



HAL
open science

Morphogenèse de compartiments membranaires : formation de l'autophagosome chez les plantes

Romain Le Bars

► **To cite this version:**

Romain Le Bars. Morphogenèse de compartiments membranaires : formation de l'autophagosome chez les plantes. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA112349 . tel-00968437

HAL Id: tel-00968437

<https://theses.hal.science/tel-00968437>

Submitted on 1 Apr 2014

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

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

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE : SCIENCES DU VÉGÉTAL
Laboratoire : Institut des sciences du végétal (UPR 2355)

DISCIPLINE : BIOLOGIE

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue le 18/12/2013

par

Romain LE BARS

Morphogenèse de compartiments membranaires :
formation de l'autophagosome chez les plantes

Composition du jury :

<i>Directeur de thèse :</i>	Béatrice SATIAT-JEUNEMAITRE	Directeur de recherche, CNRS, ISV, Gif-sur-Yvette
<i>Rapporteurs :</i>	Jean-Marc NEUHAUS Germain TRUGNAN	Professeur des Universités, Neuchâtel, Suisse Professeur des Universités-Praticien Hospitalier (PU-PH), UPMC-INSERM, Paris
<i>Examineurs :</i>	Yvon JAILLAIS Graça RAPOSO	Chargé de recherche CNRS, ENS, Lyon Directeur de recherche CNRS, Institut Curie, Paris
Président du jury	Oliver NÜSSE	Professeur des Universités, Paris Sud
<i>Membres invités :</i>	Michele BIANCHI	Maître de Conférences, Université Paris Est Créteil Val de Marne

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier particulièrement Jean-Marc Neuhaus et Germain Trugnan, qui ont accepté de prendre sur leur temps pour évaluer mon travail en qualité de rapporteurs ainsi que Graca Raposo, Yvon Jaillais et Oliver Nüsse, qui ont également accepté de faire partie du jury de cette thèse.

Je tiens également à remercier mes parents, et ma sœur Marion, qui m'ont toujours soutenu et qui m'ont toujours laissé faire ce que je souhaitais tout en m'aidant à faire les bons choix. Si je suis là aujourd'hui c'est en grande partie grâce à eux et je les en remercie.

Merci Béatrice pour m'avoir permis d'effectuer cette thèse au sein de cette super équipe. Merci également pour la liberté que tu m'as laissée lors de ce travail, en effet, même si ce fut un peu déroutant lors des premiers mois, au jour d'aujourd'hui je suis pleinement satisfait du déroulement de ces trois années. Enfin merci pour ta générosité sans limites et pour les nombreuses chouquettes, pizza, plats de pâtes et suppléments de crème fraîche qui m'ont permis d'achever la rédaction de ce manuscrit. (*Riders on the storm, The Doors*)

Merci Michele pour être passé au mauvais endroit au mauvais moment et pour avoir pioché la carte "encadrement de thésard". Merci de t'être pleinement impliqué dans cette nouvelle problématique et merci pour ton exigence quotidienne qui est en grande partie responsable de l'état final de ce travail. Merci pour les nombreuses macros d'ImageJ excessivement sophistiquées que tu m'as concoctées et qui m'ont fait gagner un temps précieux. Enfin merci pour ta bonne humeur et à quand une rando kayak sur les côtes bretonnes? (*Forever Young, Bob Dylan / Right Place Wrong Time, Dr. John*)

Merci à Céline Masclaux-Daubresse pour m'avoir aidé dès le choix de ce sujet de thèse mais également pour son soutien précieux tout au long de ces trois dernières années et sa participation à mes comités de thèse.

Merci à l'intégralité de l'équipe de Sébastien Thomine pour leur gentillesse et plus particulièrement Sylvain Merlot pour son aide précieuse pour la génération des constructions et pour avoir participé à mes comités de thèse. Je tiens également à remercier Marie-Jo pour m'avoir très gentiment fait une place dans son labo et pour avoir partagé de nombreux produits lors de mes sessions Western Blot.

Merci à Renaud Legouis pour sa présence et son implication lors de mes comités de thèse.

Merci à Michèle Reisdorf-Cren et Emmanuel Gendreau qui m'ont accueilli respectivement lors de mes stages de M2 et M1, et dont je garde un excellent souvenir.

Merci Spencer pour ta disponibilité 24h/24h et pour m'avoir fait profiter de tes connaissances en matière d'imagerie et de biologie en générale, ce fut un réel plaisir. Merci également pour ton extraordinaire bonne humeur communicative. Promis, je vais apprendre par cœur le diagramme de Jablonski! Tu me dois cependant 127 frites, prélevées jours après jours dans mon assiette tout au long de ces trois années, mais je t'en fais cadeau! (*The Taxman, Stevie Ray Vaughan*)

Merci Jessica pour tes nombreux coups de main, que ce soit lors de la récolte de ces millions de graines et de leur génotypage, mais aussi de ton investissement dans la MET. Merci également pour toutes ces choses que tu fais dans le labo et qui facilitent notre quotidien et que l'on ne remarque que dès que tu t'absentes. Enfin merci pour tes conseils culinaires en matière de restaurants chinois... (*Viva Las Vegas, ZZ Top*)

Merci Marie-No pour ta folie et pour avoir eu la patience de me former sur la grande partie des systèmes tout en subissant mes nombreuses chinoiseries (*Free bird, Lynyrd Skynyrd*)

Merci Claire pour ton aide lors des tout premiers jours de ma thèse comme lors des tout derniers. (*Diamonds are a girl's best friend, Emmylou Harris*)

Merci Mick pour ces très bons moments où nous débâtons du siège de Saint-Jean-d'Acre par Saladin, de Florence sous Laurent le magnifique, mais également des problèmes socio-économiques de Gotham City. Evasion garantie! (*The Imperial March (Darth Vader's Theme), John Williams*)

Merci Cynthia de m'avoir permis de partager mes hésitations face au choix d'une cuisine Faktum, Tidaholm ou Sofielund, mais également pour ta bonne humeur au quotidien (*Njut is in the house, Artiste inconnu*).

Merci Rémi pour ta persévérance à inclure et couper par centaine ces maudites racines d'Arabidopsis à la recherche d'autophagosomes. (*Hold on, Pearl Jam*)

Merci Seb pour les nombreux debriefs des matchs du PSG et pour les infos croustillantes en provenance directe de Nasser Al-Khelaïfi. (*J'ai raté téléfoot, Renaud*)

Merci Arthur, pour avoir partagé le bureau lors de cette fin de thèse et surtout pour avoir supporté ma musique parfois intempestive. Pour te remercier de te mets enfin une chanson qui te plait... (*Les lacs du Connemara, Michel Sardou*)

Merci Jim pour m'avoir dépanné de nombreuses fois lorsque j'étais en panne sur le Spinning Disk, et bon vent pour la suite! (*Goin' down south, RL Burnside*)

Merci Fred pour ces discussions à des heures souvent tardives et pour tes nombreux conseils. Grâce à toi je ne verrai plus jamais les microtubules de la même façon! (*Round Midnight, Thelonious Monk*)

Merci à Michael pour tes Trichetteries quotidiennes, et félicitations pour ton embauche chez Carambar, je pense qu'ils ont recruté un bon élément! (*Jokerman, Bob Dylan*)

Merci Susana pour toutes les manip entamées à 21h30 et qui bizarrement nous ont tenu éveillés jusqu'au bout de la nuit. (*Everything is broken, Bob Dylan*)

Merci Romain malgré le fait que tu m'aies forcé à changer de nom et de prendre celui d'un cow boy. (*A boy named Sue, Johnny Cash*)

Merci à Nico, Nico, Ju, Junien, Guillaume, Michael, Max, FX et tant d'autres que j'oublie et qui m'ont permis de garder mon équilibre lors de cette thèse. (*Friends will be friends, Queen*)

Je remercie également l'équipe des "Petits Ecoliers"... une autre dimension du football. (*Born to lose, Johnny Cash*)

Merci à Bob Dylan, Angus Young, Miles Davis, un carburant essentiel pour les longues journées de Spinning Disk.

Et enfin je remercie Laurence qui m'a porté lors de ces trois années difficiles et surtout supporté lors de ces trois derniers mois encore plus difficiles. Sans toi, rien de cela n'aurait été possible, et pour te rendre ce que tu m'as donné, ça me coûterait vraiment beaucoup de Ferrero Rochers. (*You Got the Silver, Rolling Stones / Shelter From The Storm, Bob Dylan*)

A tous ceux que j'ai oubliés... merci!

Table des matières

Abréviations	1
Avant-propos.....	4
Plan du manuscrit	5
INTRODUCTION GENERALE	6
Chapitre I. Compartimentation membranaire et dynamique intracellulaire.....	7
1. Un habillage commun aux cellules eucaryotes.....	8
2. Les principales voies du trafic cellulaire chez les plantes.....	13
3. Machineries moléculaires associées	15
Chapitre II. Morphogénèse de compartiments endomembranaires	18
1. Générer un compartiment à partir de courbures positives	19
1.1. Modification de la répartition des lipides de part et d'autre de la membrane	20
1.2. Modification locale de la composition lipidique.	21
1.3. Action des protéines intrinsèques	22
1.4. Action des protéines d'armature ("scaffold mechanism").....	24
1.5. Les protéines à domaine BAR	24
1.6. Les protéines de manteau :	26
1.7. Scission et Fusion.....	27
2. Générer un compartiment par courbure négative	29
3. De la modulation de la forme à la genèse d'un compartiment.....	32
Chapitre III. Autophagie et formation de l'autophagosome	34
1. La voie autophagique	35
1.1. Différents types d'autophagie	36
1.2. Les cibles de l'autophagie	38
1.3. Rôles de l'autophagie	44
2. La machinerie de formation de l'autophagosome	46
2.1. Régulation de l'autophagie par TOR : le senseur.....	47
2.2. Le complexe ATG1/ATG13 : l'interrupteur	49
2.3. Le complexe PI3-K : le signal membranaire	52
2.4. ATG9 : la navette vésiculaire	54
2.5. Deux systèmes de conjugaison "ubiquitin-like"	55
3. Origine de l'autophagosome	61
3.1. Implication du réticulum endoplasmique	62
3.2. Contribution de la membrane externe des mitochondries ?	63
3.3. Les sites de contact RE-mitochondries	63
3.4. Participation de la membrane plasmique ?	64
3.5. Implication des vésicules ATG9 ?	64

OBJECTIF ET STRATEGIE DE LA THESE.....	66
1. Objectif de la thèse.....	68
2. Stratégie de la thèse.	68
RESULTATS.....	70
Chapitre I. Caractérisation de l'autophagie induite par carence nutritionnelle.....	71
1. Mise au point des outils et des conditions expérimentales	73
1.1. Choix du modèle biologique.....	73
1.2. Contrôle du niveau basal de l'autophagie	77
1.3. Optimisation des conditions d'induction de l'autophagie.....	80
1.4. Mise en évidence de l'augmentation du flux autophagique.....	81
1.5. GFP-ATG8f : un marqueur de tous les autophagosomes ?	83
1.6. Identification des autophagosomes à l'échelle ultrastructurale.....	85
2. Caractérisation de l'induction de l'autophagie lors d'une carence nutritionnelle	90
2.1. Etude cinétique de l'autophagie	90
2.2. Caractérisation des autophagosomes induits par une carence nutritionnelle	92
3. Recherche d'interactions avec le système endomembranaire.....	95
4. Bilan	98
Chapitre II. Exploration de la formation de l'autophagosome avec ATG5.....	100
1. ATG5 définit un domaine du phagophore connecté à la face corticale du réticulum endoplasmique lors de la formation de l'autophagosome	102
Abstract	104
Introduction	105
Results.....	106
Discussion	113
Methods.....	116
References	121
2. Bilan	126
Chapitre III. Etude du rôle d'ATG9 dans la formation de l'autophagosome	127
1. Etude de l'autophagie chez le mutant <i>atg9</i>	130
1.1. Mise en évidence de l'altération du flux autophagique	130
1.2. Présence de structures autophagiques dont la morphologie est altérée.....	131
2. Caractérisation des structures marquées par ATG9.....	133
2.1. Construction de protéines rapporteurs pour localiser ATG9.....	133
2.2. Imagerie confocale des signaux ATG9	134
2.3. Etude ultrastructurale	135
2.4. Interactions des structures ATG9 avec les autophagosomes.....	136
2.5. Interactions entre ATG9 et le réticulum endoplasmique.....	137
3. Bilan	137

DISCUSSION ET PERSPECTIVES	139
1. La racine d'Arabidopsis, un bon modèle pour l'étude de l'autophagie	140
2. Identification des structures autophagosomales en croissance	141
3. Vers un modèle de formation de l'autophagosome.....	142
3.1. La nucléation du phagophore	143
3.2. L'élongation et l'établissement d'une courbure	144
3.3. La fermeture du phagophore et la libération de l'autophagosome	146
4. Interaction du phagophore avec le réticulum	146
MATERIEL ET METHODES	148
1. <i>Arabidopsis thaliana</i>	149
1.1. Stérilisation de surface et stockage des graines d'Arabidopsis	149
1.2. Conditions de culture d' <i>Arabidopsis thaliana</i>	149
1.3. Milieux de culture pour Arabidopsis.....	150
1.4. Traitements pharmacologiques des plantules d'Arabidopsis.....	150
1.5. Induction de l'autophagie par carence nutritionnelle.....	150
1.6. Croisements.....	151
1.7. Sélection des transformants.....	151
1.8. Sélection des génotypes issus des croisements	152
2. Cultures cellulaires BY2 de Tabac.....	152
2.1. Culture des cellules BY2.....	152
2.2. Milieux de culture pour les cellules BY2.....	153
2.3. Colorations cytologiques.....	153
2.4. Traitements pharmacologiques	154
3. Transformation d'Arabidopsis et du Tabac.....	154
3.1. Transformation stable d'Arabidopsis par <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	154
3.2. Transformation transitoire sur feuilles de Tabac.....	155
3.3. Transformation stable de cellules BY2 via <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	155
4. Génération des constructions	156
4.1. Génération des "Entry Clones".....	156
4.2. Remplacement de la GFP présente dans les "Destination Vectors".....	157
4.3. Génération des "Expression Clones"	158
5. Techniques de biologie moléculaire.....	158
5.1. Souches bactériennes utilisées	158
5.2. Extraction d'ADN plasmidique	158
5.3. Purification de produits de PCR.....	159
5.4. Séquençage.....	159
5.5. Transformation d' <i>E. Coli</i> :	159
5.6. Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	159
5.7. Extraction des protéines	160
5.8. Western Blot.....	160
6. Microscopie confocale	161

6.1. Configuration du Spinning Disk	162
6.2. Dual View	162
6.3. Expériences de FRAP.....	162
6.4. Traitement et analyse des images.....	163
6.5. Représentations graphiques et statistiques	164
7. Protocoles d'immunofluorescence chez les plantes.....	164
7.1. Immunomarquage de cellules BY2.....	164
7.2. Immunomarquage de racines d'Arabidopsis whole mount.....	165
8. Microscopie électronique en transmission	165
8.1. Fixation chimique et inclusion en résine LR White.....	165
8.2. Cryofixation.....	166
8.3. Cryosubstitution et inclusion en résine Epon	166
8.4. Cryosubstitution et inclusion en résine LR White	166
8.5. Cryosubstitution et inclusion en résine HM20	167
8.6. Méthode de Tokuyasu	167
8.7. Coupe de l'échantillon	168
8.8. Immunomarquage	168
8.9. Amélioration du contraste des échantillons.....	169
8.10. Observation des échantillons	169
9. Microscopie corrélative.....	169
ANNEXES	170
Annexe 1 : Etude de processus autophagiques dans BY-2	171
1. Conditions d'induction de l'autophagie	172
2. Etude ultrastructurale des "autolysosomes" chez BY-2	173
3. Identification des structures autophagiques par immunomarquage.....	174
4. Identification de structures autophagiques par expression de protéines ATG chimériques.....	176
5. Bilan	176
6. Conclusion.....	177
Annexe 2 : Primers / Vecteurs.....	178
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	185

