 5 Gene Promotor is Associated with Childhood Asthma.** *PLoS ONE* 7, e33454.

Martin, S., and Parton, R.G. (2006). **Lipid droplets: a unified view of a dynamic organelle.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 373-378.

Martinet, W., De Bie, M., Schrijvers, D.M., De Meyer, G.R., Herman, A.G., and Kockx, M.M. (2004). **7-ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells.** *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 24, 2296-2301.

Martinet, W., and De Meyer, G.R. (2009). **Autophagy in atherosclerosis: a cell survival and death phenomenon with therapeutic potential.** *Circ Res* 104, 304-317.

Martinez, J., Almendinger, J., Oberst, A., Ness, R., Dillon, C.P., Fitzgerald, P., Hengartner, M.O., and Green, D.R. (2011). **Microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha (LC3)-associated phagocytosis is required for the efficient clearance of dead cells.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 108, 17396-17401.

Martinez-Vicente, M., Talloczy, Z., Wong, E., Tang, G., Koga, H., Kaushik, S., de Vries, R., Arias, E., Harris, S., Sulzer, D., *et al.* (2010). **Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease.** *Nat Neurosci* 13, 567-576.

Massey, A.C., Kaushik, S., Sovak, G., Kiffin, R., and Cuervo, A.M. (2006). **Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 5805-5810.

Matsuda, N., Sato, S., Shiba, K., Okatsu, K., Saisho, K., Gautier, C.A., Sou, Y.S., Saiki, S., Kawajiri, S., Sato, F., *et al.* (2010). **PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria and activates latent Parkin for mitophagy.** *J Cell Biol* 189, 211-221.

Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., *et al.* (2009). **Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages.** *Nat Cell Biol* 11, 385-396.

Mayes, M.D., Bossini-Castillo, L., Gorlova, O., Martin, J.E., Zhou, X., Chen, W.V., Assassi, S., Ying, J., Tan, F.K., Arnett, F.C., *et al.* (2014). **ImmunoChip analysis identifies multiple susceptibility loci for systemic sclerosis.** *Am J Hum Genet* 94, 47-61.

McCarroll, S.A., Huett, A., Kuballa, P., Chilewski, S.D., Landry, A., Goyette, P., Zody, M.C., Hall, J.L., Brant, S.R., Cho, J.H., *et al.* (2008). **Deletion polymorphism upstream of IRGM associated with altered IRGM expression and Crohn's disease.** *Nat Genet* 40, 1107-1112.

McCormick, P.J., Martina, J.A., and Bonifacino, J.S. (2005). **Involvement of clathrin and AP-2 in the trafficking of MHC class II molecules to antigen-processing compartments.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7910-7915.

McEwan, D.G., Richter, B., Claudi, B., Wigge, C., Wild, P., Farhan, H., McGourty, K., Coxon, F.P., Franz-Wachtel, M., Perdu, B., *et al.* (2015). **PLEKHM1 regulates Salmonella-containing vacuole biogenesis and infection.** *Cell Host Microbe* 17, 58-71.

McFarlane, S., Aitken, J., Sutherland, J.S., Nicholl, M.J., Preston, V.G., and Preston, C.M. (2011). **Early induction of autophagy in human fibroblasts after infection with human cytomegalovirus or herpes simplex virus 1.** *J Virol* 85, 4212-4221.

Means, T.K., Latz, E., Hayashi, F., Murali, M.R., Golenbock, D.T., and Luster, A.D. (2005). **Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9.** *J Clin Invest* 115, 407-417.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., and Janeway, C.A., Jr. (1997). **A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity.** *Nature* 388, 394-397.

Meijer, A.J., and Codogno, P. (2009). **Autophagy: regulation and role in disease.** *Crit Rev Clin Lab Sci* 46, 210-240.

Menghini, R., Casagrande, V., Marino, A., Marchetti, V., Cardellini, M., Stoehr, R., Rizza, S., Martelli, E., Greco, S., Mauriello, A., *et al.* (2014). **MiR-216a: a link between endothelial dysfunction and autophagy.** *Cell Death Dis* 5, e1029.

Michalek, R.D., Gerriets, V.A., Jacobs, S.R., Macintyre, A.N., MacIver, N.J., Mason, E.F., Sullivan, S.A., Nichols, A.G., and Rathmell, J.C. (2011). **Cutting edge: distinct glycolytic and lipid oxidative metabolic programs are essential for effector and regulatory CD4+ T cell subsets.** *J Immunol* 186, 3299-3303.

Miller, B.C., Zhao, Z., Stephenson, L.M., Cadwell, K., Pua, H.H., Lee, H.K., Mizushima, N.N., Iwasaki, A., He, Y.W., Swat, W., *et al.* (2008). **The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development.** *Autophagy* 4, 309-314.

Mitchison, N.A. (2004). **T-cell-B-cell cooperation.** *Nat Rev Immunol* 4, 308-312.

Mizushima, N. (1998). **A New Protein Conjugation System in Human. THE COUNTERPART OF THE YEAST Apg12p CONJUGATION SYSTEM ESSENTIAL FOR AUTOPHAGY.** *Journal of Biological Chemistry* 273, 33889-33892.

Mizushima, N., Levine, B., Cuervo, A.M., and Klionsky, D.J. (2008). **Autophagy fights disease through cellular self-digestion.** *Nature* 451, 1069-1075.

Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1999). **Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway.** *EMBO J* 18, 3888-3896.

Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y. (1998). **A protein conjugation system essential for autophagy.** *Nature* 395, 395-398.

Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2004). **In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker.** *Mol Biol Cell* 15, 1101-1111.

Mizushima, N., and Yoshimori, T. (2007). **How to interpret LC3 immunoblotting.** *Autophagy* 3, 542-545.

Monneaux, F., Dumortier, H., Steiner, G., Briand, J.P., and Muller, S. (2001). **Murine models of systemic lupus erythematosus: B and T cell responses to spliceosomal ribonucleoproteins in MRL/Fas(lpr) and (NZB x NZW)F(1) lupus mice.** *Int Immunol* 13, 1155-1163.

Moreau, K., Ravikumar, B., Renna, M., Puri, C., and Rubinsztein, D.C. (2011). **Autophagosome precursor maturation requires homotypic fusion.** *Cell* 146, 303-317.

Moreau, K., and Rubinsztein, D.C. (2012). **The plasma membrane as a control center for autophagy.** *Autophagy* 8, 861-863.

Morley, J.F., Brignull, H.R., Weyers, J.J., and Morimoto, R.I. (2002). **The threshold for polyglutamine-expansion protein aggregation and cellular toxicity is dynamic and influenced by aging in *Caenorhabditis elegans*.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 10417-10422.

Mortensen, M., Ferguson, D.J., Edelmann, M., Kessler, B., Morten, K.J., Komatsu, M., and Simon, A.K. (2010). **Loss of autophagy in erythroid cells leads to defective removal of mitochondria and severe anemia in vivo.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 832-837.

Mortensen, M., Soilleux, E.J., Djordjevic, G., Tripp, R., Lutteropp, M., Sadighi-Akha, E., Stranks, A.J., Glanville, J., Knight, S., Jacobsen, S.E., *et al.* (2011). **The autophagy protein Atg7 is essential for hematopoietic stem cell maintenance.** *J Exp Med* 208, 455-467.

Mortimore, G.E., and Schworer, C.M. (1977). **Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver.** *Nature* 270, 174-176.

Mostowy, S., Bonazzi, M., Hamon, M.A., Tham, T.N., Mallet, A., Lelek, M., Gouin, E., Demangel, C., Brosch, R., Zimmer, C., *et al.* (2010). **Entrapment of intracytosolic bacteria by septin cage-like structures.** *Cell Host Microbe* 8, 433-444.

Mostowy, S., Sancho-Shimizu, V., Hamon, M.A., Simeone, R., Brosch, R., Johansen, T., and Cossart, P. (2011). **p62 and NDP52 proteins target intracytosolic *Shigella* and *Listeria* to different autophagy pathways.** *J Biol Chem* 286, 26987-26995.