Abréviations

2x YT	2x Yeast extract and Tryptone
3-MA	3-Methyladenine
AB	Autophagic Body
ADN	Acide Désoxyribonucléique
ADN-T	ADN de transfert
AMBRA	Activating Molecule in Beclin 1-Regulated Autophagy
AMPK	Adenosine Monophosphate-activated Protein Kinase
AP-2	Adaptor Protein complex 2
ARN	Acide Ribonucléique
ATG	Autophagy related Genes
BAR	Bin–Amphiphysin–Rvs
BY-2	Bright Yellow - 2
CCV	Clathrin-Coated Vesicles
CMA	Chaperone-Mediated Autophagy
COP	Coat Protein complex
DFCP1	Double FYVE Containing Protein 1
DIC	Differential Interference Contrast
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
DTT	Dithiothréitol
EAT (domaine)	Early Autophagy Targeting/Tethering domain
EMCCD	Electron Multiplying Charge Coupled Device
ERES	Endoplasmic Reticulum Exit Site
ESCRT	Endosomal Sorting Complex Required for Transport
EXPO	Exocist Positive Organelle
FRAP	Fluorescence Recovery After Photobleaching
FYVE (domaine)	Fab1-YOTB-Vac1-EEA1 domain
GABARAP	Gamma-Aminobutyric Acid Receptor-Associated Protein
GATE16	Golgi-associated ATPase Enhancer of 16 kDa
GDP	Guanosine Diphosphate

GLUE (domaine)	GRAM-Like Ubiquitin binding in EAP45 domain
GTP	Guanosine Triphosphate
HORMA (domaine)	Hop1p, Rev1p and Mad2 domain
ILV	Intraluminal Vesicles
LB	Lysogeny Broth
LC3	Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
LIR	LC3 Interacting Region
MAM	Mitochondria-Associated ER Membrane
MDC	Monodansylcadaverine
MEF	Mouse Embryonic Fibroblast
MET	Microscopie Electronique en Transmission
MIP	Maximum Intensity Projection
MS	Murashige & Skoog
MVB	Multivesicular Body
NBR1	Neighbour of BRCA1 gene 1
PAS	Pre-Autophagosomal Structure / Phagophore-Assembly Site
PB1 (domaine)	Phox and Bem 1 domain
PC	Phosphatidylcholine
PE	Phosphatidyléthanolamine
PFA	Paraformaldehyde
pH	Potentiel hydrogène
PH (domaine)	Pleckstrin homology domain
PI	Phosphatidylinositol
PI3-K	Phosphatidylinositide 3-Kinase
PKA	Protein Kinase A
PMSF	Phenylmethylsulfonyl Fluoride
PS	Phosphatidylsérine
PtdIns(3)P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol-4,5-diphosphate
PtdInsP ₂	Phosphatidylinositol diphosphate
PVC	Prevacuolar Compartments
PX (domaine)	Phox domain
RCB	Rubisco Containing Body

ROS	Reactive Oxygen Species
RuBisCO	Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase Oxygenase
SH3 (domaine)	SRC Homology 3 domain
SNARE	Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor
TBST	Tris-Buffered Saline + Tween 20
TECPR1	Tectonin β -Propeller Repeat containing 1
TGN	Trans-Golgi Network
TIRF	Total Internal Reflection Fluorescence
TOR	Target Of Rapamycin
UBA (domaine)	Ubiquitin Binding domain
ULK1	Unc-51-Like Kinase 1
v/v	Volume/Volume
VAEM	Variable-Angle Epifluorescence Microscopy
Vps	Vacuolar Protein Sorting
w/v	Weight/Volume

Avant-propos

Cette année 2013, le biologiste cellulaire belge Christian de Duve, prix Nobel de médecine en 1974, s'est éteint. Quarante-seize ans d'existence pour ce grand chercheur curieux des secrets de la vie cellulaire, couvrant une période où les mécanismes de base de la vie ont été découverts. Découvreur du lysosome en 1955, puis du peroxysome en 1965, il s'intéressa toute sa vie à l'organisation structurale et fonctionnelle de la cellule. Il mit en évidence l'existence de flux vectoriels organisés à partir du réticulum endoplasmique à travers des compartiments membranaires, qu'il nomma l'exocytose. S'ensuivit la conscience de l'endocytose, et l'explosion des données moléculaires sur l'organisation fonctionnelle du système endomembranaire de la cellule eucaryote.

De Duve sut aussi attribuer des propriétés de "self-cannibalisme" à la cellule, qu'il appela autophagie en 1963. Ce n'est pourtant que dans les années 1990 que la découverte des gènes Atg (Autophagy related genes), chez la levure a relancé les débats sur ce mécanisme et démontré son importance curatrice ou destructrice pour la vie cellulaire.

Aujourd'hui, comprendre la morphogénèse et la dynamique des compartiments subcellulaires en relation avec les grands processus de la vie cellulaire est un défi permanent pour tout biologiste cellulaire. C'est dans ce contexte que se situe notre travail de thèse, dont l'objectif principal sera de contribuer à la compréhension de la formation des autophagosomes dans la cellule végétale.

Plan du manuscrit

Pour développer notre étude, nous nous sommes appuyés sur le contexte bibliographique entourant notre questionnement, rappelé dans une INTRODUCTION GENERALE qui constituera la première partie de ce manuscrit. Il semblait tout d'abord nécessaire d'avoir une vue d'ensemble sur l'organisation des compartiments membranaires et leur dynamique intracellulaire (Chapitre I). Les stratégies développées par la cellule pour former un compartiment endomembranaire semblaient également importantes à rappeler pour situer notre problématique de la formation de l'autophagosome (Chapitre II). Un état des lieux sur la biologie de l'autophagie et la formation des autophagosomes, domaine en pleine explosion, a également été pris en compte pour affiner notre problématique de recherche (Chapitre III).

Cette incursion dans le contexte bibliographique nous permet alors de préciser OBJECTIF ET STRATEGIE de recherche mis en œuvre dans ce travail de thèse, déclinés dans une deuxième partie de ce manuscrit.

Les données obtenues exposées dans les RESULTATS, sont articulés autour de trois ensembles :

- La mise au point des outils permettant une exploration fonctionnelle de l'autophagie et la formation des autophagosomes (Chapitre I).
- L'étude des interactions entre ATG8 et ATG5 lors de la formation de l'autophagosome en relation avec le système endomembranaire (Chapitre II).
- L'étude du rôle potentiel de ATG9 dans la formation de l'autophagosome (Chapitre III).

Une DISCUSSION de ces résultats sera ensuite proposée à la fois en terme de mécanistique sous-jacente à la formation d'un autophagosome.

On trouvera finalement en fin de ce manuscrit le détail des MATERIEL ET METHODES utilisés, quelques documents ANNEXES mentionnés dans le corps du manuscrit ainsi que la liste des REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES utilisées dans ce travail.

INTRODUCTION GENERALE

**Chapitre I. COMPARTIMENTATION MEMBRANAIRE ET
DYNAMIQUE INTRACELLULAIRE**

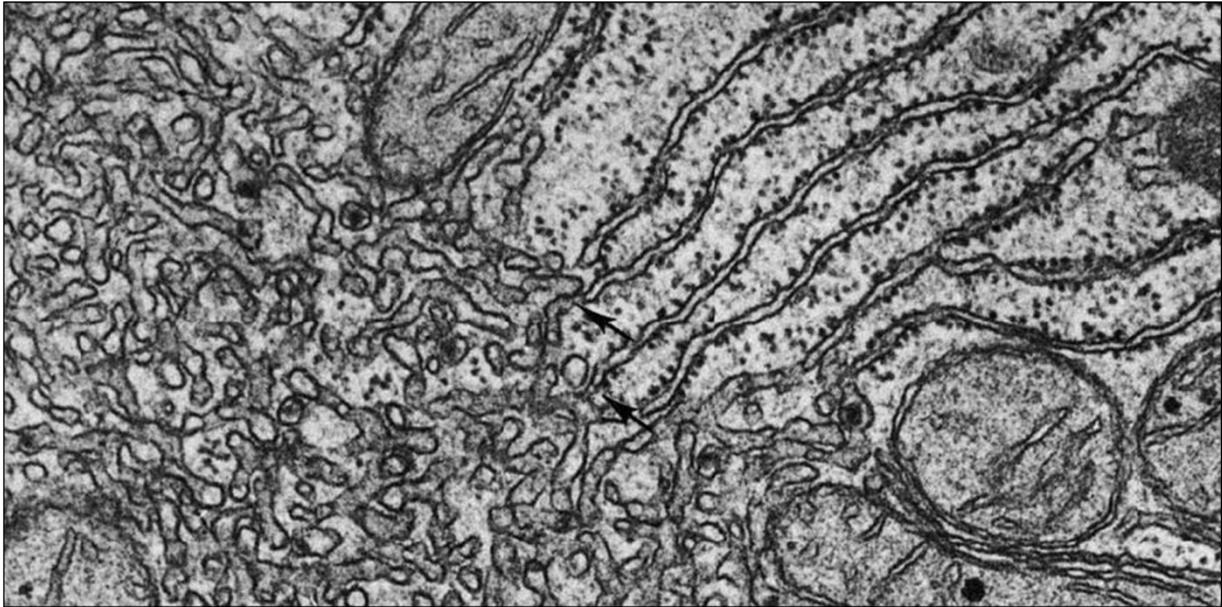


Figure 1 : Réticulum endoplasmique en microscopie électronique en transmission

Micrographie d'une cellule de foie, où l'on peut distinguer les tubules du RE rugueux ainsi que le réseau branché de tubules du RE lisse. Des connections entre ces deux réseaux sont observées (◄).
Image de Robert Bolander, publiée dans : "The Cell, 2nd Ed." par Don W. Fawcett M.D.

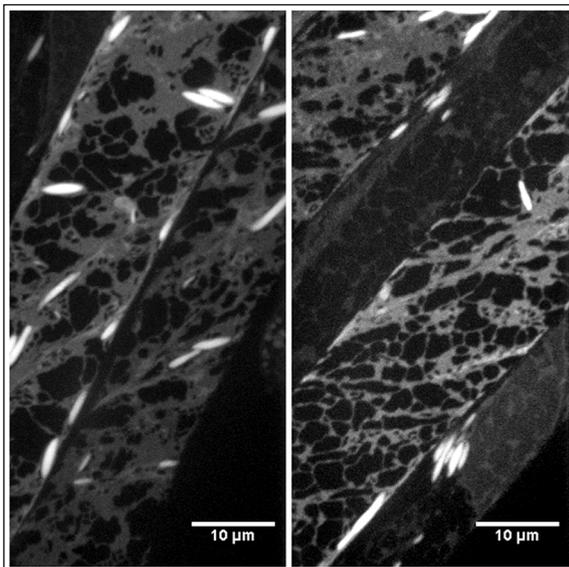


Figure 2 : Réseau cortical du réticulum endoplasmique chez Arabidopsis

Cellules épidermiques de racine exprimant GFP-HDEL. On distingue les différentes structures du RE: en tubule, en feuillet ainsi que les "ER-bodies".

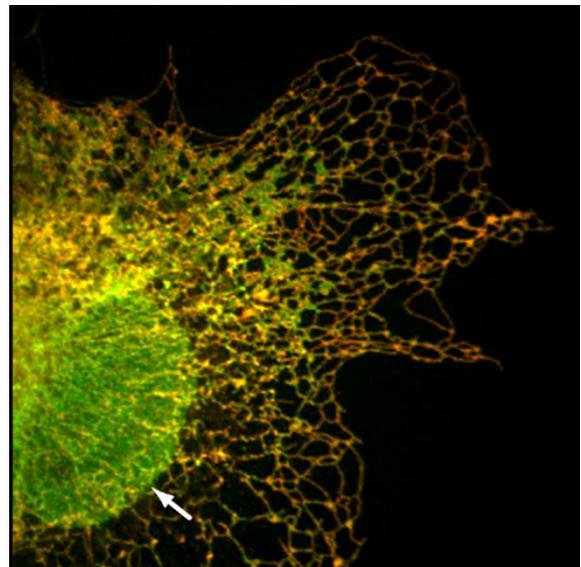


Figure 3 : Différentes courbures au sein du RE chez les mammifères

Cellule en culture, coexprimant Sec61 β (vert) marquant la membrane du RE et le réticulon Rtn4c (Rouge) , identifiant les zones de forte courbure comme les tubules ou les bords des feuillets.
(Shibata et al., 2006)

Avec la progression du pouvoir de résolution de la microscopie, il devient clair que l'organisation de la cellule en compartiments fonctionnels spécifiques est un élément clef de l'évolution. Ces compartiments sont caractérisés par leur forme, leur contenu moléculaire ainsi que leur fonction. Le système endomembranaire, composé *a minima*, du réticulum endoplasmique, de l'appareil de Golgi, des vacuoles, et d'endosomes, prend en charge les événements d'exportation (exocytose), d'importation (endocytose), de stockage ou de dégradation (sécrétion vacuolaire) de molécules lipidiques, saccharidiques ou protéiques. Cette organisation est remarquable par le fait qu'elle soit à la fois commune à toute cellule eucaryote, tout en présentant une importante capacité à s'adapter et à se remodeler afin de répondre au mieux aux besoins propres à chaque règne, espèce, ou même à chaque type cellulaire.

1. Un habillage commun aux cellules eucaryotes

Le réticulum endoplasmique. Point d'entrée du système endomembranaire, il se définit comme un réseau de tubules membranaires présents dans toute la cellule (Staehelin 1997). Organisé en un maillage complexe, juxtaposant des zones tubulaires avec des zones "en feuillet" (Figs. 1, 2), il présente des différences d'organisation fondamentale entre les types cellulaires. Dans la cellule végétale, il se trouve organisé en réseau cortical autour de la cellule (Fig. 2), tandis que dans les cellules animales, il est le plus souvent rayonnant à partir de la membrane nucléaire vers la surface cellulaire (Fig. 3),

L'imagerie du vivant a mis en exergue l'extrême dynamique et versatilité du réticulum endoplasmique (RE) de la cellule végétale, et a ainsi conforté l'existence de macrodomaines structuraux. La dynamique du RE couvre en fait plusieurs niveaux : un courant luminal entraînant des "ER bodies" est souvent observé dans tout le réseau (Ueda, Yokota et al. 2010); et des zones extrêmement dynamiques capables d'émettre de nouvelles structures tubulaires, ayant la capacité de fusionner avec des structures existantes plus stables, probablement ancrées à la surface cellulaire par exemple (Sparkes, Runions et al. 2009). De plus ce réseau a la capacité de se remodeler en permanence, modulant ainsi les proportions de tubules et de feuillet en fonction des conditions physiologiques de la cellule (Chen, Doyle et al. 2012). La

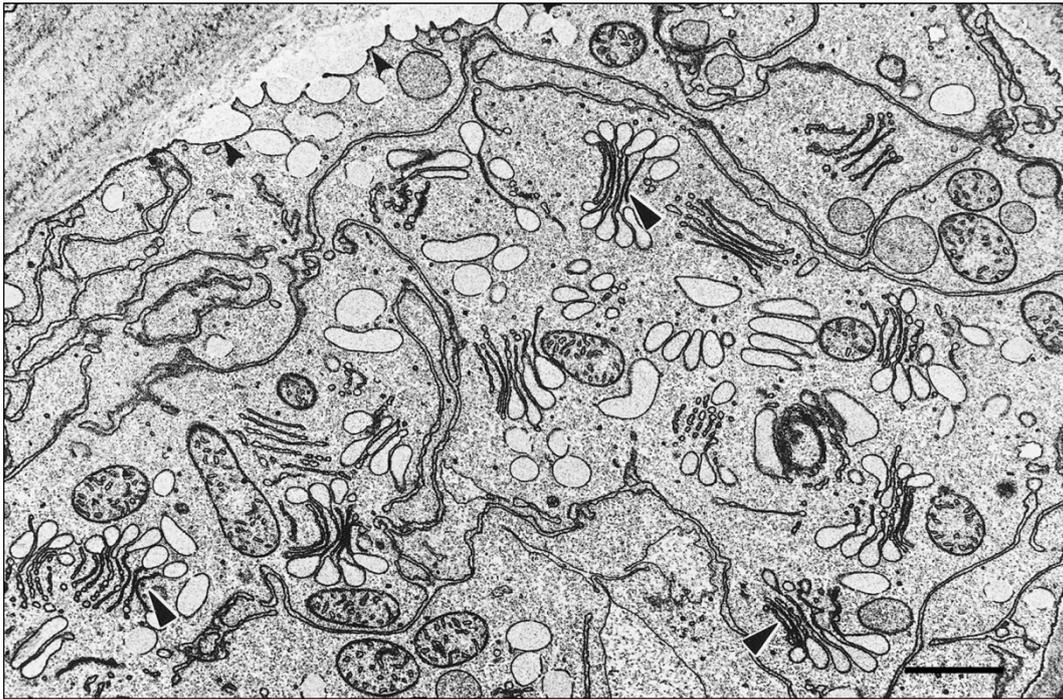


Figure 4 : Morphologie de l'appareil de Golgi chez les plantes supérieures

Micrographie électronique en transmission de cytoplasme d'une cellule de coiffe racinaire de maïs. Ces cellules ont une activité sécrétrice très importante afin d'excréter d'importantes quantités de mucopolysaccharides. Dans ces cellules, les multiples dictyosomes forment de larges vésicules de sécrétion. Echelle : 1 μm

(Dupree et Sherrier, 1998)

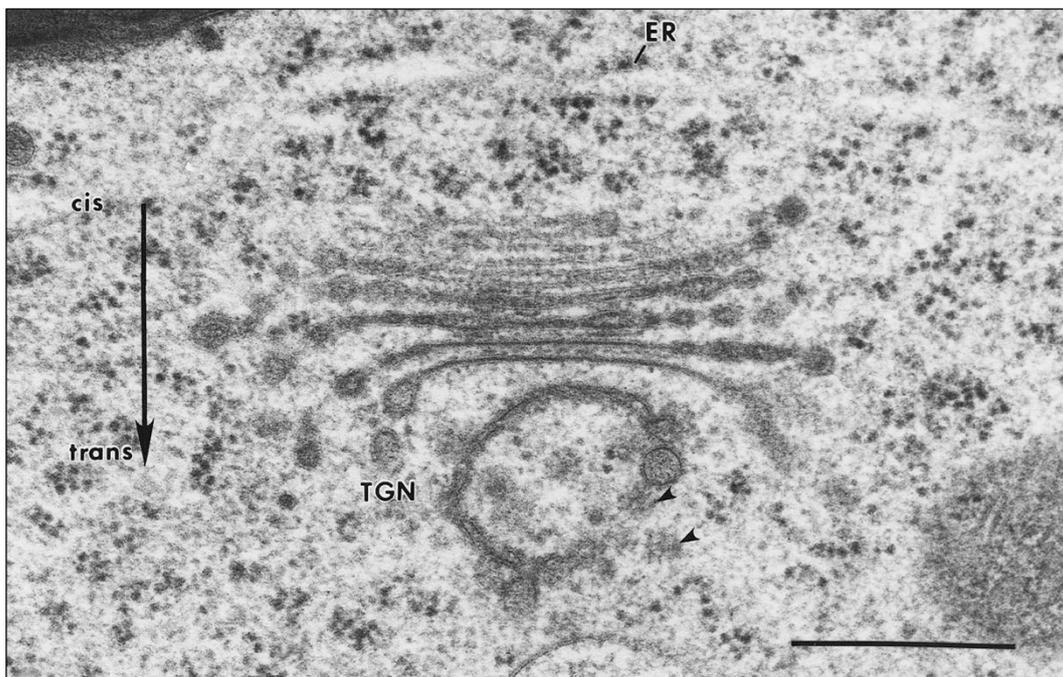


Figure 5 : Etude ultrastructurale d'un empilement golgien de tabac

Micrographie électronique en transmission d'un dictyosome d'une cellule racinaire de *Nicotiana*. Les caractéristiques morphologiques des citernes changent entre la face *cis*, proche du réticulum endoplasmique (ER), et la face *trans*. Au delà de la face *trans* on discerne le réseau trans-golgien (TGN), duquel sont générées des vésicules recouvertes de clathrine (flèches) Echelle : 0.5 μm

(Dupree et Sherrier, 1998)

dynamique du réticulum et sa capacité à modifier sa forme est fortement liée à ses interactions avec d'autres structures subcellulaires notamment le cytosquelette. Chez les plantes, c'est essentiellement le réseau de filaments d'actine et les myosines associées qui jouent ce rôle (Sparkes, Runions et al. 2009).

La transition entre les structures en feuillets et les structures tubulaires est liée à un équipement protéique spécifique du réticulum : les réticulons (Tolley, Sparkes et al. 2008). Ces protéines permettent grâce à leur effet sur la courbure membranaire de générer et de stabiliser des zones présentant de fortes courbures comme les tubules ou les bords des feuillets (Voeltz, Prinz et al. 2006) (Fig. 3).

Les données bibliographiques finalement soulignent que sous le couvert de ce continuum membranaire se dessinent en fait des domaines morphologiquement différents, suggérant des fonctions distinctes, qui montrent la capacité d'un compartiment à s'organiser en macrodomaines structuraux (Moreau, Brandizzi et al. 2007).

L'appareil de Golgi. Carrefour de nombreuses voies de transport vésiculaire, l'appareil de Golgi forme un ensemble membranaire composé d'empilements de saccules membranaires reliés par des structures tubulaires. Dans une cellule végétale issue de plantes supérieures, il est classiquement décrit comme un ensemble d'une centaine d'empilements de saccules, indépendants les uns des autres (appelés dictyosomes) répartis dans tout le cytoplasme (Mollenhauer and Morré 1994) (Brown, Bolte et al. 2010) (Fig. 4).

A travers la description d'un dictyosome, on retrouve la notion de macrodomaines évoquée pour le réticulum endoplasmique : le centre des saccules est constitué d'une zone en feuillet, non perforée, de laquelle se forment les tubules, alors que l'extrémité des saccules est beaucoup plus tubulaire, donnant souvent un aspect "en dentelles" à ce compartiment. L'extrémité des saccules est aussi plus souvent marquée par la présence de contenus plus denses aux électrons, précurseur des futures vésicules de sécrétion qui se formeront à ce niveau (Képès, Rambourg et al. 2004). D'autre part, en plus de cette différenciation "latérale", on peut distinguer différentes régions dans un empilement golgien : le "*cis*-Golgi" reçoit des vésicules de sécrétion provenant du réticulum endoplasmique. Les molécules cargo vont

ensuite traverser une région "*median-Golgi*" et transiter à travers les saccules jusqu'au "*trans-Golgi*" (Dupree and Sherrier 1998) (Fig. 5).

Dans la cellule végétale, les mécanismes sous-tendant la formation d'un empilement du Golgi sont encore sources de débat : morphogenèse de novo à partir d'un centre de nucléation et de fusions membranaires, morphogénèse par différenciation du réticulum endoplasmique ou morphogenèse à partir de la division d'un empilement sacculaire existant. Ces hypothèses discutées dans la littérature ne semblent pas forcément exclusives (Hawes and Satiat-Jeunemaitre 2005) (Brown, Bolte et al. 2010).

Le Golgi est classiquement considéré comme un organite carrefour des fonctions d'endocytose, d'exocytose et de sécrétion vacuolaire. La fonction de "plaque tournante" des différentes voies de trafics intracellulaire serait en fait assurée par un compartiment issu mais distinct du Golgi, le réseau trans-golgien (TGN).

Le réseau trans golgien. Il est formé par un réseau de tubules et de vésicules, présent au-delà de la face *trans* du Golgi, présentant de nombreux bourgeonnements membranaires dont certains sont associés à un manteau de clathrine (Staelin and Moore 1995). Sa morphogénèse dépend d'un processus de maturation à partir du Golgi (Staelin and Kang 2008) (Fig. 5). Cette structure est une sorte de plateforme qui permet de trier et d'adresser un très grand nombre de vésicules contenant soit des protéines néo-synthétisées destinées à différents compartiments intra cellulaires, soit du matériel provenant de l'endocytose destiné à être recyclé ou à être dégradé (Gu, Crump et al. 2001).

Le plasmalemme. La membrane plasmique, ou plasmalemme, constitue une frontière et une surface d'échange organisées. Bien que la membrane plasmique ne soit pas un "compartiment subcellulaire" à proprement parlé, (elle définit en fait la cellule), il est courant de la considérer comme partie intégrante du système endomembranaire car elle est la destination finale de la plupart des molécules cargo transitant par le système endomembranaire (exocytose) (Drakakaki and Dandekar 2013). Elle est aussi le point de départ de flux membranaires permettant d'internaliser ou de recycler des molécules présentes

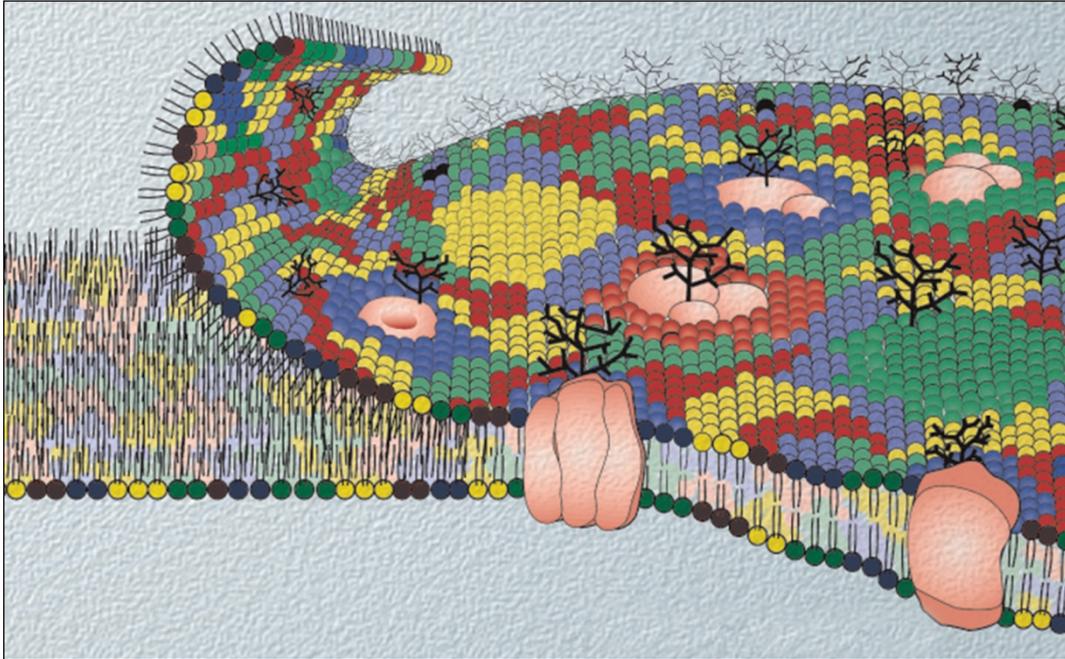


Figure 6 : Le modèle de la mosaïque fluide de Singer et Nicholson

Illustration représentant le modèle de la mosaïque fluide, proposé par Singer et Nicholson, afin d'expliquer le comportement de la membrane plasmique. On peut distinguer les différentes sortes de lipides qui forment la bicouche arrangés de manière non homogène, formant des microdomaines membranaires. Sont également représentées les différentes catégories de protéines membranaires.

(Edidin, 2003)

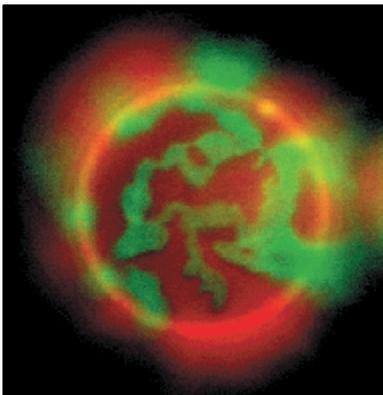


Figure 7 : Domaines membranaires *in-vitro*

Mise en évidence *in-vitro* de la formation de domaines lipidiques au sein d'une membrane formée d'un mélange entre des phospholipides fluides à courtes chaînes désordonnées et des phospholipides à longues chaînes ordonnées. En fonction de leurs affinités les analogues lipidiques fluorescents DilC18 (rouge) et BODiY PC (vert) se répartissent respectivement au sein des domaines plus ordonnés ou plus fluides.

(Edidin, 2003)

soit au niveau du milieu extracellulaire soit au niveau de la membrane plasmique elle-même (endocytose) (Kumari, Mg et al. 2010). Le profil de la membrane plasmique autour de la cellule peut s'adapter aux besoins cellulaires pour moduler la quantité ou la qualité des surfaces d'échanges entre milieu extérieur et intérieur.

Il est commun de définir la membrane plasmique, ou plasmalemm, comme une bicouche lipidique, de nature variable en fonction de l'espèce et du type cellulaire, délimitant le cytoplasme, dans laquelle s'insèrent ou s'attachent de nombreuses protéines et dont le but premier est de former une barrière physique limitant la diffusion des molécules hydrosolubles (Furt, Simon-Plas et al. 2011). Les différents modèles décrivant la membrane plasmique comme une mosaïque fluide (Singer and Nicolson 1972) (Fig. 6) ont suggéré que cette fluidité permet aux différents lipides et protéines de dériver latéralement et de créer ainsi des disparités locales (Jacobson, Sheets et al. 1995). Ces microdomaines modifient les propriétés physiques de la membrane et facilitent les événements de formation et de fusion de vésicules. De nombreuses études *in vitro* ont permis d'étudier la capacité des lipides à s'auto-organiser en domaines membranaires distincts (Fig. 7). L'identification de "radeaux lipidiques" (RAFTs), qui sont des microdomaines riches en sphingolipides et en stérols d'environ 50 nm, montre bien à quel point la membrane plasmique est structurée. Décélés dans toutes les cellules eucaryotes, les RAFTs ont la capacité de recruter ou d'exclure différentes protéines permettant une organisation très efficace de différents acteurs au niveau de ces domaines membranaires et jouant ainsi un rôle important dans la signalisation (Simons and Toomre 2000).

Les études sur la polarité cellulaire soulignent également l'hétérogénéité de la membrane plasmique au niveau cellulaire. Dans la cellule végétale, les récentes études sur les transporteurs d'auxine mettent en exergue cette formidable capacité cellulaire de réguler la composition de macrodomaines membranaires pour une orchestration fine de flux hormonal au niveau tissulaire (Tanaka, Kitakura et al. 2013).

Les compartiments lytiques. Bien que la nature de ces compartiments ait évolué en fonction des types cellulaires et des espèces, leur fonctionnement est resté très proche, qu'on les nomme vacuole chez les levures et les plantes (Li and Kane 2009) (Matile 1975) ou

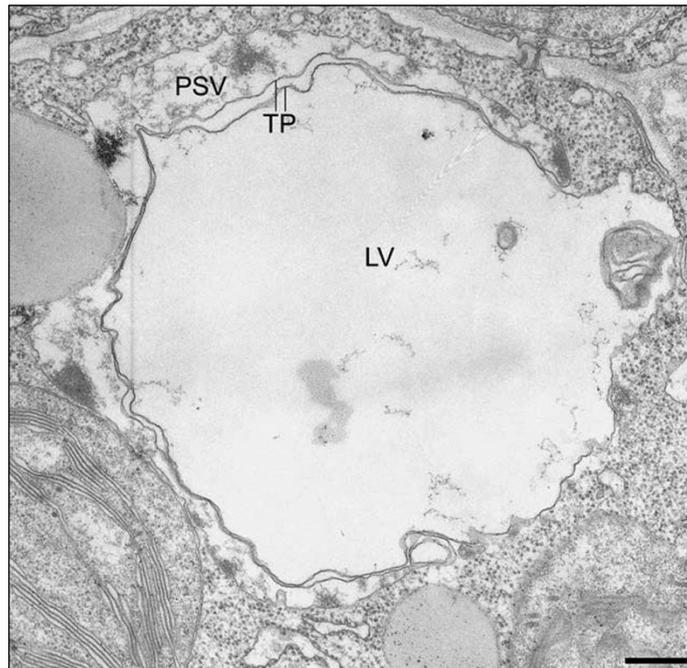


Figure 8 : Les différents types de vacuoles végétales

Micrographie électronique en transmission d'une cellule d'*Arabidopsis thaliana*. Dans certains types cellulaires, on peut voir coexister des vacuoles lytiques (LV) et des vacuoles de stockage (PSV). Tonoplaste (TP). Echelle : 320 nm
(Frigerio et al., 2008)

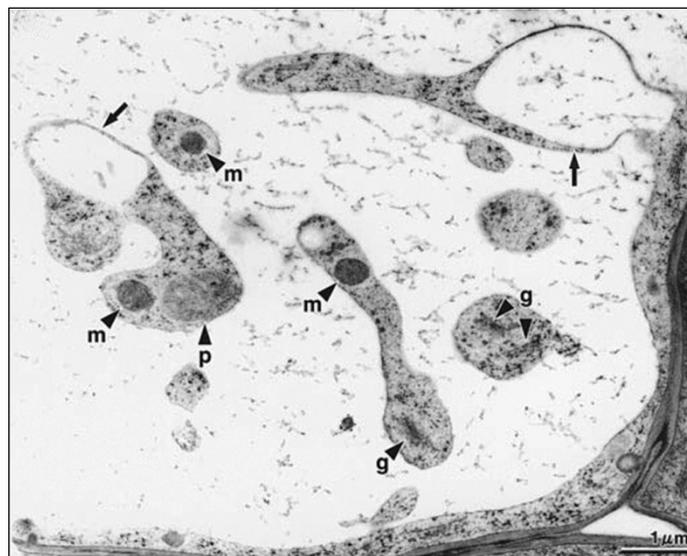


Figure 9 : Les "bulbs" vacuolaires

Chez les plantes, les bulbs sont des invaginations de la membrane vacuolaire englobant des composants cytosoliques suite à une différenciation de la membrane vacuolaire.
(Saito et al., 2002)

lysosomes chez les animaux (de Duve 2005). Afin de permettre la dégradation de leur contenu, de nombreuses structures membranaires telles que des vésicules de transport, des endosomes tardifs, des phagosomes ou des autophagosomes vont fusionner avec les compartiments lytiques (Luzio, Pryor et al. 2007). Une fois la phase de dégradation effectuée, les différents produits générés vont retourner vers le cytoplasme pour y être réutilisés. La complexité de la physiologie des vacuoles est racontée dans de nombreuses revues, tant dans le domaine animal que végétal (Matile 1975) (Frigerio, Hinz et al. 2008) (Wada 2013).