Muller, S., Monneaux, F., Schall, N., Rashkov, R.K., Oparanov, B.A., Wiesel, P., Geiger, J.M., and Zimmer, R. (2008). **Spliceosomal peptide P140 for immunotherapy of systemic lupus erythematosus: results of an early phase II clinical trial.** *Arthritis Rheum* 58, 3873-3883.

Munch, C., and Bertolotti, A. (2010). **Exposure of hydrophobic surfaces initiates aggregation of diverse ALS-causing superoxide dismutase-1 mutants.** *J Mol Biol* 399, 512-525.

Münz, C. (2009). **Enhancing immunity through autophagy.** *Annu Rev Immunol* 27, 423-449.

Münz, C. (2010). **Antigen processing via autophagy--not only for MHC class II presentation anymore?** *Curr Opin Immunol* 22, 89-93.

Murakami, M., Ichisaka, T., Maeda, M., Oshiro, N., Hara, K., Edenhofer, F., Kiyama, H., Yonezawa, K., and Yamanaka, S. (2004). **mTOR is essential for growth and proliferation in early mouse embryos and embryonic stem cells.** *Mol Cell Biol* 24, 6710-6718.

Murthy, A., Li, Y., Peng, I., Reichelt, M., Katakam, A.K., Noubade, R., Roose-Girma, M., DeVoss, J., Diehl, L., Graham, R.R., *et al.* (2014). **A Crohn's disease variant in Atg16l1 enhances its degradation by caspase 3.** *Nature* 506, 456-462.

Nagata, S., Hanayama, R., and Kawane, K. (2010). **Autoimmunity and the clearance of dead cells.** *Cell* 140, 619-630.

Nair, U., Jotwani, A., Geng, J., Gammoh, N., Richerson, D., Yen, W.L., Griffith, J., Nag, S., Wang, K., Moss, T., *et al.* (2011). **SNARE proteins are required for macroautophagy.** *Cell* 146, 290-302.

Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., *et al.* (2004). **Autophagy defends cells against invading group A *Streptococcus*.** *Science* 306, 1037-1040.

Nakahira, K., Haspel, J.A., Rathinam, V.A., Lee, S.J., Dolinay, T., Lam, H.C., Englert, J.A., Rabinovitch, M., Cernadas, M., Kim, H.P., *et al.* (2011). **Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome.** *Nat Immunol* 12, 222-230.

Nakatogawa, H., Ichimura, Y., and Ohsumi, Y. (2007). **Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering and hemifusion.** *Cell* 130, 165-178.

Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y., and Ohsumi, Y. (2009). **Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 458-467.

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.F., and Youle, R.J. (2008). **Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy.** *J Cell Biol* 183, 795-803.

Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., and Youle, R.J. (2010). **PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin.** *PLoS Biol* 8, e1000298.

Nedjic, J., Aichinger, M., Emmerich, J., Mizushima, N., and Klein, L. (2008). **Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire and is essential for tolerance.** *Nature* 455, 396-400.

Neefjes, J. (1999). **CIIV, MIIC and other compartments for MHC class II loading.** *Eur J Immunol* 29, 1421-1425.

Netea, M.G., and Joosten, L.A. (2010). **A NOD for autophagy.** *Nat Med* 16, 28-30.

Netea, M.G., Kullberg, B.J., de Jong, D.J., Franke, B., Sprong, T., Naber, T.H., Drenth, J.P., and Van der Meer, J.W. (2004). **NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn's disease.** *Eur J Immunol* 34, 2052-2059.

Ni Cheallaigh, C., Keane, J., Lavelle, E.C., Hope, J.C., and Harris, J. (2011). **Autophagy in the immune response to tuberculosis: clinical perspectives.** *Clin Exp Immunol* 164, 291-300.

Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2009). **Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy.** *Nature* 461, 654-658.

Nishimura, T., Kaizuka, T., Cadwell, K., Sahani, M.H., Saitoh, T., Akira, S., Virgin, H.W., and Mizushima, N. (2013). **FIP200 regulates targeting of Atg16L1 to the isolation membrane.** *EMBO Rep* 14, 284-291.

Noda, N.N., Fujioka, Y., Hanada, T., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2013). **Structure of the Atg12-Atg5 conjugate reveals a platform for stimulating Atg8-PE conjugation.** *EMBO Rep* 14, 206-211.

Noda, N.N., Kumeta, H., Nakatogawa, H., Satoo, K., Adachi, W., Ishii, J., Fujioka, Y., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2008). **Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy.** *Genes Cells* 13, 1211-1218.

Noda, N.N., Ohsumi, Y., and Inagaki, F. (2010). **Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy.** *FEBS Lett* 584, 1379-1385.

Noda, T., and Ohsumi, Y. (1998). **Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast.** *J Biol Chem* 273, 3963-3966.

Norman, J.M., Cohen, G.M., and Bampton, E.T.W. (2014). **The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases.** *Autophagy* 6, 1042-1056.

Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D.G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., Rogov, V., Lohr, F., Popovic, D., Occhipinti, A., *et al.* (2010). **Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance.** *EMBO Rep* 11, 45-51.

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

Nunnari, J., and Suomalainen, A. (2012). **Mitochondria: in sickness and in health.** *Cell* 148, 1145-1159.

O'Sullivan, D., van der Windt, G.J., Huang, S.C., Curtis, J.D., Chang, C.H., Buck, M.D., Qiu, J., Smith, A.M., Lam, W.Y., DiPlato, L.M., *et al.* (2014). **Memory CD8(+) T cells use cell-intrinsic lipolysis to support the metabolic programming necessary for development.** *Immunity* 41, 75-88.

Ogata, M., Hino, S., Saito, A., Morikawa, K., Kondo, S., Kanemoto, S., Murakami, T., Taniguchi, M., Tani, I., Yoshinaga, K., *et al.* (2006). **Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress.** *Mol Cell Biol* 26, 9220-9231.

Ogura, Y., Bonen, D.K., Inohara, N., Nicolae, D.L., Chen, F.F., Ramos, R., Britton, H., Moran, T., Karaliuskas, R., Duerr, R.H., *et al.* (2001). **A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease.** *Nature* 411, 603-606.

Oh, J.E., and Lee, H.K. (2014). **Pattern recognition receptors and autophagy.** *Front Immunol* 5, 300.

Ohl, K., and Tenbrock, K. (2011). **Inflammatory cytokines in systemic lupus erythematosus.** *J Biomed Biotechnol* 2011, 432595.

Oka, T., Hikoso, S., Yamaguchi, O., Taneike, M., Takeda, T., Tamai, T., Oyabu, J., Murakawa, T., Nakayama, H., Nishida, K., *et al.* (2012a). **Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure.** *Nature* 485, 251-255.

Okamoto, K., and Kondo-Okamoto, N. (2012). **Mitochondria and autophagy: critical interplay between the two homeostats.** *Biochim Biophys Acta* 1820, 595-600.

Okatsu, K., Oka, T., Iguchi, M., Imamura, K., Kosako, H., Tani, N., Kimura, M., Go, E., Koyano, F., Funayama, M., *et al.* (2012). **PINK1 autophosphorylation upon membrane potential dissipation is essential for Parkin recruitment to damaged mitochondria.** *Nat Commun* 3, 1016.

Okatsu, K., Uno, M., Koyano, F., Go, E., Kimura, M., Oka, T., Tanaka, K., and Matsuda, N. (2013). **A dimeric PINK1-containing complex on depolarized mitochondria stimulates Parkin recruitment.** *J Biol Chem* 288, 36372-36384.

Oku, M., and Sakai, Y. (2010). **Peroxisomes as dynamic organelles: autophagic degradation.** *FEBS J* 277, 3289-3294.

Olzmann, J.A., Li, L., Chudaev, M.V., Chen, J., Perez, F.A., Palmiter, R.D., and Chin, L.S. (2007). **Parkin-mediated K63-linked polyubiquitination targets misfolded DJ-1 to aggresomes via binding to HDAC6.** *J Cell Biol* 178, 1025-1038.