Dans la cellule végétale, il existe différents types de vacuoles assurant différentes fonctions (Marty 1999) (Fig. 8). A côté des vacuoles lytiques, assurant la fonction de lysosomes, il y a notamment des vacuoles de stockage (Paris, Stanley et al. 1996) (Fig. 8). Ces deux types de vacuoles sont différents de par leur fonction, leur pH, la présence de marqueurs spécifiques à leur surface ainsi que par l'existence de voies d'adressage différentes (Frigerio, Hinz et al. 2008). La présence de ces deux types de vacuoles est fortement dépendante de l'espèce, du tissu, du stade développemental ainsi que des conditions environnementales de la cellule étudiée. Qu'elles aient vocation à être dégradées pour le bénéfice de la cellule ou à être stockées pour une remobilisation éventuelle en cas de besoins, de nombreuses molécules cargo aboutissent dans des compartiments vacuolaires. Ceux-ci ont donc un rôle essentiel dans l'homéostasie cellulaire, et ce à différents niveaux. D'autre part, les vacuoles lytiques chez les plantes présentent aussi une très grande variété de forme: alors que dans les cellules méristématiques on trouve de nombreuses petites vacuoles sphériques, dans les cellules différenciées on trouve souvent une grande vacuole centrale qui occupe 90 % de l'espace cellulaire et qui joue un rôle essentiel dans les phénomènes d'élongation cellulaire de par la pression de turgescence qu'elle génère. Cette hétérogénéité est également présente au niveau membranaire, puisque certaines protéines se retrouvent parfois concentrées dans certains domaines, c'est le cas au niveau des "Bulbs" (Fig. 9), qui sont des invaginations complexes de la membrane vacuolaire (Saito, Ueda et al. 2002).

Cette pleiomorphie du système vacuolaire et sa capacité de ségréger des protéines dans certains sous-domaines illustre là encore la capacité de transformation et d'auto-organisation des compartiments endomembranaires.

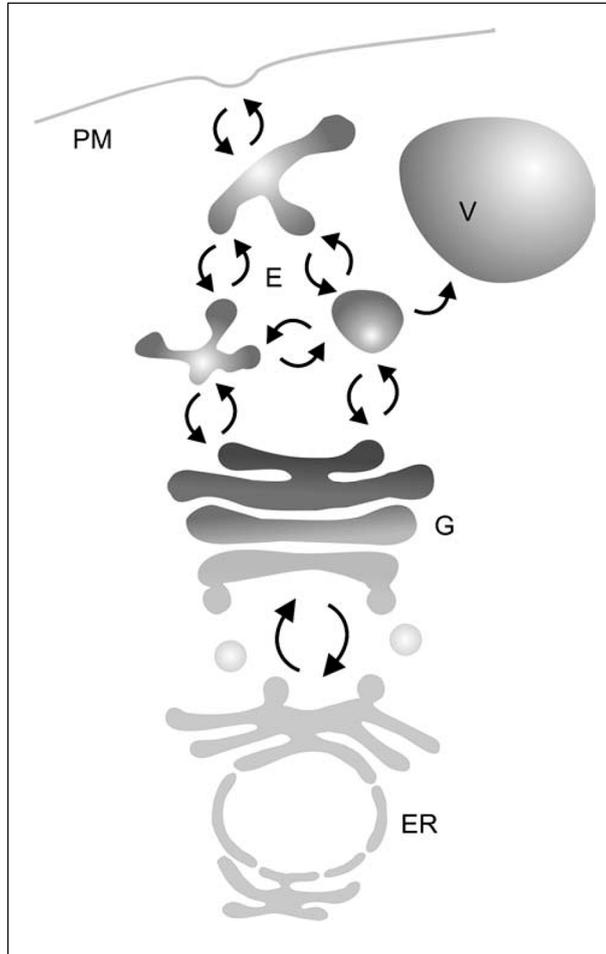


Figure 10 : La voie de sécrétion conventionnelle

Schéma représentant l'organisation de la voie de sécrétion commune aux eucaryotes. On y retrouve le réticulum endoplasmique (ER), l'appareil de Golgi (G), différents types d'endosomes (E), la membrane plasmique (PM) ainsi que le compartiment lytique : dans ce cas, la vacuole (V). Bien que cette organisation soit conservée, parmi les eucaryotes, il existe cependant des différences, essentiellement au niveau des compartiments post-golgiens.

(Foresti et Denecke, 2008)

Des compartiments "intermédiaires". Les compartiments décrits ci-dessus composent l'ossature du SE décrites avec l'avènement de la microscopie électronique en transmission (MET). L'explosion des approches d'imagerie fonctionnelle ont mis en évidence ces dernières années l'existence de toute une série de compartiments "intermédiaires" entre ces grandes plates-formes membranaires : compartiments prévacuolaires, compartiments de recyclage, endosomes précoces et endosomes tardifs (ou corps multivésiculaires), exosomes, etc., qui sont autant d'organites identifiés comme porteurs d'une signature moléculaire spécifique.

2. Les principales voies du trafic cellulaire chez les plantes

Une compilation de schémas, illustrant les différentes possibilités de transport entre compartiments révèle une fascinante capacité d'échanges par transport membranaire entre compartiments. Voies dites "conventionnelles" ou "non-conventionnelles", elles ont en commun une grammaire commune de base, et permettent à la cellule de mobiliser plusieurs stratégies pour aboutir au positionnement d'une molécule cargo au bon moment et au bon endroit dans la cellule en réponse à un besoin donné.

La voie de sécrétion dite "conventionnelle". Plusieurs routes permettent de délivrer du matériel cellulaire vers l'extérieur de la cellule, cependant la grande majorité de ce transport antérograde s'effectue par une voie, dite "conventionnelle" (Fig. 10), ou "voie par défaut" car aucun signal d'adressage n'a été à ce jour identifié pour aller d'un compartiment à l'autre au sein de cette voie. Dans la cellule végétale, comme dans toute cellule eucaryote, au départ de cette voie on trouve le RE, où débute la synthèse de nombreuses protéines et lipides, destinés à être transportés à la membrane plasmique ou vers l'espace extracellulaire. Une fois correctement repliés, les différentes molécules cargos sont incorporées dans des vésicules quittant le RE en direction de l'appareil de Golgi. Ces vésicules particulières assurant le transport vers le Golgi, peuvent être des vésicules mantelées, dont la formation est dépendante d'un complexe protéique : COP-II (COat Protein complex-II) (Fig. 11). Il existe au niveau du RE des domaines particuliers où sont concentrés les différents acteurs de la machinerie COP-

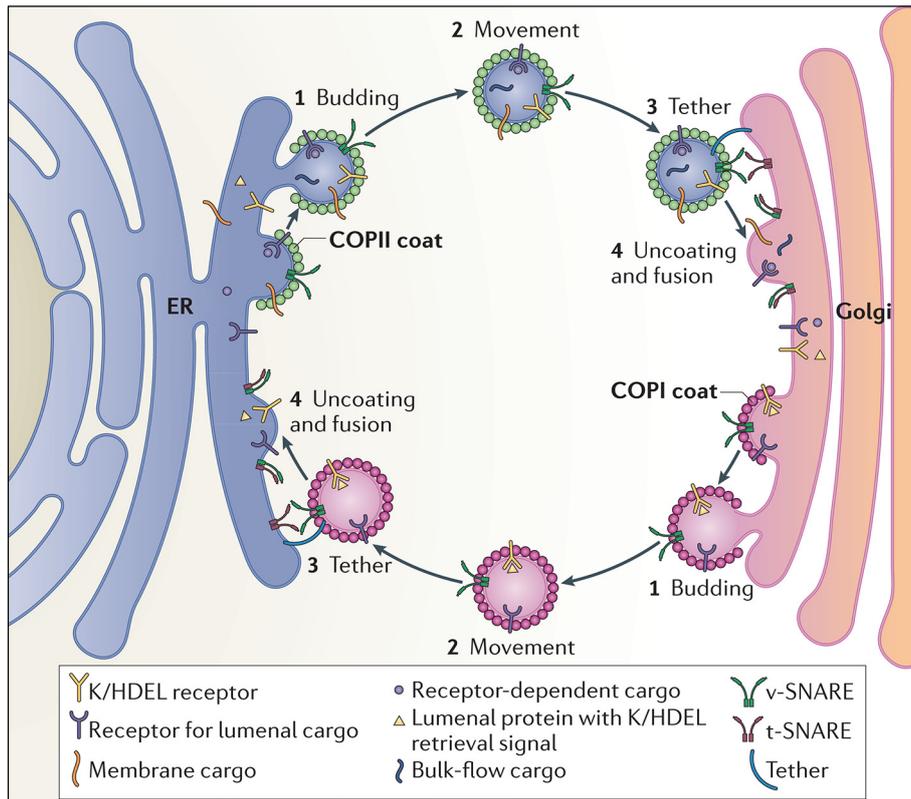


Figure 11 : Transport vésiculaire bidirectionnel entre le RE et le Golgi

Les échanges entre le réticulum endoplasmique et le Golgi, sont assurés par un trafic vésiculaire bidirectionnel. Le trafic du RE au Golgi est assuré par la machinerie COP-II alors que le transport du Golgi au RE se fait par l'intermédiaire de la machinerie COP-I.

(Brandizzi et Barlowe, 2013)

II, ainsi que les différents cargos destinés à entrer dans la voie antérograde. Ces domaines particuliers du RE appelés ERES (Endoplasmic Reticulum Exit Site) (Tang, Wang et al. 2005), marquent le lieu de formation des vésicules COP-II. Une fois formées, ces vésicules COP-II vont se débarrasser de leur manteau ce qui va leur permettre d'interagir avec des complexes protéiques d'ancrage ou de fusion de type SNAREs, afin de fusionner avec la face *cis* du Golgi (Bassham, Brandizzi et al. 2008), (dans les cellules végétales, il n'existe pas de compartiments intermédiaires clairement identifiés entre réticulum et Golgi (Brandizzi and Barlowe 2013)). En parallèle de ce transport vésiculaire antérograde, il existe également un transport vésiculaire rétrograde entre le *cis*-Golgi et le RE, permettant de recycler vers le réticulum, différents composants lipidiques ou protéiques, mettant en jeu une autre population de vésicules mantelées, les COPI. Pour les molécules cargo destinées à la sécrétion, il y a une progression à partir du *cis*-Golgi et à travers les saccules golgiennes jusqu'à atteindre la face *trans*, selon un mécanisme encore débattu (Nebenführ and Staehelin 2001). Pour arriver jusqu'au plasmalème, quelques études semblent suggérer que plusieurs voies sont possibles en fonction du cargo (Leucci, Sansebastiano et al. 2007), impliquant soit un adressage direct entre le Golgi et la membrane plasmique, soit une route moins directe passant par plusieurs compartiments post-golgiens comme le réseau trans-golgien (TGN) ou les compartiments pré-vacuolaires (PVC) (Foresti and Denecke 2008).

Les voies de sécrétion "non conventionnelles". Plus de 50 % des protéines végétales sécrétées (le sécrétome), ne possèdent pas le peptide signal nécessaire pour intégrer la voie de sécrétion au niveau du RE (Agrawal, Jwa et al. 2010). Ces données suggèrent que comme chez les animaux (Nickel 2010), il doit exister également chez les plantes des routes alternatives "non conventionnelles", permettant d'adresser des protéines à la membrane plasmique (Drakakaki and Dandekar 2013). Chez les plantes, plusieurs voies non conventionnelles ont été identifiées, permettant la sécrétion de protéines sans passer par le Golgi (Zhang, Zhang et al. 2011) : le relargage de vésicules dans l'apoplasme par l'intermédiaire de corps multivésiculaires (MVBs) (An, Hüchelhoven et al. 2006), ou d'un compartiment à double membrane (EXPO) (Wang, Ding et al. 2010), puis de leur fusion avec la membrane plasmique.

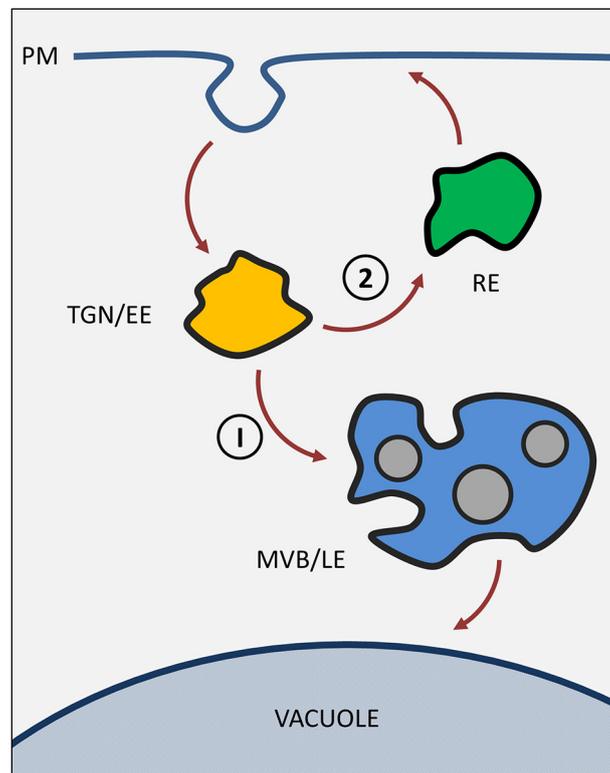


Figure 12: Principales destinations des cargos lors de l'endocytose

Une fois formée, la vésicule d'endocytose va fusionner avec un endosome précoce (*Early Endosome*, EE). Ensuite deux voies majoritaires permettent : soit sa dégradation au niveau de la vacuole après fusion avec un corps multi vésiculaire (*Multivesicular Body*, MVB) (1), soit sont recyclage vers la membrane plasmique, via des endosomes de recyclage (*Recycling Endosomes*, RE) (2).

Les principales voies d'internalisation. Phagocytose, pinocytose, transcytose, endocytose sont autant de termes couvrant différents processus d'internalisation cellulaire, faisant appel à des structures membranaires différentes, et répondant à des nécessités distinctes de la vie cellulaire. Comme dans toute cellule eucaryote, plusieurs voies endocytiques ont été suggérées dans les cellules végétales (Bandmann and Homann 2012) (Fig. 12). De nombreuses fonctions de la cellule végétale sont aujourd'hui connues pour impliquer l'endocytose : communication avec l'environnement pariétal et extra cellulaire, mécanismes de défense face à une attaque pathogène en permettant l'internalisation de récepteurs qui après détection d'un éliciteur vont permettre de déclencher la réponse hypersensible (HR), signalisation cellulaire en régulant la présence à la membrane plasmique de différents récepteurs hormonaux ou transporteurs spécifiques. Enfin, chez les plantes, l'endocytose semble participer également à la formation de la plaque cellulaire, mise en place lors de la cytodierèse afin de séparer les deux cellules filles (Dhonukshe, Baluška et al. 2006).

En plus de ces deux grandes voies que sont l'endocytose et l'exocytose, il existe de nombreuses interconnexions entre les différents acteurs. C'est le cas par exemple de l'adressage de certaines protéines vers la vacuole sans passer par le Golgi (Levanony, Rubin et al. 1992) ou le retour de récepteurs membranaires présents à la surface des endosomes vers le TGN via l'intervention du complexe rétromère (Seaman 2012). La complexité des échanges entre compartiments constitue un domaine de recherche en pleine explosion. L'identification de nouveaux compartiments "intermédiaires" sont autant de marquages de la multitude des étapes possibles pour une molécule cargo en transit d'un compartiment donneur à un compartiment final cible, mettant en exergue l'extrême ramification des voies du trafic intracellulaire.