Orme, J., and Mohan, C. (2012). **Macrophages and neutrophils in SLE-An online molecular catalog.** *Autoimmun Rev* 11, 365-372.

Orozco, G., Eyre, S., Hinks, A., Bowes, J., Morgan, A.W., Wilson, A.G., Wordsworth, P., Steer, S., Hocking, L., consortium, U., *et al.* (2011). **Study of the common genetic background for rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus.** *Ann Rheum Dis* 70, 463-468.

Orvedahl, A., MacPherson, S., Sumpter, R., Jr., Talloczy, Z., Zou, Z., and Levine, B. (2010). **Autophagy protects against Sindbis virus infection of the central nervous system.** *Cell Host Microbe* 7, 115-127.

Ossareh-Nazari, B., Bonizec, M., Cohen, M., Dokudovskaya, S., Delalande, F., Schaeffer, C., Van Dorsselaer, A., and Dargemont, C. (2010). **Cdc48 and Ufd3, new partners of the ubiquitin protease Ubp3, are required for ribophagy.** *EMBO Rep* 11, 548-554.

Ossareh-Nazari, B., Nino, C.A., Bengtson, M.H., Lee, J.W., Joazeiro, C.A., and Dargemont, C. (2014). **Ubiquitylation by the Ltn1 E3 ligase protects 60S ribosomes from starvation-induced selective autophagy.** *J Cell Biol* 204, 909-917.

Ouimet, M., Franklin, V., Mak, E., Liao, X., Tabas, I., and Marcel, Y.L. (2011). **Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase.** *Cell Metab* 13, 655-667.

Page, N., Gros, F., Schall, N., Briand, J.P., and Muller, S. (2011a). **A therapeutic peptide in lupus alters autophagic processes and stability of MHCII molecules in MRL/lpr B cells.** *Autophagy* 7, 539-540.

Page, N., Gros, F., Schall, N., Decossas, M., Bagnard, D., Briand, J.P., and Muller, S. (2011b). **HSC70 blockade by the therapeutic peptide P140 affects autophagic processes and endogenous MHCII presentation in murine lupus.** *Ann Rheum Dis* 70, 837-843.

Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T., and Münz, C. (2005). **Endogenous MHC class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy.** *Science* 307, 593-596.

Pandey, U.B., Nie, Z., Batlevi, Y., McCray, B.A., Ritson, G.P., Nedelsky, N.B., Schwartz, S.L., DiProspero, N.A., Knight, M.A., Schuldiner, O., *et al.* (2007). **HDAC6 rescues neurodegeneration and provides an essential link between autophagy and the UPS.** *Nature* 447, 859-863.

Pankiv, S., Alemu, E.A., Brech, A., Bruun, J.A., Lamark, T., Overvatn, A., Bjorkoy, G., and Johansen, T. (2010). **FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 and PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport.** *J Cell Biol* 188, 253-269.

Pankiv, S., Clausen, T.H., Lamark, T., Brech, A., Bruun, J.A., Outzen, H., Overvatn, A., Bjorkoy, G., and Johansen, T. (2007). **p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy.** *J Biol Chem* 282, 24131-24145.

Parekh, V.V., Wu, L., Boyd, K.L., Williams, J.A., Gaddy, J.A., Olivares-Villagomez, D., Cover, T.L., Zong, W.X., Zhang, J., and Van Kaer, L. (2013). **Impaired autophagy, defective T cell homeostasis, and a wasting syndrome in mice with a T cell-specific deletion of Vps34.** *J Immunol* 190, 5086-5101.

Park, Y.-E., Hayashi, Y.K., Bonne, G., Arimura, T., Noguchi, S., Nonaka, I., and Nishino, I. (2014). **Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells.** *Autophagy* 5, 795-804.

Parkes, M., Barrett, J.C., Prescott, N.J., Tremelling, M., Anderson, C.A., Fisher, S.A., Roberts, R.G., Nimmo, E.R., Cummings, F.R., Soars, D., *et al.* (2007). **Sequence variants in the autophagy gene IRGM and multiple other replicating loci contribute to Crohn's disease susceptibility.** *Nat Genet* 39, 830-832.

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

Paul, S., Kashyap, A.K., Jia, W., He, Y.W., and Schaefer, B.C. (2012). **Selective autophagy of the adaptor protein Bcl10 modulates T cell receptor activation of NF-kappaB.** *Immunity* 36, 947-958.

Pearce, E.L., Walsh, M.C., Cejas, P.J., Harms, G.M., Shen, H., Wang, L.S., Jones, R.G., and Choi, Y. (2009). **Enhancing CD8 T-cell memory by modulating fatty acid metabolism.** *Nature* 460, 103-107.

Peng, Y., and Elkon, K.B. (2011). **Autoimmunity in MFG-E8-deficient mice is associated with altered trafficking and enhanced cross-presentation of apoptotic cell antigens.** *J Clin Invest* 121, 2221-2241.

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

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

Pfeifer, U. (1978). **Inhibition by insulin of the formation of autophagic vacuoles in rat liver. A morphometric approach to the kinetics of intracellular degradation by autophagy.** *J Cell Biol* 78, 152-167.

Phan, T.G., Grigorova, I., Okada, T., and Cyster, J.G. (2007). **Subcapsular encounter and complement-dependent transport of immune complexes by lymph node B cells.** *Nat Immunol* 8, 992-1000.

Pierdominici, M., Vomero, M., Barbati, C., Colasanti, T., Maselli, A., Vacirca, D., Giovannetti, A., Malorni, W., and Ortona, E. (2012). **Role of autophagy in immunity and autoimmunity, with a special focus on systemic lupus erythematosus.** *FASEB J* 26, 1400-1412.

Pilli, M., Arko-Mensah, J., Ponpuak, M., Roberts, E., Master, S., Mandell, M.A., Dupont, N., Ornatowski, W., Jiang, S., Bradfute, S.B., *et al.* (2012). **TBK-1 promotes autophagy-mediated antimicrobial defense by controlling autophagosome maturation.** *Immunity* 37, 223-234.

Plantinga, T.S., Crisan, T.O., Oosting, M., van de Veerdonk, F.L., de Jong, D.J., Philpott, D.J., van der Meer, J.W., Girardin, S.E., Joosten, L.A., and Netea, M.G. (2011). **Crohn's disease-associated ATG16L1 polymorphism modulates pro-inflammatory cytokine responses selectively upon activation of NOD2.** *Gut* 60, 1229-1235.

Poltorak, A., He, X., Smirnova, I., Liu, M.Y., Van Huffel, C., Du, X., Birdwell, D., Alejos, E., Silva, M., Galanos, C., *et al.* (1998). **Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene.** *Science* 282, 2085-2088.

Popovic, D., Akutsu, M., Novak, I., Harper, J.W., Behrends, C., and Dikic, I. (2012). **Rab GTPase-activating proteins in autophagy: regulation of endocytic and autophagy pathways by direct binding to human ATG8 modifiers.** *Mol Cell Biol* 32, 1733-1744.

Pous, C., and Codogno, P. (2011). **Lysosome positioning coordinates mTORC1 activity and autophagy.** *Nat Cell Biol* 13, 342-344.

Pua, H.H., Dzhagalov, I., Chuck, M., Mizushima, N., and He, Y.W. (2007). **A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival and proliferation.** *J Exp Med* 204, 25-31.

Pua, H.H., Guo, J., Komatsu, M., and He, Y.W. (2009). **Autophagy is essential for mitochondrial clearance in mature T lymphocytes.** *J Immunol* 182, 4046-4055.

Puleston, D.J., and Simon, A.K. (2014). **Autophagy in the immune system.** *Immunology* 141, 1-8.

Puleston, D.J., Zhang, H., Powell, T.J., Lipina, E., Sims, S., Panse, I., Watson, A.S., Cerundolo, V., Townsend, A.R., Klenerman, P., *et al.* (2014). **Autophagy is a critical regulator of memory CD8(+) T cell formation.** *Elife* 3.

Qin, Y., Chen, Y., Wang, W., Wang, Z., Tang, G., Zhang, P., He, Z., Liu, Y., Dai, S.M., and Shen, Q. (2014). **HMGB1-LPS complex promotes transformation of osteoarthritis synovial fibroblasts to a rheumatoid arthritis synovial fibroblast-like phenotype.** *Cell Death Dis* 5, e1077.

Qu, X., Yu, J., Bhagat, G., Furuya, N., Hibshoosh, H., Troxel, A., Rosen, J., Eskelinen, E.L., Mizushima, N., Ohsumi, Y., *et al.* (2003). **Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene.** *J Clin Invest* 112, 1809-1820.

Qu, X., Zou, Z., Sun, Q., Luby-Phelps, K., Cheng, P., Hogan, R.N., Gilpin, C., and Levine, B. (2007). **Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development.** *Cell* 128, 931-946.

Quan, W., Hur, K.Y., Lim, Y., Oh, S.H., Lee, J.C., Kim, K.H., Kim, G.H., Kim, S.W., Kim, H.L., Lee, M.K., *et al.* (2012). **Autophagy deficiency in beta cells leads to compromised unfolded protein response and progression from obesity to diabetes in mice.** *Diabetologia* 55, 392-403.

Rahman, A., and Isenberg, D.A. (2008). **Systemic lupus erythematosus.** *N Engl J Med* 358, 929-939.

Rahman, M.K., Midtling, E.H., Svingen, P.A., Xiong, Y., Bell, M.P., Tung, J., Smyrk, T., Egan, L.J., and Faubion, W.A., Jr. (2010). **The pathogen recognition receptor NOD2 regulates human FOXP3+ T cell survival.** *J Immunol* 184, 7247-7256.

Rakovic, A., Grunewald, A., Seibler, P., Ramirez, A., Kock, N., Orolicki, S., Lohmann, K., and Klein, C. (2010). **Effect of endogenous mutant and wild-type PINK1 on Parkin in fibroblasts from Parkinson disease patients.** *Hum Mol Genet* 19, 3124-3137.

Rasmussen, S.B., Horan, K.A., Holm, C.K., Stranks, A.J., Mettenleiter, T.C., Simon, A.K., Jensen, S.B., Rixon, F.J., He, B., and Paludan, S.R. (2011). **Activation of autophagy by alpha-herpesviruses in myeloid cells is mediated by cytoplasmic viral DNA through a mechanism dependent on stimulator of IFN genes.** *J Immunol* 187, 5268-5276.

Ravikumar, B., Acevedo-Arozena, A., Imarisio, S., Berger, Z., Vacher, C., O'Kane, C.J., Brown, S.D., and Rubinsztein, D.C. (2005). **Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins.** *Nat Genet* 37, 771-776.

Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., and Rubinsztein, D.C. (2010a). **Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures.** *Nat Cell Biol* 12, 747-757.

Ravikumar, B., Sarkar, S., Davies, J.E., Futter, M., Garcia-Arencibia, M., Green-Thompson, Z.W., Jimenez-Sanchez, M., Korolchuk, V.I., Lichtenberg, M., Luo, S., *et al.* (2010b). **Regulation of mammalian autophagy in physiology and pathophysiology.** *Physiol Rev* 90, 1383-1435.

Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J.E., Luo, S., Oroz, L.G., Scaravilli, F., Easton, D.F., Duden, R., O'Kane, C.J., *et al.* (2004). **Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease.** *Nat Genet* 36, 585-595.

Ravindran, R., Khan, N., Nakaya, H.I., Li, S., Loebbermann, J., Maddur, M.S., Park, Y., Jones, D.P., Chappert, P., Davoust, J., *et al.* (2014). **Vaccine activation of the nutrient sensor GCN2 in dendritic cells enhances antigen presentation.** *Science* 343, 313-317.

Razani, B., Feng, C., Coleman, T., Emanuel, R., Wen, H., Hwang, S., Ting, J.P., Virgin, H.W., Kastan, M.B., and Semenkovich, C.F. (2012). **Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression.** *Cell Metab* 15, 534-544.

Reggiori, F., Monastyrska, I., Verheije, M.H., Cali, T., Ulasli, M., Bianchi, S., Bernasconi, R., de Haan, C.A., and Molinari, M. (2010). **Coronaviruses Hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication.** *Cell Host Microbe* 7, 500-508.

Rello-Varona, S., Lissa, D., Shen, S., Niso-Santano, M., Senovilla, L., Marino, G., Vitale, I., Jemaa, M., Harper, F., Pierron, G., *et al.* (2012). **Autophagic removal of micronuclei.** *Cell Cycle* 11, 170-176.

Remijsen, Q., Berghe, T.V., Wirawan, E., Asselbergh, B., Parthoens, E., De Rycke, R., Noppen, S., Delforge, M., Willems, J., and Vandenabeele, P. (2011a). **Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation.** *Cell Res* 21, 290-304.

Reversat, A., Yuseff, M.I., Lankar, D., Malbec, O., Obino, D., Maurin, M., Penmatcha, N.V., Amoroso, A., Sengmanivong, L., Gundersen, G.G., *et al.* (2015). **Polarity protein Par3 controls B-cell receptor dynamics and antigen extraction at the immune synapse.** *Mol Biol Cell* 26, 1273-1285.

Rich, K.A., Burkett, C., and Webster, P. (2003). **Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy.** *Cell Microbiol* 5, 455-468.

Rikihisa, Y. (1984). **Glycogen autophagosomes in polymorphonuclear leukocytes induced by rickettsiae.** *Anat Rec* 208, 319-327.

Rioux, J.D., Xavier, R.J., Taylor, K.D., Silverberg, M.S., Goyette, P., Huett, A., Green, T., Kuballa, P., Barmada, M.M., Datta, L.W., *et al.* (2007). **Genome-wide association study identifies new susceptibility loci for Crohn disease and implicates autophagy in disease pathogenesis.** *Nat Genet* 39, 596-604.

Rivera, J.F., Costes, S., Gurlo, T., Glabe, C.G., and Butler, P.C. (2014). **Autophagy defends pancreatic beta cells from human islet amyloid polypeptide-induced toxicity.** *J Clin Invest* 124, 3489-3500.

Roche, P.A., and Cresswell, P. (1990). **Invariant chain association with HLA-DR molecules inhibits immunogenic peptide binding.** *Nature* 345, 615-618.

Roche, P.A., Teletski, C.L., Stang, E., Bakke, O., and Long, E.O. (1993). **Cell surface HLA-DR-invariant chain complexes are targeted to endosomes by rapid internalization.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 8581-8585.

Romao, S., Gannage, M., and Münz, C. (2013a). **Checking the garbage bin for problems in the house, or how autophagy assists in antigen presentation to the immune system.** *Semin Cancer Biol* 23, 391-396.

Romao, S., Gasser, N., Becker, A.C., Guhl, B., Bajagic, M., Vanoaica, D., Ziegler, U., Roesler, J., Dengjel, J., Reichenbach, J., *et al.* (2013b). **Autophagy proteins stabilize pathogen-containing phagosomes for prolonged MHC II antigen processing.** *J Cell Biol* 203, 757-766.

Ronnblom, L., Alm, G.V., and Eloranta, M.L. (2011). **The type I interferon system in the development of lupus.** *Semin Immunol* 23, 113-121.

Roozendaal, R., Mempel, T.R., Pitcher, L.A., Gonzalez, S.F., Verschoor, A., Mebius, R.E., von Andrian, U.H., and Carroll, M.C. (2009). **Conduits mediate transport of low-molecular-weight antigen to lymph node follicles.** *Immunity* 30, 264-276.

Ross, C.A., and Poirier, M.A. (2004). **Protein aggregation and neurodegenerative disease.** *Nat Med* 10 Suppl, S10-17.

Rottman, J.B., and Willis, C.R. (2010). **Mouse models of systemic lupus erythematosus reveal a complex pathogenesis.** *Vet Pathol* 47, 664-676.