3. Machineries moléculaires associées

Face à la complexité des nombreuses voies mise en évidence au sein du système endomembranaire, il est essentiel pour la cellule de disposer d'une machinerie moléculaire permettant la régulation de ce trafic. Afin de garantir l'intégrité des composants transportés, et

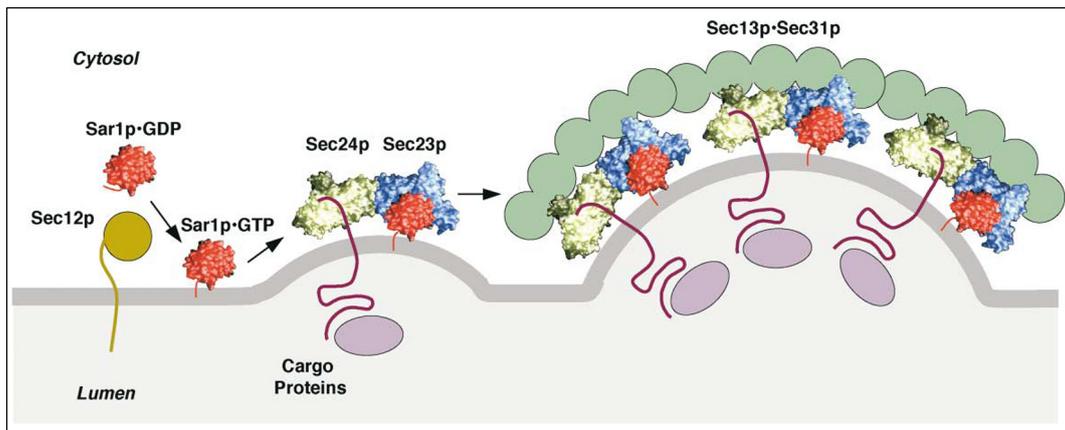


Figure 13 : Assemblage du manteau COP-II

Sar1-GDP est convertie en Sar1-GTP par Sec12 ce qui permet son recrutement à la membrane. Sar1 permet le recrutement du complexe Sec24-Sec23, initiant la courbure membranaire et liant le cargo. Enfin le super-complexe Sec13-Sec31 est recruté, permettant de finaliser la formation de la vésicule et de concentrer le cargo, formant ainsi le manteau de ces vésicules COP-II.

(Bonifacino et Glick., 2004)

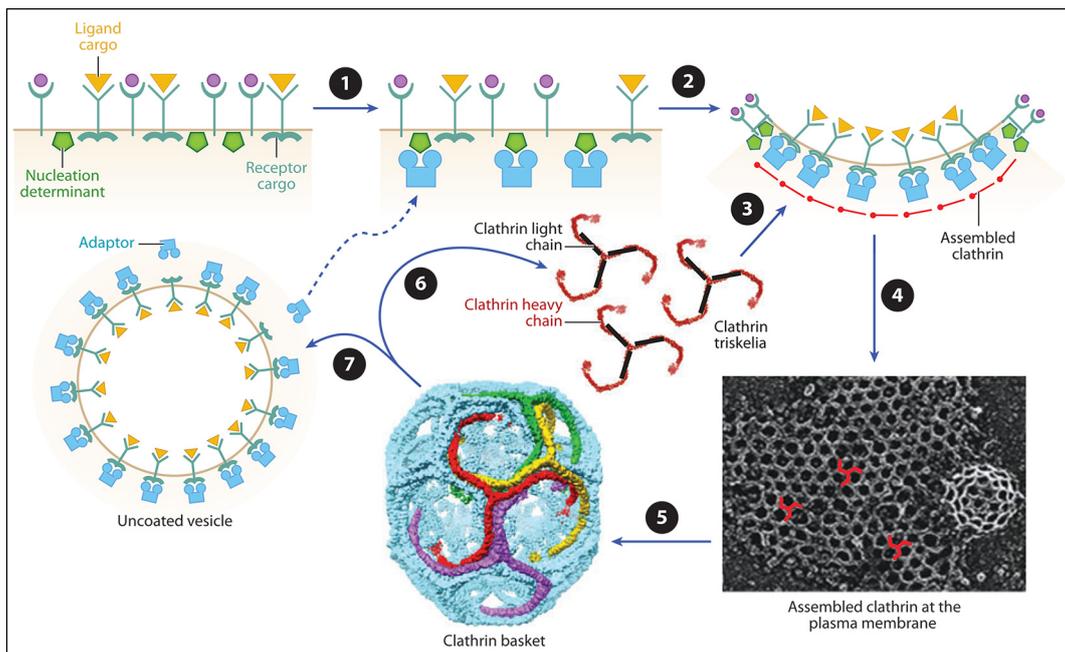


Figure 14 : Formation des vésicules à manteau de clathrine

La fixation du cargo par son récepteur membranaire, va permettre le recrutement des protéines adaptatrices (1). Ces protéines adaptatrices vont permettre de recruter les triskèles de clathrine, présents au niveau du cytoplasme, ainsi que leur assemblage (2) (3). La formation de ce manteau de clathrine va permettre de concentrer les cargos à internaliser au niveau du "puits de clathrine", et de permettre la formation complète de la vésicule (4) (5). Enfin, une fois la vésicule formée, la clathrine et les protéines adaptatrices, vont quitter la vésicule, permettant ainsi sa fusion (6) (7).

(Brodsky, 2012)

d'optimiser l'efficacité de leur transport, la cellule fait majoritairement appel à une stratégie de navettes membranaires, vésiculaires ou tubulaires. De nombreuses protéines, jouant des rôles bien précis dans ces phénomènes d'échanges inter compartiments ont été identifiées.

Un ensemble de protéines est impliqué dans la formation des vésicules. Certaines familles sont en charge de la détection du cargo. Elles vont permettre de concentrer à l'endroit de la formation de la vésicule les différents cargos à transporter. C'est le cas par exemple, du complexe Sec23/Sec24 lors de la formation de "vésicules COPII" (Paul and Frigerio 2007) (Fig. 13). Ensuite, on assiste au recrutement des protéines de manteau, de manière plus ou moins directe en fonction des types de vésicules. Ces protéines de manteau vont jouer un rôle prépondérant dans la formation des vésicules en favorisant les mécanismes de déformation des membranes. De nombreux types de vésicules font appel à des protéines de manteau pour leur formation, c'est le cas par exemple de la clathrine pour certaines vésicules d'endocytose (Fotin, Cheng et al. 2004) (Fig. 14), ou du complexe Sec13/Sec31 pour les vésicules COPII.

Rapidement après leur formation, les vésicules vont se débarrasser des protéines de manteau qui les recouvrent, et rejoindre leur compartiment de destination. Cette étape nécessite l'intervention de protéines permettant à la vésicule d'identifier spécifiquement le compartiment avec lequel elle doit fusionner parmi tous les autres compartiments présents dans la cellule. Parmi les nombreuses classes de protéines impliquées dans ces phénomènes d'identification, on trouve les Rab qui sont des GTPases cytosoliques sous leur forme GDP et qui s'ancrent au niveau des membranes lorsqu'elles sont activées (forme GTP). Chez *Arabidopsis*, on trouve 57 membres de cette famille de protéines (Vernoud, Horton et al. 2003), et leur ancrage spécifique à la membrane d'un compartiment particulier, fait de cette famille de protéines un formidable système permettant d'identifier chaque compartiment grâce à une signature particulière (Geldner, Dénervaud-Tendon et al. 2009). Une fois actives, ces Rab vont permettre le recrutement et l'activation d'autres facteurs, permettant l'interaction avec des moteurs moléculaires mais également la reconnaissance entre la vésicule et le compartiment de destination ainsi que la fusion.

Parmi les protéines favorisant l'ancrage de la vésicule et sa fusion, la famille des SNAREs est de loin la plus étudiée pour ces phénomènes (Südhof and Rothman 2009). Les SNAREs sont des protéines transmembranaires, présentes de manière plus ou moins spécifique à la surface des différents compartiments cellulaires (Sanderfoot 2007), que l'on

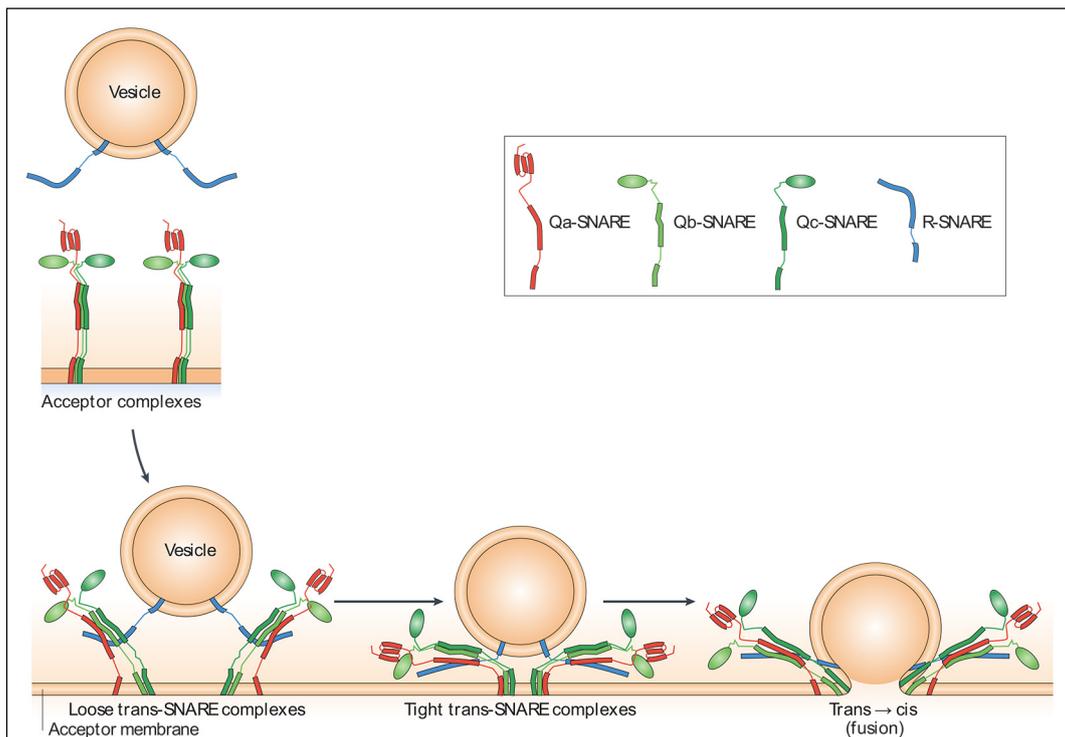


Figure 15: Implication des protéines SNAREs dans la fusion de vésicules

La reconnaissance des v-SNAREs (type R) et des t-SNAREs (types Qa, Qb Qc, formant un complexe accepteur) permet dans un premier temps l'ancrage de la vésicule à la membrane acceptrice. La transition de ce complexe, formé de 4 hélices, d'une conformation relâchée à une conformation resserrée, va permettre le rapprochement des membranes et promouvoir leur fusion.

(Adapté de : Jahn et Scheller, 2006)

peut classer en deux catégories : les v-SNAREs, présentes à la surface des vésicules de transport, et les t-SNAREs, présentes au niveau des membranes cibles. Les v-SNAREs ont la capacité d'interagir spécifiquement avec des complexes t-SNAREs spécifiques, et lors de cet appariement, les domaines hélicoïdaux des deux partenaires s'assemblent pour former une structure stable, permettant non seulement l'ancrage de la vésicule mais générant également une force facilitant grandement la fusion entre la vésicule et la membrane cible (Jahn and Scheller 2006) (Südhof and Rothman 2009) (Fig. 15). Ce processus de reconnaissance et de fusion est également finement régulé par différentes classes de protéines comme les Rabs et les protéines de la famille SM (Sec1/Munc18-like), qui constituent une machinerie universelle permettant la fusion de manière spécifique et régulée de vésicules avec leur compartiment donneur (Südhof 2007).

En sus d'une machinerie moléculaire spécifique pour assurer des évènements de bourgeonnements, ou fusions membranaires spécifiques, la dynamique de la compartimentation cellulaire est également associée à la dynamique du cytosquelette. Actine, microtubules et leurs protéines associées sont couramment décrits comme les moteurs nécessaires pour les transports vésiculaires, et dans certains cas pourraient contribuer à la maintenance des compartiments membranaires. Tandis que la cellule animale s'appuie essentiellement sur son réseau de microtubules pour assurer les transports intracellulaires, c'est principalement à l'actine que sont attribués la majorité d'évènements dynamiques enregistrés dans la cellule végétale (Boutte, Vernhettes et al. 2007).

Chapitre II. MORPHOGENESE DE COMPARTIMENTS
ENDOMEMBRANAIRES

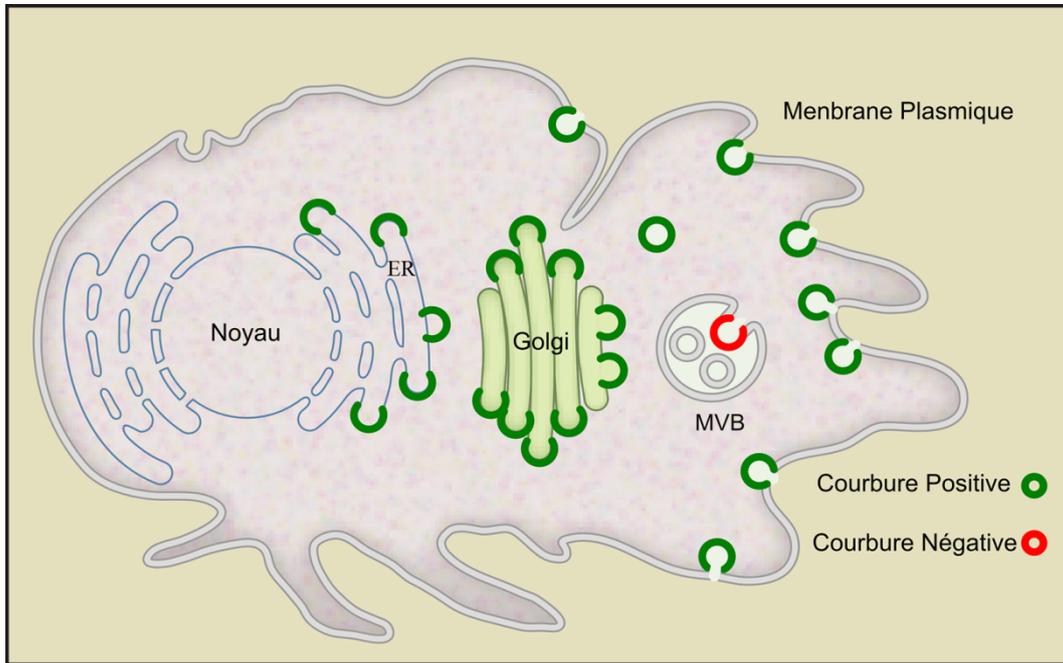


Figure 16 : Différents types de courbure sont présents au niveau subcellulaire

Schéma représentant les différents types de courbures présent essentiellement lors de la formation de vésicules au niveau subcellulaire. La grande majorité des évènements présentent une courbure positive : vésicules provenant du bourgeonnement du Golgi, du RE, et même de l'invagination de la membrane plasmique. Le cas de la formation de vésicules intraluminales au niveau du MVB est un exemple de vésicule à courbure négative.

Adapté de : Shen et al., 2012

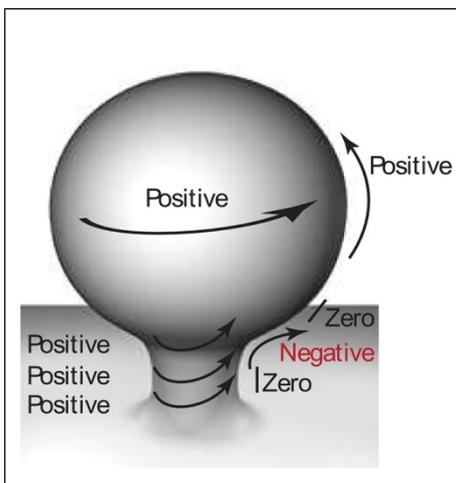


Figure 17 : Différents types de courbure sont présents sur une même structure

Au niveau d'une vésicule présentant une courbure globale positive, on peut trouver des régions présentant une courbure négative. Au niveau des extrémités du cou de la vésicule en formation, on trouve à la fois une courbure négative et une courbure positive orientées suivant deux plans perpendiculaires.

Adapté de : McMahon et Gallop, 2005

La compartimentation du système endomembranaire s'accompagne comme nous venons de le voir, d'un grand nombre d'échanges entre les compartiments. Nous avons vu à travers l'exemple du TGN que certains compartiments, avaient la capacité de se transformer pour aboutir à une nouvelle structure aux propriétés spécifiques, contribuant à la genèse de nouveaux compartiments en fonction des besoins cellulaires. Il existe dans la cellule de nombreux exemples de genèse de nouveaux compartiments, que ce soit à des fins de transport, ou directement liés à un stade ou un état particulier de la cellule. Le remodelage constant du SE est donc un élément clé de la vie cellulaire. C'est pourquoi nous allons nous intéresser, au cours de ce chapitre, aux mécanismes communs ou spécifiques qui ont été mis en place pour aider ce remodelage dynamique du SE.