Rouschop, K.M., van den Beucken, T., Dubois, L., Niessen, H., Bussink, J., Savelkoul, K., Keulers, T., Mujcic, H., Landuyt, W., Voncken, J.W., *et al.* (2010). **The unfolded protein response protects human tumor cells during hypoxia through regulation of the autophagy genes MAP1LC3B and ATG5.** *J Clin Invest* 120, 127-141.

Rubinsztein, D.C., Codogno, P., and Levine, B. (2012). **Autophagy modulation as a potential therapeutic target for diverse diseases.** *Nat Rev Drug Discov* 11, 709-730.

Rusten, T.E., Vaccari, T., Lindmo, K., Rodahl, L.M., Nezis, I.P., Sem-Jacobsen, C., Wendler, F., Vincent, J.P., Brech, A., Bilder, D., *et al.* (2007). **ESCRTs and Fab1 regulate distinct steps of autophagy.** *Curr Biol* 17, 1817-1825.

Saitoh, T., and Akira, S. (2010). **Regulation of innate immune responses by autophagy-related proteins.** *J Cell Biol* 189, 925-935.

Saitoh, T., Fujita, N., Hayashi, T., Takahara, K., Satoh, T., Lee, H., Matsunaga, K., Kageyama, S., Omori, H., Noda, T., *et al.* (2009). **Atg9a controls dsDNA-driven dynamic translocation of STING and the innate immune response.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 20842-20846.

Saitoh, T., Fujita, N., Jang, M.H., Uematsu, S., Yang, B.G., Satoh, T., Omori, H., Noda, T., Yamamoto, N., Komatsu, M., *et al.* (2008). **Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production.** *Nature* 456, 264-268.

Salemi, S., Yousefi, S., Constantinescu, M.A., Fey, M.F., and Simon, H.U. (2012). **Autophagy is required for self-renewal and differentiation of adult human stem cells.** *Cell Res* 22, 432-435.

Salminen, A., Kaarniranta, K., Kauppinen, A., Ojala, J., Haapasalo, A., Soininen, H., and Hiltunen, M. (2013). **Impaired autophagy and APP processing in Alzheimer's disease: The potential role of Beclin 1 interactome.** *Prog Neurobiol* 106-107, 33-54.

Sancak, Y., Bar-Peled, L., Zoncu, R., Markhard, A.L., Nada, S., and Sabatini, D.M. (2010). **Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface and is necessary for its activation by amino acids.** *Cell* 141, 290-303.

Sandoval, H., Thiagarajan, P., Dasgupta, S.K., Schumacher, A., Prchal, J.T., Chen, M., and Wang, J. (2008). **Essential role for Nix in autophagic maturation of erythroid cells.** *Nature* 454, 232-235.

Sanjuan, M.A., Dillon, C.P., Tait, S.W., Moshiah, S., Dorsey, F., Connell, S., Komatsu, M., Tanaka, K., Cleveland, J.L., Withoff, S., *et al.* (2007). **Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis.** *Nature* 450, 1253-1257.

Sarantis, H., and Grinstein, S. (2012). **Subversion of phagocytosis for pathogen survival.** *Cell Host Microbe* 12, 419-431.

Sarkar, S., Ravikumar, B., Floto, R.A., and Rubinsztein, D.C. (2009). **Rapamycin and mTOR-independent autophagy inducers ameliorate toxicity of polyglutamine-expanded huntingtin and related proteinopathies.** *Cell Death Differ* 16, 46-56.

Sarraf, S.A., Raman, M., Guarani-Pereira, V., Sowa, M.E., Huttlin, E.L., Gygi, S.P., and Harper, J.W. (2013). **Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization.** *Nature* 496, 372-376.

Scarlatti, F., Maffei, R., Beau, I., Codogno, P., and Ghidoni, R. (2008). **Role of non-canonical Beclin 1-independent autophagy in cell death induced by resveratrol in human breast cancer cells.** *Cell Death Differ* 15, 1318-1329.

Schmid, D., and Münz, C. (2007). **Innate and adaptive immunity through autophagy.** *Immunity* 27, 11-21.

Schmid, D., Pypaert, M., and Münz, C. (2007). **Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes.** *Immunity* 26, 79-92.

Schneider, J.L., Suh, Y., and Cuervo, A.M. (2014). **Deficient chaperone-mediated autophagy in liver leads to metabolic dysregulation.** *Cell Metab* 20, 417-432.

Schreiner, G.F., and Unanue, E.R. (1977a). **Capping and the lymphocyte: models for membrane reorganization.** *J Immunol* 119, 1549-1551.

Schweers, R.L., Zhang, J., Randall, M.S., Loyd, M.R., Li, W., Dorsey, F.C., Kundu, M., Opferman, J.T., Cleveland, J.L., Miller, J.L., *et al.* (2007). **NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 19500-19505.

Shaw, R.J. (2009). **LKB1 and AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling and growth.** *Acta Physiol (Oxf)* 196, 65-80.

Shi, C.S., and Kehrl, J.H. (2008). **MyD88 and Trif target Beclin 1 to trigger autophagy in macrophages.** *J Biol Chem* 283, 33175-33182.

Shi, C.S., Shenderov, K., Huang, N.N., Kabat, J., Abu-Asab, M., Fitzgerald, K.A., Sher, A., and Kehrl, J.H. (2012). **Activation of autophagy by inflammatory signals limits IL-1beta production by targeting ubiquitinated inflammasomes for destruction.** *Nat Immunol* 13, 255-263.

Shi, G., Lee, J.R., Grimes, D.A., Racacho, L., Ye, D., Yang, H., Ross, O.A., Farrer, M., McQuibban, G.A., and Bulman, D.E. (2011). **Functional alteration of PARL contributes to mitochondrial dysregulation in Parkinson's disease.** *Hum Mol Genet* 20, 1966-1974.

Shiba-Fukushima, K., Imai, Y., Yoshida, S., Ishihama, Y., Kanao, T., Sato, S., and Hattori, N. (2012). **PINK1-mediated phosphorylation of the Parkin ubiquitin-like domain primes mitochondrial translocation of Parkin and regulates mitophagy.** *Sci Rep* 2, 1002.

Shin, Y.J., Han, S.H., Kim, D.S., Lee, G.H., Yoo, W.H., Kang, Y.M., Choi, J.Y., Lee, Y.C., Park, S.J., Jeong, S.K., *et al.* (2010). **Autophagy induction and CHOP under-expression promotes survival of fibroblasts from rheumatoid arthritis patients under endoplasmic reticulum stress.** *Arthritis Res Ther* 12, R19.

Shoji-Kawata, S., Sumpter, R., Leveno, M., Campbell, G.R., Zou, Z., Kinch, L., Wilkins, A.D., Sun, Q., Pallauf, K., MacDuff, D., *et al.* (2013). **Identification of a candidate therapeutic autophagy-inducing peptide.** *Nature* 494, 201-206.

Shui, W., Sheu, L., Liu, J., Smart, B., Petzold, C.J., Hsieh, T.Y., Pitcher, A., Keasling, J.D., and Bertozzi, C.R. (2008). **Membrane proteomics of phagosomes suggests a connection to autophagy.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 16952-16957.

Shvets, E., Abada, A., Weidberg, H., and Elazar, Z. (2014). **Dissecting the involvement of LC3B and GATE-16 in p62 recruitment into autophagosomes.** *Autophagy* 7, 683-688.

Shvets, E., Fass, E., Scherz-Shouval, R., and Elazar, Z. (2008). **The N-terminus and Phe52 residue of LC3 recruit p62/SQSTM1 into autophagosomes.** *J Cell Sci* 121, 2685-2695.

Sinha, S., and Levine, B. (2008). **The autophagy effector Beclin 1: a novel BH3-only protein.** *Oncogene* 27 *Suppl 1*, S137-148.

Smith, J.J., and Aitchison, J.D. (2013). **Peroxisomes take shape.** *Nat Rev Mol Cell Biol* 14, 803-817.

Sorbara, M.T., Ellison, L.K., Ramjeet, M., Travassos, L.H., Jones, N.L., Girardin, S.E., and Philpott, D.J. (2013). **The protein ATG16L1 suppresses inflammatory cytokines induced by the intracellular sensors Nod1 and Nod2 in an autophagy-independent manner.** *Immunity* 39, 858-873.

Spratt, D.E., Martinez-Torres, R.J., Noh, Y.J., Mercier, P., Manczyk, N., Barber, K.R., Aguirre, J.D., Burchell, L., Purkiss, A., Walden, H., *et al.* (2013). **A molecular explanation for the recessive nature of parkin-linked Parkinson's disease.** *Nat Commun* 4, 1983.

Starr, T., Child, R., Wehrly, T.D., Hansen, B., Hwang, S., Lopez-Otin, C., Virgin, H.W., and Celli, J. (2012). **Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the Brucella intracellular cycle.** *Cell Host Microbe* 11, 33-45.

Stephenson, L.M., Miller, B.C., Ng, A., Eisenberg, J., Zhao, Z., Cadwell, K., Graham, D.B., Mizushima, N.N., Xavier, R., Virgin, H.W., *et al.* (2014). **Identification of Atg5-dependent transcriptional changes and increases in mitochondrial mass in Atg5-deficient T lymphocytes.** *Autophagy* 5, 625-635.

Strappazzon, F., Nazio, F., Corrado, M., Cianfanelli, V., Romagnoli, A., Fimia, G.M., Campello, S., Nardacci, R., Piacentini, M., Campanella, M., *et al.* (2015). **AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1.** *Cell Death Differ* 22, 419-432.

Subramani, S., and Malhotra, V. (2013). *Non-autophagic roles of autophagy-related proteins*, Vol 14.

Sun, Q., Fan, W., Chen, K., Ding, X., Chen, S., and Zhong, Q. (2008). **Identification of Barkor as a mammalian autophagy-specific factor for Beclin 1 and class III phosphatidylinositol 3-kinase.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19211-19216.

Takehige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., and Ohsumi, Y. (1992). **Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction.** *J Cell Biol* 119, 301-311.

Takeuchi, H., Kondo, Y., Fujiwara, K., Kanzawa, T., Aoki, H., Mills, G.B., and Kondo, S. (2005). **Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors.** *Cancer Res* 65, 3336-3346.

Takeuchi, O., and Akira, S. (2010). **Pattern recognition receptors and inflammation.** *Cell* 140, 805-820.

Tal, M.C., Sasai, M., Lee, H.K., Yorody, B., Shadel, G.S., and Iwasaki, A. (2009). **Absence of autophagy results in reactive oxygen species-dependent amplification of RLR signaling.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 2770-2775.

Talaber, G., Miklossy, G., Oaks, Z., Liu, Y., Tooze, S.A., Chudakov, D.M., Banki, K., and Perl, A. (2014). **HRES-1/Rab4 promotes the formation of LC3(+) autophagosomes and the accumulation of mitochondria during autophagy.** *PLoS One* 9, e84392.

Tamai, K., Tanaka, N., Nara, A., Yamamoto, A., Nakagawa, I., Yoshimori, T., Ueno, Y., Shimosegawa, T., and Sugamura, K. (2007). **Role of Hrs in maturation of autophagosomes in mammalian cells.** *Biochem Biophys Res Commun* 360, 721-727.

Tamura, N., Oku, M., and Sakai, Y. (2010). **Atg8 regulates vacuolar membrane dynamics in a lipidation-independent manner in *Pichia pastoris*.** *J Cell Sci* 123, 4107-4116.

Tanaka, A., Cleland, M.M., Xu, S., Narendra, D.P., Suen, D.F., Karbowski, M., and Youle, R.J. (2010). **Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin.** *J Cell Biol* 191, 1367-1380.

Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., Eskelinen, E.L., Hartmann, D., Lullmann-Rauch, R., Janssen, P.M., Blanz, J., von Figura, K., and Saftig, P. (2000). **Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice.** *Nature* 406, 902-906.

Tang, D., Kang, R., Coyne, C.B., Zeh, H.J., and Lotze, M.T. (2012). **PAMPs and DAMPs: signal 0s that spur autophagy and immunity.** *Immunol Rev* 249, 158-175.

Taylor, R.B., Duffus, W.P., Raff, M.C., and de Petris, S. (1971). **Redistribution and pinocytosis of lymphocyte surface immunoglobulin molecules induced by anti-immunoglobulin antibody.** *Nat New Biol* 233, 225-229.

Thachil, E., Hugot, J.P., Arbeille, B., Paris, R., Grodet, A., Peuchmaur, M., Codogno, P., Barreau, F., Ogier-Denis, E., Berrebi, D., *et al.* (2012). **Abnormal activation of autophagy-induced crinophagy in Paneth cells from patients with Crohn's disease.** *Gastroenterology* 142, 1097-1099 e1094.

Thaunat, O., Granja, A.G., Barral, P., Filby, A., Montaner, B., Collinson, L., Martinez-Martin, N., Harwood, N.E., Bruckbauer, A., and Batista, F.D. (2012). **Asymmetric segregation of polarized antigen on B cell division shapes presentation capacity.** *Science* 335, 475-479.

Thiele, C., and Spandl, J. (2008). **Cell biology of lipid droplets.** *Curr Opin Cell Biol* 20, 378-385.

Thumm, M., Egner, R., Koch, B., Schlumpberger, M., Straub, M., Veenhuis, M., and Wolf, D.H. (1994). **Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEBS Lett* 349, 275-280.

Thurston, T.L., Ryzhakov, G., Bloor, S., von Muhlinen, N., and Randow, F. (2009). **The TBK1 adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria.** *Nat Immunol* 10, 1215-1221.

Towns, R., Kabeya, Y., Yoshimori, T., Guo, C., Shangguan, Y., Hong, S., Kaplan, M., Klionsky, D.J., and Wiley, J.W. (2005). **Sera from patients with type 2 diabetes and neuropathy induce autophagy and colocalization with mitochondria in SY5Y cells.** *Autophagy* 1, 163-170.

Townsend, K.N., Hughson, L.R., Schlie, K., Poon, V.I., Westerback, A., and Lum, J.J. (2012). **Autophagy inhibition in cancer therapy: metabolic considerations for antitumor immunity.** *Immunol Rev* 249, 176-194.

Travassos, L.H., Carneiro, L.A., Ramjeet, M., Hussey, S., Kim, Y.G., Magalhaes, J.G., Yuan, L., Soares, F., Chea, E., Le Bourhis, L., *et al.* (2010). **Nod1 and Nod2 direct autophagy by recruiting ATG16L1 to the plasma membrane at the site of bacterial entry.** *Nat Immunol* *11*, 55-62.

Tsukada, M., and Ohsumi, Y. (1993). **Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*.** *FEBS Lett* *333*, 169-174.

Uhl, M., Kepp, O., Jusforgues-Saklani, H., Vicencio, J.M., Kroemer, G., and Albert, M.L. (2009). **Autophagy within the antigen donor cell facilitates efficient antigen cross-priming of virus-specific CD8+ T cells.** *Cell Death Differ* *16*, 991-1005.

Valdor, R., Mocholi, E., Botbol, Y., Guerrero-Ros, I., Chandra, D., Koga, H., Gravekamp, C., Cuervo, A.M., and Macian, F. (2014). **Chaperone-mediated autophagy regulates T cell responses through targeted degradation of negative regulators of T cell activation.** *Nat Immunol* *15*, 1046-1054.

Valencia, X., Yarboro, C., Illei, G., and Lipsky, P.E. (2007). **Deficient CD4+CD25high T regulatory cell function in patients with active systemic lupus erythematosus.** *J Immunol* *178*, 2579-2588.