1. Générer un compartiment à partir de courbures positives

La première étape nécessaire à la formation d'un compartiment du SE, consiste à modifier localement la forme du compartiment donneur. Que ce soit pour faire émerger un tubule ou pour amorcer la formation d'une vésicule, il va falloir générer, en un endroit précis, une courbure membranaire.

Au niveau cellulaire lorsque l'on parle de courbure, on la qualifie souvent de positive ou négative. Une courbure positive est une courbure générée en direction du cytoplasme, c'est le cas pour les vésicules d'endocytose, mais également pour les vésicules émises par le réticulum endoplasmique et le Golgi. Au contraire, les courbures négatives sont les courbures générées dans le sens opposé au cytoplasme, ce sont par exemple les courbures générées par des virus lors du bourgeonnement de la membrane plasmique vers l'apoplasme ou également lors de l'invagination des MVB (Fig. 16). Ces deux types de courbure peuvent cependant coexister sur une même structure (Fig. 17). C'est le cas pour la genèse des vésicules d'endocytose : la majorité de la structure en formation présente une courbure positive mais au niveau de l'attache au plasmalemma, entre le dôme et le col du puits de clathrine, on trouve un domaine qui présente une courbure négative sur un plan et une courbure positive sur un plan perpendiculaire au premier (McMahon and Gallop 2005).

Il est important de noter que des études *in vitro* ont montré que pour former une vésicule ou pour générer tout autre type de déformation, à partir d'une membrane plane, il faut de l'énergie. Or dans un système biologique, le niveau d'énergie nécessaire pour générer une courbure membranaire importante ne peut pas être atteint de manière spontanée (Hurley, Boura et al. 2010). Il y a donc des mécanismes cellulaires contraignants, responsables de ces différents événements de courbure, impliqués non seulement dans la genèse de structures, comme les vésicules et les tubules, mais également dans l'attribution spécifique d'une forme et son maintien au niveau même d'un compartiment.

Il existe de nombreuses façons de générer une courbure membranaire, soit en jouant sur la composition lipidique, soit en faisant intervenir des protéines, soit en associant ces deux mécanismes, comme décrits ci-dessous.

1.1. Modification de la répartition des lipides de part et d'autre de la membrane

En 1974, Sheetz et Sanger proposent un modèle, qu'ils nomment : "bilayer-couple mechanism" (Sheetz and Singer 1974), pour expliquer le phénomène de courbure membranaire. Dans ce modèle, les deux couches lipidiques constitutives d'une bicouche fermée, peuvent répondre à une perturbation de manière différente et indépendante, tout en restant physiquement liées. Ce mécanisme permet d'expliquer comment l'apparition d'une asymétrie de part et d'autre d'une membrane peut générer un changement de forme de cette membrane. En effet une différence de surface entre les deux couches d'une membrane peut générer une courbure membranaire. Cette différence de surface peut être générée par un apport de lipide au niveau d'une seule face de la membrane.

Cependant afin de générer une asymétrie suffisante permettant une modification de la courbure membranaire, il faut un apport en lipide important mais aussi continu, afin de contrebalancer les événements de "flip-flop" tendant à rééquilibrer les couches de lipides (Frolov, Shnyrova et al. 2011). En effet, afin de générer une vésicule d'environ 50 nm de diamètre, il faudrait que la couche lipidique externe comporte plus de 50 % de lipides en plus que la couche interne (McMahon and Gallop 2005). La génération d'une courbure par

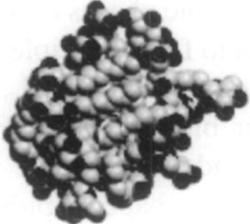
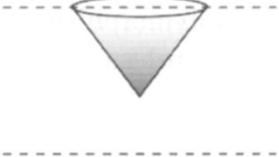
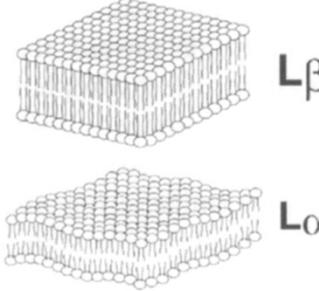
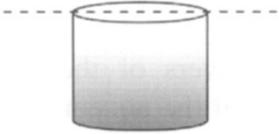
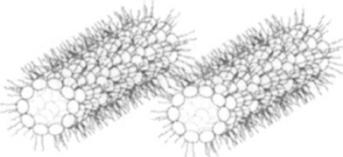
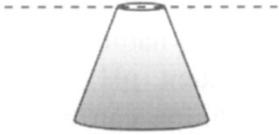
LIPIDS	PHASE	MOLECULAR SHAPE
Lysophospholipids Detergents	 Micellar	 Inverted Cone
Phosphatidylcholine Sphingomyelin Phosphatidylserine Phosphatidylinositol Phosphatidylglycerol Phosphatidic Acid Cardiolipin Digalactosyldiglyceride	 Bilayer	 Cylindrical
Phosphatidylethanolamine Cardiolipin - Ca ²⁺ Phosphatidic Acid - Ca ²⁺ Phosphatidic Acid (pH<3.0) Phosphatidylserine (pH<4.0) Monogalactosyldiglyceride	 Hexagonal (H _{II})	 Cone

Figure 18 : Impact des différentes catégories de lipides sur la courbure membranaire

Les différents types de lipides peuvent être classés en trois catégories en fonction de la structure qu'ils forment spontanément lorsqu'ils sont placés en solution. Alors que les lipides de type cylindriques affectent peu la structure membranaire, les lipides en "cône inversé" et en "cône" induisent respectivement des courbures positives et négatives.

(Dowhan et Bogdanov, 2002)

"bilayer-couple mechanism" est biologiquement envisageable mais sa réalisation nécessite cependant la mise en jeu d'une machinerie protéique associée (Farge, Ojcius et al. 1999) pour conférer l'énergie nécessaire.

1.2. Modification locale de la composition lipidique.

Les lipides membranaires sont à la fois des éléments structurants et de signalisation essentiels dans la vie cellulaire. Ils peuvent être classés en trois catégories, en fonction de l'organisation supramoléculaire de la structure qu'ils génèrent une fois en solution (Dowhan 2013) (Fig. 18).

- Les phospholipides avec de longues chaînes alkyles (au moins 14), s'organisent en bicouche. Cette structure permet un assemblage très compact des molécules ainsi qu'une exclusion maximale de l'eau par rapport aux queues hydrophobes. Cet assemblage en bicouche est rendu possible par la structure particulière de cette catégorie de lipide en "cylindre", où le diamètre de la tête et de la queue sont identiques. C'est le cas par exemple de la phosphatidylcholine (PC), de la phosphatidylsérine (PS), du phosphatidylinositol (PI).
- Les phospholipides avec de courtes chaînes alkyles (moins de 8), ou les lysophospholipides (ne possédant qu'une seule chaîne alkyle), ont la possibilité de former des micelles en solution. Ces lipides possèdent une configuration en "cône inversé", du fait de leur large tête comparée à leur courte queue hydrophobe, ce qui permet de former ces structures micellaires avec un fort rayon de courbure.
- Enfin les lipides ayant une structure en "cône" sont les lipides possédant une tête dont le diamètre est plus petit que celui de leur partie hydrophobe. Ces lipides, comme la phosphatidyléthanolamine (PE), l'acide phosphatidique (PA), ou la cardiolipine, ne peuvent pas former de feuillettes ou de micelles en solution, et vont donc s'assembler en une structure ressemblant à une micelle inversée, où les résidus hydrophiles forment le

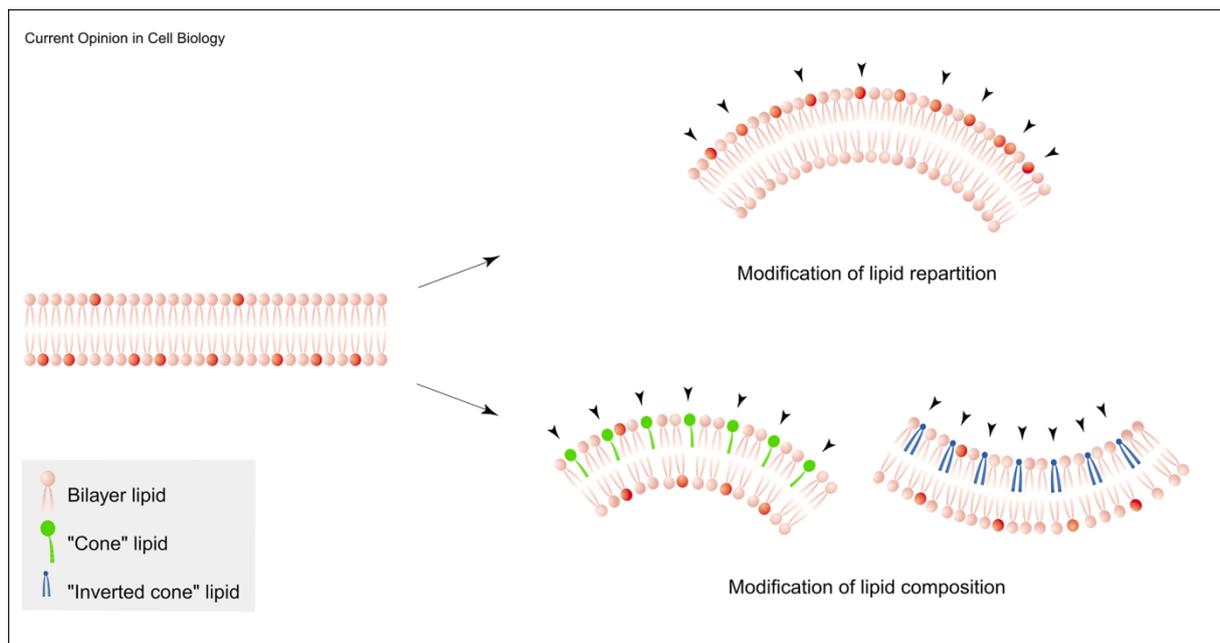


Figure 19 : Impact des lipides sur la courbure membranaire

Schéma représentant deux types de modifications de l'arrangement des lipides au sein d'une membrane, pouvant induire sa courbure. La répartition inégale des lipides entre les deux feuillets entraîne une courbure de la membrane. Une modification de la composition lipidique de l'un des deux feuillets peut également induire une courbure positive ou négative en fonction du type de lipide impliqué.

Adapté de : Farsad et Camilli, 2003

cœur de la structure alors que les domaines hydrophobes sont exposés vers l'extérieur et vont s'associer entre eux (phase hexagonale HII).

Une fois associées au sein d'une membrane, ces différentes catégories de lipides vont influencer sur la structure de la membrane et plus précisément sur sa courbure. Alors que les lipides de type "cylindre" n'ont aucun impact sur la courbure membranaire, les lipides de type "cône" ou "cône inversé" vont pouvoir induire une courbure en fonction de la couche lipidique dans laquelle ils se trouvent : dans une monocouche lipidique, les lipides en "cône inversé" vont induire une courbure positive, alors que les lipides en "cône" vont induire une courbure négative (Meer and Sprong 2004) (Fig. 19).

Il est donc possible de provoquer une modification de la courbure membranaire en modifiant la composition lipidique d'une membrane, cependant il faut pour cela une très forte concentration d'un certain type de lipide sur une seule face de la bicouche lipidique. Ces phénomènes sont rendus possibles grâce à différents mécanismes (Pomorski, Hrafnadóttir et al. 2001), comme l'action de la Phospholipase A2 qui peut transformer un phospholipide (cylindrique) en lysophospholipide (conique inversé) et ainsi générer une courbure positive spontanée de la bicouche lipidique dans laquelle il se trouve (Zimmerberg and Kozlov 2006).

Malgré l'impact de la composition lipidique sur la structure membranaire, la majorité des phénomènes qui permettent de générer une modification localisée de la courbure membranaire *in vivo* sont d'origine protéique.

1.3. Action des protéines intrinsèques

L'insertion d'un domaine protéique dans la bicouche lipidique peut provoquer une courbure localisée dans une membrane (Shen, Pirruccello et al. 2012). C'est le cas notamment des protéines possédant un domaine formant une hélice α amphipathique (Fig. 20). Ces

Figure 20 : L'insertion d'hélices amphiphiles provoque la courbure de la membrane

Dans une hélice amphiphile, les résidus polaires sont regroupés uniquement d'un côté de la structure. Cette répartition génère un face chargée et hydrophile et une face hydrophobe. Grâce à cette propriété, ces hélices ont la possibilité de s'insérer parallèlement au niveau d'une seule couche lipidique de la membrane, générant ainsi une courbure.

(McMahon et Gallop, 2005)

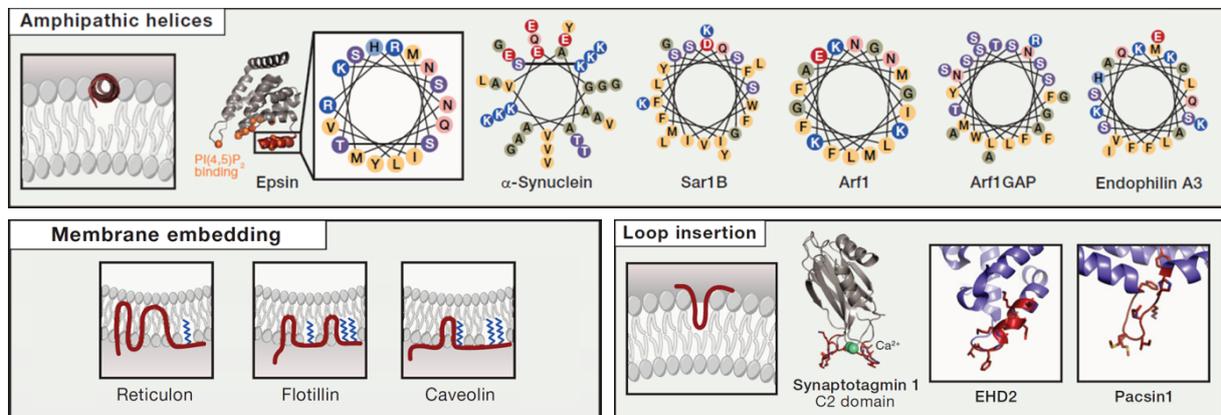
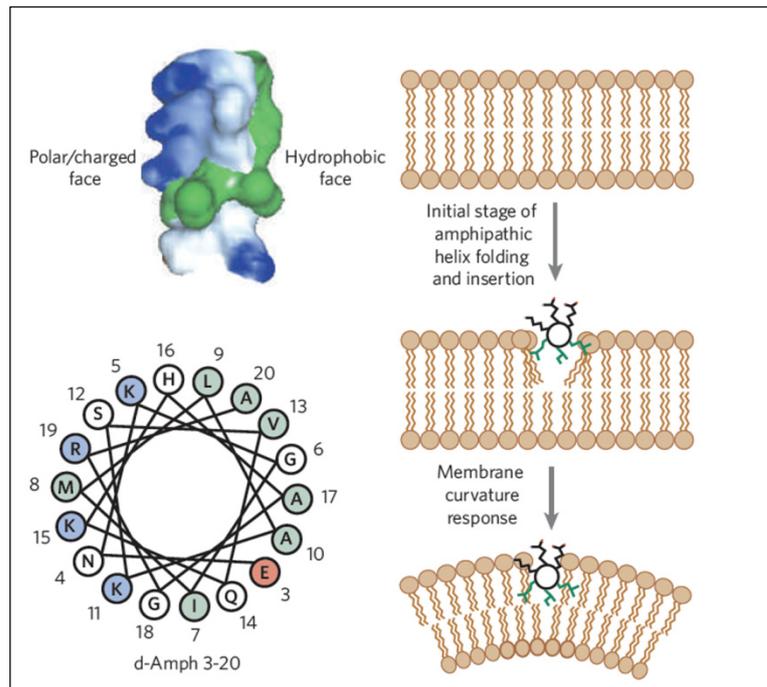


Figure 21 : Différents types d'interactions protéine-membrane induisant une courbure membranaire

L'insertion d'une hélice amphiphile, de manière parallèle à la surface membranaire induit la déformation de cette membrane. L'insertion partielle d'une structure hydrophobe en "hairpin" provoque une asymétrie membranaire, c'est le cas des Réticulons, de la Flotilline ainsi que de la Caveoline. Certaines protéines comme EHD2 et Pacsin1, possèdent de petites hélices présentant des résidus hydrophobes qu'elles insèrent dans un feuillet de la membrane provoquant sa courbure.

Adapté de : Shen et al., 2012

hélices amphipathiques ont donc la possibilité de s'insérer partiellement dans les membranes en enfouissant leur région hydrophobe dans une seule couche lipidique (McMahon and Gallop 2005). Lorsqu'une protéine insère une hélice α dans une membrane, cela provoque le déplacement des lipides présents dans la couche concernée. Comme nous l'avons vu précédemment, via le "bilayer-couple mechanism", cette asymétrie entre les deux couches lipidiques de la bicouche permet de générer une courbure.