Valente, E.M., Abou-Sleiman, P.M., Caputo, V., Muqit, M.M., Harvey, K., Gispert, S., Ali, Z., Del Turco, D., Bentivoglio, A.R., Healy, D.G., *et al.* (2004). **Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1.** *Science* *304*, 1158-1160.

van der Klei, I.J., Yurimoto, H., Sakai, Y., and Veenhuis, M. (2006). **The significance of peroxisomes in methanol metabolism in methylotrophic yeast.** *Biochim Biophys Acta* *1763*, 1453-1462.

van Heel, D.A., Ghosh, S., Butler, M., Hunt, K.A., Lundberg, A.M., Ahmad, T., McGovern, D.P., Onnie, C., Negoro, K., Goldthorpe, S., *et al.* (2005). **Muramyl dipeptide and toll-like receptor sensitivity in NOD2-associated Crohn's disease.** *Lancet* *365*, 1794-1796.

Veenhuis, M., Douma, A., Harder, W., and 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.

Vessoni, A.T., Filippi-Chiela, E.C., Menck, C.F., and Lenz, G. (2013). **Autophagy and genomic integrity.** *Cell Death Differ* *20*, 1444-1454.

Villani, A.-C., Lemire, M., Fortin, G., Louis, E., Silverberg, M.S., Collette, C., Baba, N., Libioulle, C., Belaiche, J., Bitton, A., *et al.* (2009). **Common variants in the NLRP3 region contribute to Crohn's disease susceptibility.** *Nat Genet* *41*, 71-76.

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

Wang, J., Farr, G.W., Zeiss, C.J., Rodriguez-Gil, D.J., Wilson, J.H., Furtak, K., Rutkowski, D.T., Kaufman, R.J., Ruse, C.I., Yates, J.R., 3rd, *et al.* (2009). **Progressive aggregation despite chaperone associations of a mutant SOD1-YFP in transgenic mice that develop ALS.** *Proc Natl Acad Sci U S A* *106*, 1392-1397.

Wang, R.C., Wei, Y., An, Z., Zou, Z., Xiao, G., Bhagat, G., White, M., Reichelt, J., and Levine, B. (2012). **Akt-mediated regulation of autophagy and tumorigenesis through Beclin 1 phosphorylation.** *Science* 338, 956-959.

Watanabe, K., Ichinose, S., Hayashizaki, K., and Tsubata, T. (2008). **Induction of autophagy by B cell antigen receptor stimulation and its inhibition by costimulation.** *Biochem Biophys Res Commun* 374, 274-281.

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

Webb, J.L., Ravikumar, B., Atkins, J., Skepper, J.N., and Rubinsztein, D.C. (2003). **Alpha-Synuclein is degraded by both autophagy and the proteasome.** *J Biol Chem* 278, 25009-25013.

Wehkamp, J., Harder, J., Weichenthal, M., Schwab, M., Schaffeler, E., Schlee, M., Herrlinger, K.R., Stallmach, A., Noack, F., Fritz, P., *et al.* (2004a). **NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression.** *Gut* 53, 1658-1664.

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

Wen, H., Gris, D., Lei, Y., Jha, S., Zhang, L., Huang, M.T., Brickey, W.J., and Ting, J.P. (2011). **Fatty acid-induced NLRP3-ASC inflammasome activation interferes with insulin signaling.** *Nat Immunol* 12, 408-415.

White, E. (2012). **Deconvoluting the context-dependent role for autophagy in cancer.** *Nat Rev Cancer* 12, 401-410.

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

Wildenberg, M.E., Vos, A.C., Wolfkamp, S.C., Duijvestein, M., Verhaar, A.P., Te Velde, A.A., van den Brink, G.R., and Hommes, D.W. (2012). **Autophagy attenuates the adaptive immune response by destabilizing the immunologic synapse.** *Gastroenterology* 142, 1493-1503 e1496.

Williams, A., Sarkar, S., Cuddon, P., Ttofi, E.K., Saiki, S., Siddiqi, F.H., Jahreiss, L., Fleming, A., Pask, D., Goldsmith, P., *et al.* (2008). **Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway.** *Nat Chem Biol* 4, 295-305.

Willinger, T., and Flavell, R.A. (2012). **Canonical autophagy dependent on the class III phosphoinositide-3 kinase Vps34 is required for naive T-cell homeostasis.** *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 8670-8675.

Wirawan, E., Vande Walle, L., Kersse, K., Cornelis, S., Claerhout, S., Vanoverberghe, I., Roelandt, R., De Rycke, R., Verspurten, J., Declercq, W., *et al.* (2010). **Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy and enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria.** *Cell Death Dis* 1, e18.

Wu, W., Tian, W., Hu, Z., Chen, G., Huang, L., Li, W., Zhang, X., Xue, P., Zhou, C., Liu, L., *et al.* (2014). **ULK1 translocates to mitochondria and phosphorylates FUNDC1 to regulate mitophagy.** *EMBO Rep* 15, 566-575.

Xie, Z., and Klionsky, D.J. (2007). **Autophagosome formation: core machinery and adaptations.** *Nat Cell Biol* 9, 1102-1109.

Xu, X., Araki, K., Li, S., Han, J.H., Ye, L., Tan, W.G., Konieczny, B.T., Bruinsma, M.W., Martinez, J., Pearce, E.L., *et al.* (2014). **Autophagy is essential for effector CD8(+) T cell survival and memory formation.** *Nat Immunol* 15, 1152-1161.

Xu, Y., Jagannath, C., Liu, X.D., Sharafkhaneh, A., Kolodziejska, K.E., and Eissa, N.T. (2007). **Toll-like receptor 4 is a sensor for autophagy associated with innate immunity.** *Immunity* 27, 135-144.

Yamaguchi, H., Nakagawa, I., Yamamoto, A., Amano, A., Noda, T., and Yoshimori, T. (2009). **An initial step of GAS-containing autophagosome-like vacuoles formation requires Rab7.** *PLoS Pathog* 5, e1000670.

Yamano, K., Fogel, A.I., Wang, C., van der Blik, A.M., and Youle, R.J. (2014). **Mitochondrial Rab GAPs govern autophagosome biogenesis during mitophagy.** *Elife* 3, e01612.

Yamano, K., and Youle, R.J. (2013). **PINK1 is degraded through the N-end rule pathway.** *Autophagy* 9, 1758-1769.

Yang, S., Wang, X., Contino, G., Liesa, M., Sahin, E., Ying, H., Bause, A., Li, Y., Stommel, J.M., Dell'antonio, G., *et al.* (2011). **Pancreatic cancers require autophagy for tumor growth.** *Genes Dev* 25, 717-729.

Yang, W., Tang, H., Zhang, Y., Tang, X., Zhang, J., Sun, L., Yang, J., Cui, Y., Zhang, L., Hirankarn, N., *et al.* (2013a). **Meta-analysis followed by replication identifies loci in or near CDKN1B, TET3, CD80, DRAM1, and ARID5B as associated with systemic lupus erythematosus in Asians.** *Am J Hum Genet* 92, 41-51.

Yang, Z., Fujii, H., Mohan, S.V., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2013b). **Phosphofructokinase deficiency impairs ATP generation, autophagy, and redox balance in rheumatoid arthritis T cells.** *J Exp Med* 210, 2119-2134.

Yang, Z., Goronzy, J.J., and Weyand, C.M. (2014). **The glycolytic enzyme PFKFB3/phosphofructokinase regulates autophagy.** *Autophagy* 10, 382-383.

Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2010). **Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation.** *Curr Opin Cell Biol* 22, 124-131.

Yao, Q. (2013). **Nucleotide-binding oligomerization domain containing 2: Structure, function, and diseases.** *Seminars in Arthritis and Rheumatism* 43, 125-130.

Yazbeck, V.Y., Buglio, D., Georgakis, G.V., Li, Y., Iwado, E., Romaguera, J.E., Kondo, S., and Younes, A. (2008). **Temsirolimus downregulates p21 without altering cyclin D1 expression and induces autophagy and synergizes with vorinostat in mantle cell lymphoma.** *Exp Hematol* 36, 443-450.

Yorimitsu, T., and Klionsky, D.J. (2007). **Eating the endoplasmic reticulum: quality control by autophagy.** *Trends Cell Biol* 17, 279-285.

Yorimitsu, T., Nair, U., Yang, Z., and Klionsky, D.J. (2006). **Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy**. *J Biol Chem* 281, 30299-30304.

Youle, R.J., and Narendra, D.P. (2011). **Mechanisms of mitophagy**. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 9-14.

Yousefi, S., Perozzo, R., Schmid, I., Ziemiecki, A., Schaffner, T., Scapozza, L., Brunner, T., and Simon, H.U. (2006). **Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis**. *Nat Cell Biol* 8, 1124-1132.

Yu, Q.C., and Marzella, L. (1986). **Modification of lysosomal proteolysis in mouse liver with taxol**. *Am J Pathol* 122, 553-561.

Yuseff, M.I., Pierobon, P., Reversat, A., and Lennon-Dumenil, A.M. (2013). **How B cells capture, process and present antigens: a crucial role for cell polarity**. *Nat Rev Immunol* 13, 475-486.

Yuseff, M.I., Reversat, A., Lankar, D., Diaz, J., Fanget, I., Pierobon, P., Randrian, V., Larochette, N., Vascotto, F., Desdouets, C., *et al.* (2011). **Polarized secretion of lysosomes at the B cell synapse couples antigen extraction to processing and presentation**. *Immunity* 35, 361-374.

Zavodszky, E., Seaman, M.N., Moreau, K., Jimenez-Sanchez, M., Breusegem, S.Y., Harbour, M.E., and Rubinsztein, D.C. (2014). **Mutation in VPS35 associated with Parkinson's disease impairs WASH complex association and inhibits autophagy**. *Nat Commun* 5, 3828.

Zhang, H., Bosch-Marce, M., Shimoda, L.A., Tan, Y.S., Baek, J.H., Wesley, J.B., Gonzalez, F.J., and Semenza, G.L. (2008). **Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia**. *J Biol Chem* 283, 10892-10903.

Zhang, Y., Goldman, S., Baerga, R., Zhao, Y., Komatsu, M., and Jin, S. (2009). **Adipose-specific deletion of autophagy-related gene 7 (atg7) in mice reveals a role in adipogenesis**. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 19860-19865.

Zhang, Z., Wu, X., Duan, J., Hinrichs, D., Wegmann, K., Zhang, G.L., Hall, M., and Rosenbaum, J.T. (2012). **Low dose rapamycin exacerbates autoimmune experimental uveitis**. *PLoS One* 7, e36589.

Zheng, X., and Hunter, T. (2013). **Parkin mitochondrial translocation is achieved through a novel catalytic activity coupled mechanism**. *Cell Res* 23, 886-897.

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

Zhong, Y., Wang, Q.J., Li, X., Yan, Y., Backer, J.M., Chait, B.T., Heintz, N., and Yue, Z. (2009). **Distinct regulation of autophagic activity by Atg14L and Rubicon associated with Beclin 1-phosphatidylinositol-3-kinase complex**. *Nat Cell Biol* 11, 468-476.

Zhou, R., Yazdi, A.S., Menu, P., and Tschopp, J. (2011a). **A role for mitochondria in NLRP3 inflammasome activation**. *Nature* 469, 221-225.

Zhou, X.J., Lu, X.L., Lv, J.C., Yang, H.Z., Qin, L.X., Zhao, M.H., Su, Y., Li, Z.G., and Zhang, H. (2011b). **Genetic association of PRDM1-ATG5 intergenic region and autophagy with systemic lupus erythematosus in a Chinese population.** *Ann Rheum Dis* 70, 1330-1337.

Zhou, X.J., and Zhang, H. (2012). **Autophagy in immunity: implications in etiology of autoimmune/autoinflammatory diseases.** *Autophagy* 8, 1286-1299.

Zhu, Y., Massen, S., Terenzio, M., Lang, V., Chen-Lindner, S., Eils, R., Novak, I., Dikic, I., Hamacher-Brady, A., and Brady, N.R. (2013). **Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis.** *J Biol Chem* 288, 1099-1113.

Zhu, Y., Zhao, L., Liu, L., Gao, P., Tian, W., Wang, X., Jin, H., Xu, H., and Chen, Q. (2010). **Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy and promotes apoptosis.** *Protein Cell* 1, 468-477.

Zimmer, R., Scherbarth, H.R., Rillo, O.L., Gomez-Reino, J.J., and Muller, S. (2013). **Lupuzor/P140 peptide in patients with systemic lupus erythematosus: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase IIb clinical trial.** *Ann Rheum Dis* 72, 1830-1835.

Implication de la macroautophagie des lymphocytes dans la réponse humorale normale et pathologique

L'autophagie est un processus catabolique lié aux lysosomes. L'autophagie joue un rôle dans la biologie des lymphocytes et dans la réponse immunitaire en générale. Nous avons montré une dérégulation de l'autophagie dans les lymphocytes provenant de souris développant un lupus et de patients atteints d'un lupus érythémateux disséminé. Nous avons ensuite cherché à définir le rôle potentiel de l'autophagie des lymphocytes dans l'activation et le maintien des réponses humorales normales et pathologiques. Ainsi, nous avons généré des souris déficientes en autophagie spécifiquement dans les lymphocytes B. Ces modèles de souris nous ont permis de montrer que l'autophagie ne jouait pas de rôle majeur dans la mise en place de la réponse immunitaire humorale à court terme. Cependant, l'étude du même modèle murin sur fond génétique prédisposant à une auto-immunité systémique a démontré un rôle de l'autophagie dans la production d'auto-anticorps anti-nucléaires et dans le maintien d'un fort nombre de plasmocytes. L'autophagie est donc importante pour l'initiation de l'activation des lymphocytes B et leur survie en contexte d'auto-immunité à long terme.

Ce modèle nous a également permis de montrer que l'absence d'autophagie lors de la stimulation du BCR compromet sa polarisation, conjointe à celle des molécules complexe majeur d'histocompatibilité de classe II et des lysosomes. Ce phénomène est important dans la mise en place de la synapse immunologique, structure qui permet la dégradation et l'internalisation d'antigène particulaires. Nous avons pu mettre en évidence que l'inhibition de l'autophagie impacte effectivement la présentation d'antigènes particulaires internalisés *via* le BCR aux lymphocytes T.

Ainsi, la modulation de l'autophagie dans les lymphocytes pourrait permettre à plusieurs niveaux de limiter l'activation et la survie des lymphocytes autoréactifs dans le contexte de maladies auto-immunes.

Macroautophagy, called autophagy, is a catabolic lysosomal process. Macroautophagy was recently shown to regulate the immune response especially by regulating lymphocyte biology. We demonstrated that autophagy is deregulated in T cells from lupus mouse models and patients suffering from systemic lupus erythematosus. We suggest that autophagy could regulate the survival of autoreactive lymphocytes during lupus. We then wanted to better understand the role of autophagy in normal and pathologic humoral responses. We have generated mouse models conditionally deficient for ATG5 in B cells. In accordance with previous studies, we show that autophagy is dispensable for B cell survival and activation under short-term B cell receptor (BCR) activation. We then investigated long-term immunity on a spontaneous model of autoimmunity. In autoimmune-prone mice deficient for autophagy in B cells, we demonstrate that autophagy is important to maintain high levels of anti-nuclear auto-antibodies, and high number of long-lived plasma cells in the bone marrow.

With these same mouse models, we show that autophagy contributes to the polarization of internalized BCR after stimulation, together with the recruitment of lysosomes and MHC-II molecules-containing compartments. The polarization of B cells is particularly important for the acquisition of particulate antigens for B cells. We postulate that ATG5 and possibly the autophagic machinery could facilitate the formation of the immune synapse. We indeed demonstrate that presentation of immobilized antigens to T cells is compromised in the absence of ATG5 in B cells.

Thus, modulating autophagy in lymphocytes, could limit at several levels the activation and/or survival of autoreactive lymphocytes during autoimmunity.