De nombreuses protéines ayant une hélice α amphipathique et induisant une courbure membranaire ont été identifiées et sont souvent impliquées dans des événements précoces de formation de compartiments. Par exemple, l'epsine est essentielle dans la formation des vésicules à manteau de clathrine car c'est elle qui permet de générer la courbure initiale membranaire nécessaire pour la formation de ces vésicules. L'epsine est tout d'abord recrutée au niveau de domaines membranaires riches en PtdIns(4,5)P₂, (grâce à son domaine ENTH), puis induit la courbure positive de la membrane par insertion de son hélice α dans la membrane, ce qui permettra le recrutement des autres acteurs de la machinerie, dont la clathrine, nécessaire pour finaliser la formation de la vésicule (Ford, Mills et al. 2002). D'autres protéines impliquées dans la genèse de compartiments fonctionnent de la même manière, c'est le cas notamment des petites GTPases Sar1 et Arf1, respectivement impliquées dans les étapes précoces de la formation des vésicules COPII et COPI.

Un autre exemple de protéines influant sur la courbure membranaire sont les réticulons. Les réticulons sont des protéines présentes au niveau de la membrane du réticulum et qui ont la propriété de modifier la forme de ce compartiment en induisant la formation de structures tubulaires. Les réticulons possèdent deux domaines particulièrement hydrophobes qui s'organisent en "hairpin" (épingles à cheveux) et s'insèrent partiellement dans la membrane (Voeltz, Prinz et al. 2006) (Fig. 21). Ces domaines vont, tout comme les hélices α amphipathiques, permettre de générer une courbure positive grâce à l'asymétrie générée entre les deux couches de la bicouche lipidique (Zurek, Sparks et al. 2011).

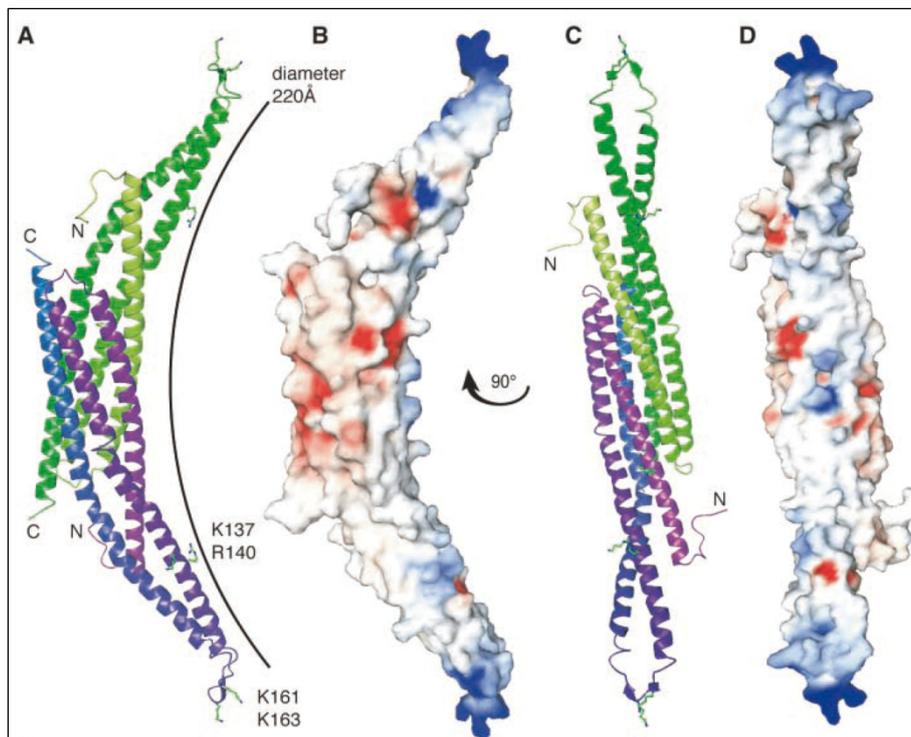


Figure 22 : Structure du domaine BAR de l'amphiphysine de *Drosophile*

Représentation en ruban de la structure en homodimère du domaine BAR (A, C). Représentation du potentiel électrostatique des différents résidus (rouge, -10 kTe^{-1} , bleu, $+10 \text{ kTe}^{-1}$) (B, D).

(Peter et al., 2004)

1.4. Action des protéines d'armature ("scaffold mechanism")

Certaines protéines cytosoliques ont la possibilité de s'oligomériser et de former un maillage, rigide et courbe. Lorsque que ces protéines ont également la capacité d'interagir avec des membranes, elles vont pouvoir s'organiser autour de celle-ci, former une armature et ainsi induire une déformation ("scaffold mechanism"). Afin que ces protéines puissent jouer le rôle d'armature et provoquer des modifications de forme de la membrane, il faut qu'elles satisfassent plusieurs critères (Zimmerberg and Kozlov 2006) :

- Ces protéines (ou ce réseau de protéines) doivent présenter une forme intrinsèque courbe permettant une interaction avec la surface de la membrane.
- Ces protéines (ou ce réseau de protéines) doivent avoir une rigidité intrinsèque leur permettant de contrebalancer la tendance de la membrane à vouloir retrouver son état de courbure original.
- Ces protéines (ou ce réseau de protéines) doivent présenter une forte affinité avec les têtes polaires de la bicouche lipidique pour pouvoir contraindre la membrane à adopter la forme intrinsèque de la protéine (ou du réseau).

Il existe de nombreuses protéines ou complexes protéiques capables de provoquer la courbure d'une membrane par "scaffold mechanism", notamment la plupart des protéines à domaine BAR et les protéines de manteau déjà citées.

1.5. Les protéines à domaine BAR

Bin1, Amphiphysine, et Rvs167, sont les trois premiers membres de cette famille de protéines à avoir été identifiés, dont on retrouve les initiales le nom du domaine "BAR". Des études de cristallographie aux rayons X sur le domaine BAR de l'amphiphysine ont permis de déterminer que ce domaine agit sous forme de dimère. Chaque monomère est composé d'un enroulement en spirale de trois hélices α , s'associant pour former une structure compacte de 6 hélices α en forme de "banane" (Peter, Kent et al. 2004) (Fig. 22). Les protéines à domaine BAR, satisfont donc le premier critère des protéines d'armatures, de par leur forme intrinsèque

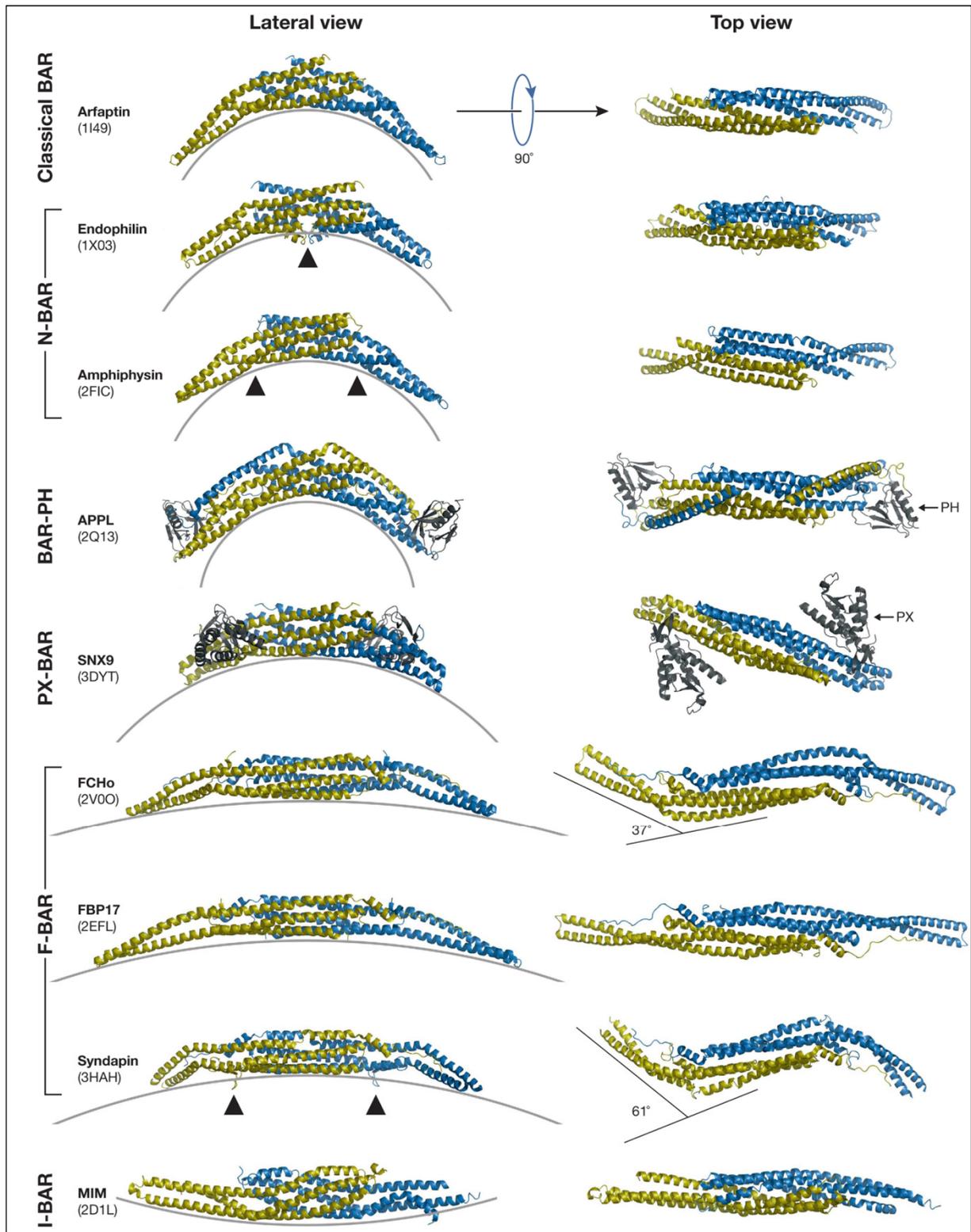


Figure 23 : Différents types de domaines BAR et leur différents degrés de courbure

Les domaines BAR, N-BAR et PX-BAR, favorisent une courbure importante alors que les PH-BAR et les F-BAR interagissent avec de faibles courbures. Les domaines I-BAR ont la particularité d'interagir avec des courbures négatives. Les flèches indiquent les insertions de structure hydrophobes dans la membrane.

(Qualmann et al., 2011)

courbe. De plus, il est intéressant de noter que l'on trouve une diversité de courbure intrinsèque de cette structure au sein des différentes sous-familles, en fonction de l'angle d'association des monomères. Alors que les familles BAR, N-BAR, BAR-PH et PX-BAR possèdent une courbure intrinsèque forte ($\approx 30^\circ$), la famille F-BAR possède une faible courbure intrinsèque ($\approx 10^\circ$). Il existe également une famille de protéines à domaine BAR possédant une courbure inverse : les I-BAR (Zhao, Pykäläinen et al. 2011) (Fig. 23).

Les protéines à domaines BAR ont également la capacité de se lier aux membranes. Cette association se fait tout d'abord par une interaction électrostatique entre le domaine concave (excepté pour les I-BARs) et les phospholipides. En effet grâce à la présence de nombreux résidus chargés positivement, ce domaine va pouvoir interagir avec les lipides chargés négativement et présents dans la membrane, comme les phosphoinositides et la phosphatidylsérine (Qualmann, Koch et al. 2011). De plus cette interaction avec les lipides peut être renforcée par présence de domaines PH et PX présents aux extrémités de la zone d'interaction électrostatique dans certaines familles (BAR-PH et PX-BAR). Ces domaines PH et PX permettent de lier avec une forte affinité différents phosphoinositides comme le PtdIns(4,5)P₂ et le PtdIns(3)P, ce qui permet de renforcer les interactions avec la membrane tout en ayant une sélectivité pour certaines compositions lipidiques (Peter, Kent et al. 2004).

Enfin afin de pouvoir provoquer une déformation de la membrane, il faut que l'énergie libérée lors de l'interaction électrostatique entre le domaine BAR et la membrane soit suffisante pour générer la courbure. Certains modèles suggèrent que l'interaction avec la membrane serait suffisante pour générer une courbure, mais que ce processus serait également fortement dépendant des propriétés de la membrane (Zimmerberg and McLaughlin 2004). Les différentes familles de protéines à domaine BAR, n'ont pas toutes la même capacité à générer une courbure membranaire (Suetsugu 2010). La famille des N-BAR est en effet particulièrement efficace pour générer une courbure membranaire. Cette aptitude résulte du fait que les différents membres de la famille N-BAR possèdent en plus du domaine BAR une ou plusieurs hélices α amphipathiques, qui vont pouvoir pénétrer dans la membrane et faciliter le mécanisme de courbure. Concernant les autres familles, il subsiste quelques doutes quant à leur capacité à pouvoir modifier de manière significative la forme des membranes, mais leur capacité à pouvoir s'inter-associer et former de plus importants complexes, leur permettrait probablement d'assurer cette fonction (Qualmann, Koch et al. 2011).

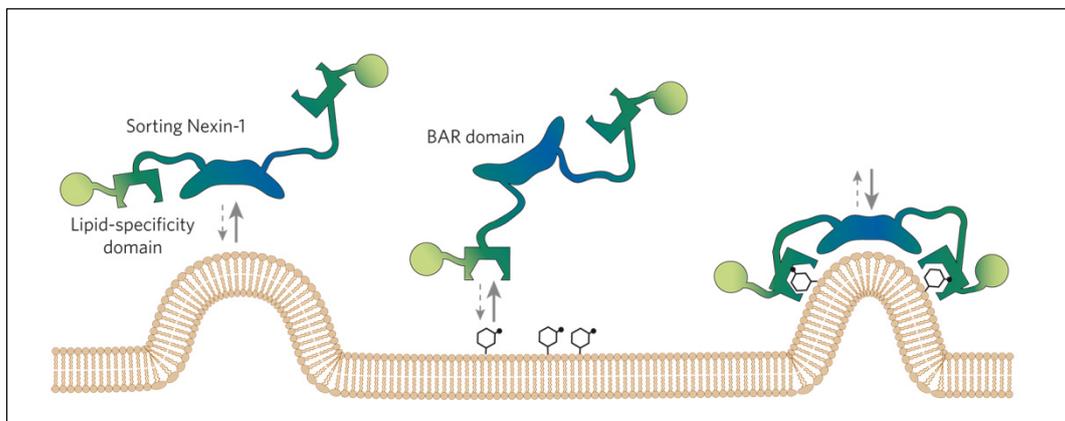


Figure 24 : Coopération des différents modes d'interaction avec la membrane

Schéma représentant le cas de SNX1, qui possède un domaine BAR qui reconnaît la courbure membranaire ainsi que deux domaines PX permettant l'interaction avec les phosphatidylinositol phosphate membranaires. Pour SNX1, l'action de ces deux modes de liaison à la membrane sont nécessaires pour le recrutement de cette protéine et pour la stabilisation de la courbure membranaire. Les hexagones représentent les phosphatidylinositol phosphates.

(McMahon et Gallop., 2005)

Les protéines BAR qui n'ont pas vocation à imposer une courbure membranaire restent cependant des acteurs essentiels dans le modelage ou l'étiquetage de territoires membranaires. En effet, ces protéines ont la capacité de se lier aux membranes et, du fait de leur forme intrinsèque courbe, cette liaison sera plus efficace pour des membranes ayant une courbure similaire à celle du domaine BAR. Tout en étant incapables de modifier la courbure membranaire, ces protéines deviennent alors des senseurs de courbure (Peter, Kent et al. 2004) (Antonny 2011). De plus, de par la diversité de courbure des différents domaines BAR, ces protéines vont être capables de reconnaître différentes courbures et même de pouvoir combiner la détection d'une courbure et d'une composition lipidique (grâce aux domaines PH ou PX) (Fig. 24).

Ceci explique pourquoi les protéines à domaines BAR sont très fréquemment impliquées dans des phénomènes de formation de vésicules ou de tubules, que ce soit en générant une courbure, en la stabilisant ou en la détectant, permettant ensuite le recrutement de différentes protéines et machineries associées.

1.6. Les protéines de manteau :

La présence de protéines de manteau (COPI, COPII, Clathrine,) sur des microdomaines membranaires en bourgeonnement a conduit à considérer les protéines de manteau comme des acteurs importants de la courbure membranaire. Les études menées *in vitro* sur la clathrine démontrant la capacité d'autoassemblages de la protéine en une cage sphérique ont renforcé cette hypothèse (Faini, Beck et al. 2013).

Cependant de récentes études basées essentiellement sur des modèles thermodynamiques (Nossal 2001), ont mis en évidence que la clathrine ne serait pas suffisante pour provoquer la courbure membranaire, nécessaire à la formation des vésicules à manteau de clathrine (CCV). En effet afin de provoquer une déformation de la membrane, il faut que le complexe protéique possède une rigidité suffisante. Or le réseau de clathrine possède une rigidité faible, similaire à celle de la membrane (Jin and Nossal 2000). De plus la clathrine ne se lie pas directement à la membrane, mais à des protéines adaptateurs (AP-2, epsine). Cette liaison indirecte va introduire un niveau supérieur de flexibilité à la structure, ce qui va

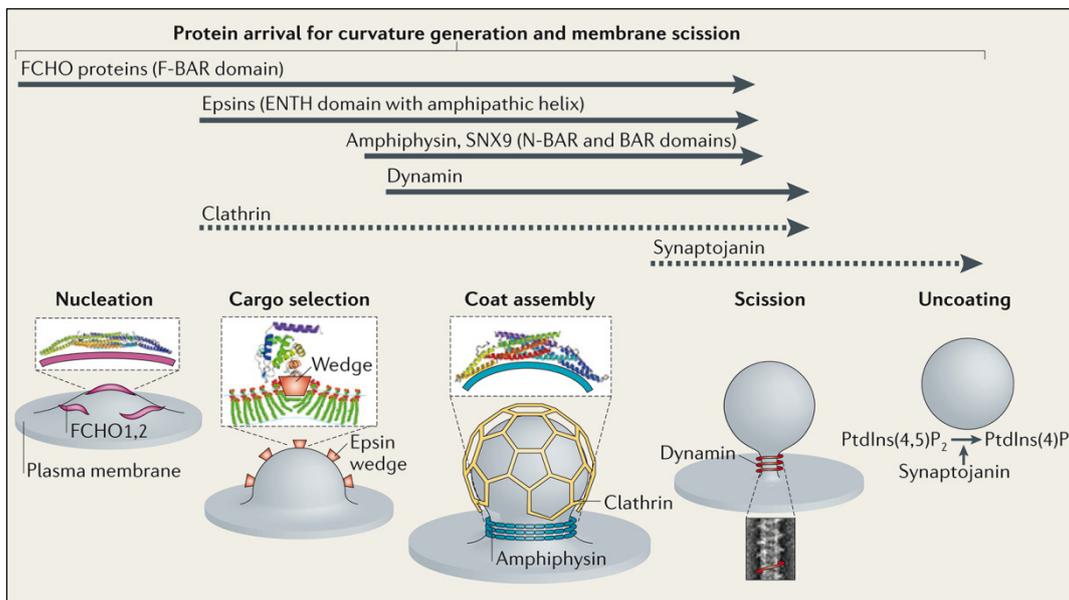


Figure 25 : Formation d'une vésicule à manteau de clathrine

De nombreuses protéines, influant sur la courbure membranaire, sont nécessaires lors de la formation de vésicules à manteau de clathrine. Le recrutement successif de ces différents acteurs va permettre de générer, à partir d'une membrane plane, une vésicule présentant des courbures importantes.

(McMahon et Boucrot, 2011)

fortement pénaliser la transmission de la force de courbure générée par le maillage de clathrine. Tous ces éléments montrent que, seule, la clathrine ne suffit pas à générer une courbure. Cependant, comme nous l'avons vu précédemment à travers l'exemple de l'epsine, de nombreux composants de la machinerie associée aux CCVs possèdent une capacité intrinsèque à courber les membranes : que ce soit grâce à un domaine BAR (FCHO, Amphiphysine, SNX9) ou grâce à des hélices α amphipathiques (epsine) (McMahon and Boucrot 2011) (Fig. 25). Ainsi lors de la formation de CCVs, la courbure est générée grâce à ces protéines puis la clathrine est recrutée et forme le manteau, ce qui permet de stabiliser considérablement la courbure, de contrôler la forme et la taille de la vésicule et de poursuivre le processus de formation jusqu'à son terme (Zimmerberg and Kozlov 2006).

Cela montre que bien que, si la clathrine ne provoque pas directement de courbure membranaire, elle joue cependant un rôle important dans la genèse de ces compartiments et dans l'acquisition de leur forme. Pour ce qui est des protéines impliquées dans la structure des autres vésicules mantelées, nous disposons actuellement de trop peu d'éléments pour déterminer leur implication directe dans la courbure membranaire. Cependant le fait que beaucoup d'adaptateurs présents dans ces différents complexes aient la capacité de générer la courbure des membranes (Sar1 pour les vésicules COP-II, Arf1 pour les vésicules COP-I, la cavéoline pour les cavéoles...), laisse penser que, comme dans le cas des CCVs, les protéines de manteau jouent majoritairement un rôle stabilisateur et structural.

1.7. Scission et Fusion

La dernière étape permettant la formation d'une vésicule à partir d'un compartiment donneur, est la scission. Lors de cette étape, la vésicule va, grâce à une rupture du continuum membranaire, se détacher du compartiment dont elle est originaire. Cette étape met en œuvre des mécanismes permettant de séparer les deux protagonistes, sans qu'à aucun moment, la continuité membranaire de l'un ou de l'autre compartiment ne soit altérée.

Le mécanisme permettant la scission se déroule en deux étapes : la formation d'une structure tubulaire très resserrée (appelée le "cou" de la vésicule), puis la fusion des deux parois du cou par un mécanisme de type hémifusion (Campelo and Malhotra 2012) (Fig. 26).

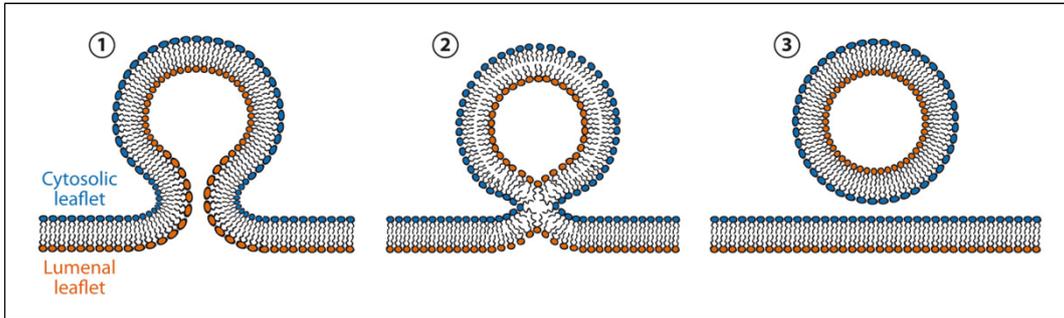


Figure 26 : Mécanisme de scission membranaire

Représentation schématique des différentes étapes impliquées dans le mécanisme de scission d'une bicouche lipidique. Le rapprochement des membranes au niveau du cou de la vésicule permet le passage par un stade intermédiaire d'hémifusion (étape 2).

(Campelo et Malhotra, 2012)

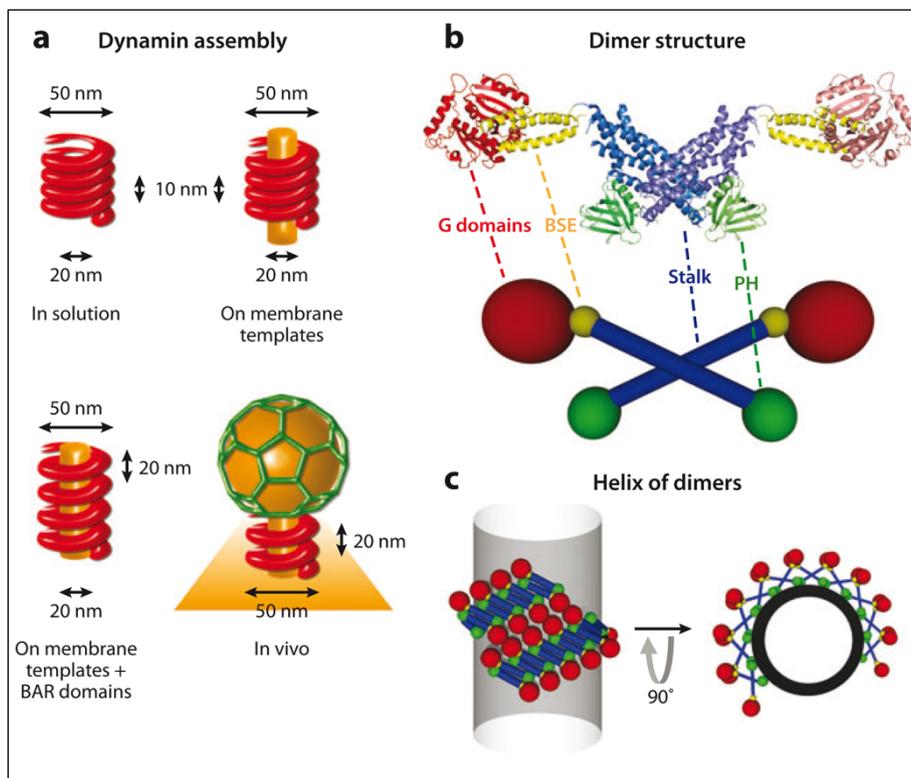


Figure 27 : Assemblage de la dynamine

La dynamine a la capacité de s'organiser en hélice *in-vitro*, et entourant le cou des vésicules *in-vivo* (a). Structure du dimère de dynamine (b). Organisation des dimères afin de former une spirale autour du cou de la vésicule (c).

(Morlot et Roux, 2013)

La réaction d'hémifusion permet de fusionner les deux couches lipidiques proximales, sans que les couches distales ne soient en contact. Cette réaction est fortement favorisée par la courbure des membranes ainsi que par leur composition lipidique (Chernomordik and Kozlov 2003). En effet ces deux phénomènes, intimement liés, vont permettre de générer une désorganisation au niveau des lipides de la couche proximale, qui favorise l'hémifusion (Chernomordik, Chanturiya et al. 1995). Enfin une fois que ce stade d'hémifusion est atteint, la fusion totale des deux membranes se réalise de manière spontanée (Kozlovsky and Kozlov 2003).

Les étapes précises et les mécanismes moléculaires permettant la scission sont encore mal compris. Cependant l'étude de protéines impliquées dans ce processus, comme la dynamine, a permis de proposer de nombreux modèles.

La dynamine est une GTPase, qui a depuis longtemps été pressentie comme étant impliquée dans les phénomènes de scission permettant la formation de vésicules. Ce pressentiment venait du fait que la dynamine a la particularité de pouvoir s'oligomériser, et former une structure hélicoïdale que l'on retrouve au niveau du "cou" des vésicules en formation (Fig. 27). De plus en présence de GTP, cette structure en hélice change de conformation et a la possibilité de produire une constriction du "cou" de la vésicule (Takei, McPherson* et al. 1995) (Lenz, Morlot et al. 2009). Cette constriction, suite à l'hydrolyse du GTP, est suffisante pour induire la formation de vésicules, *in vitro* (Sweitzer and Hinshaw 1998). Le rôle exact de la dynamine est toujours sujet à débat (Morlot and Roux 2013) : certains pensent que son action mécanique permet la scission par un mécanisme de constriction, d'autres par un mécanisme de torsion, ou d'extension (Fig. 28).

En plus de son action mécanique, la dynamine pourrait également jouer un rôle sur la modification de la composition lipidique de la membrane qui compose le "cou" des vésicules. En effet, le recrutement de la dynamine au niveau des membranes est possible grâce à son domaine PH. Ce domaine, essentiel à sa fonction, lui permet de se lier de manière spécifique aux lipides et plus particulièrement les PtdInsP₂. De plus, il a été montré *in vitro* que les structures induites par la dynamine étaient enrichies en PtdIns(4,5)P₂ (Bethoney, King et al. 2009), ce qui renforce cette idée.

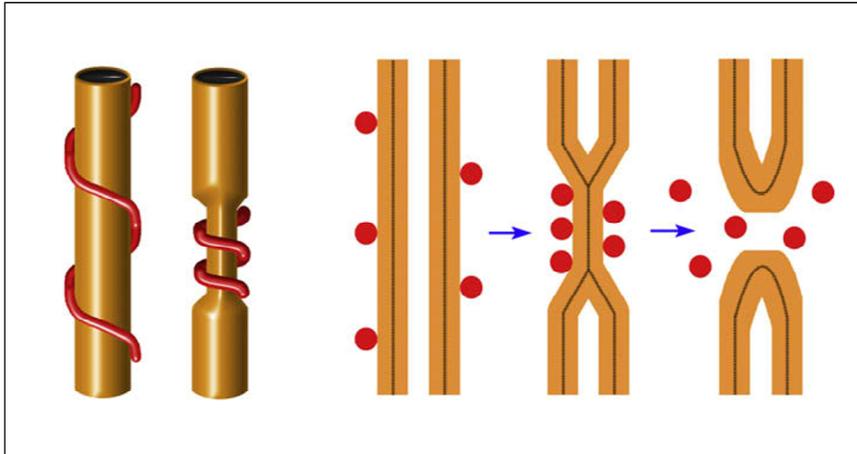


Figure 28 : Scission membranaire par action de la dynamine

Le changement de conformation de l'hélice de dynamine provoque la constriction du cou de la vésicule. Cette étape permet l'hémifusion, puis le désassemblage de la dynamine provoque un relâchement de la membrane, entraînant la scission et la libération de la vésicule.

(Lenz et al., 2009)

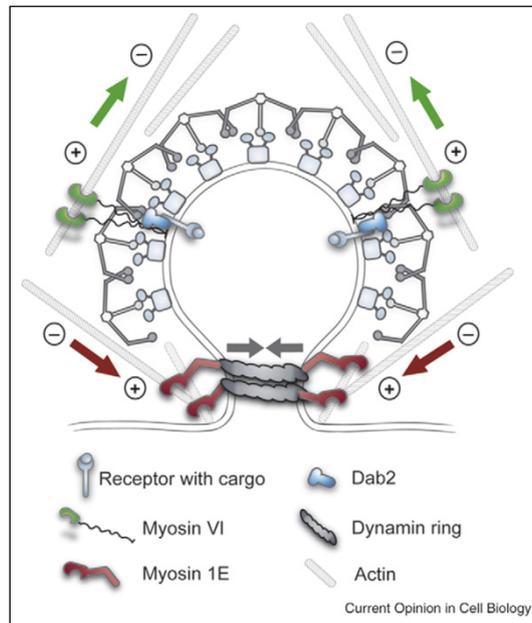


Figure 29 : Modèle spéculatif du rôle de l'actine lors de la scission

Représentation des forces apportées par les moteurs moléculaires liés à l'actine. Les myosines 1E et VI, exercent des tensions vers des directions opposées favorisant probablement la scission.

(Ungewickell et al., 2007)

Longtemps considérée comme étant une protéine permettant la scission de vésicules à manteau de clathrine, il semblerait aujourd'hui que, seule, la dynamine ne soit pas capable de provoquer cette action (Roux and Antony 2008). Cela suggère que d'autres acteurs sont également requis afin de permettre le déroulement de ce processus *in vivo*.

Parmi les protéines interagissant avec la dynamine, on retrouve d'ailleurs, des protéines à domaine BAR. Ces protéines comme SNX9, l'amphiphysine et l'endophiline, ont la capacité d'interagir avec la dynamine grâce à leur domaine SH3 (Ramachandran 2011). Comme nous l'avons vu précédemment, ces protéines sont impliquées dans l'induction et la stabilisation de la courbure membranaire, et leur recrutement va probablement augmenter l'efficacité de la réaction de scission.

Enfin, il existe de nombreuses pistes qui laissent penser que le réseau d'actine joue un rôle majeur dans la scission de vésicule (Ungewickell and Hinrichsen 2007). En effet de nombreux travaux ont permis de mettre en évidence des connections entre le réseau d'actine et la clathrine, la dynamine, ou le PtdInsP₂ (Spudich, Chibalina et al. 2007) (Krendel, Osterweil et al. 2007) (Fig. 29). Toutes ces connections montrent que l'actine semble impliquée dans ce processus, permettant de générer une tension membranaire suffisante pour accomplir la scission.

Bien que partiellement compris, le mécanisme de scission qui permet la formation de nombreuses vésicules au sein de la cellule, s'avère complexe. Les nombreuses études menées montrent que de multiples acteurs coopèrent afin de produire la courbure, la constriction et la tension nécessaire afin de permettre la scission.

2. Générer un compartiment par courbure négative

Bien que dans la cellule, la grande majorité des compartiments formés par un mécanisme nécessitant la genèse d'une courbure se déroulent vers le cytoplasme, il existe cependant certains cas où le processus de formation nécessite la formation de courbures négatives, c'est notamment le cas lors de la formation des corps multivésiculaires.

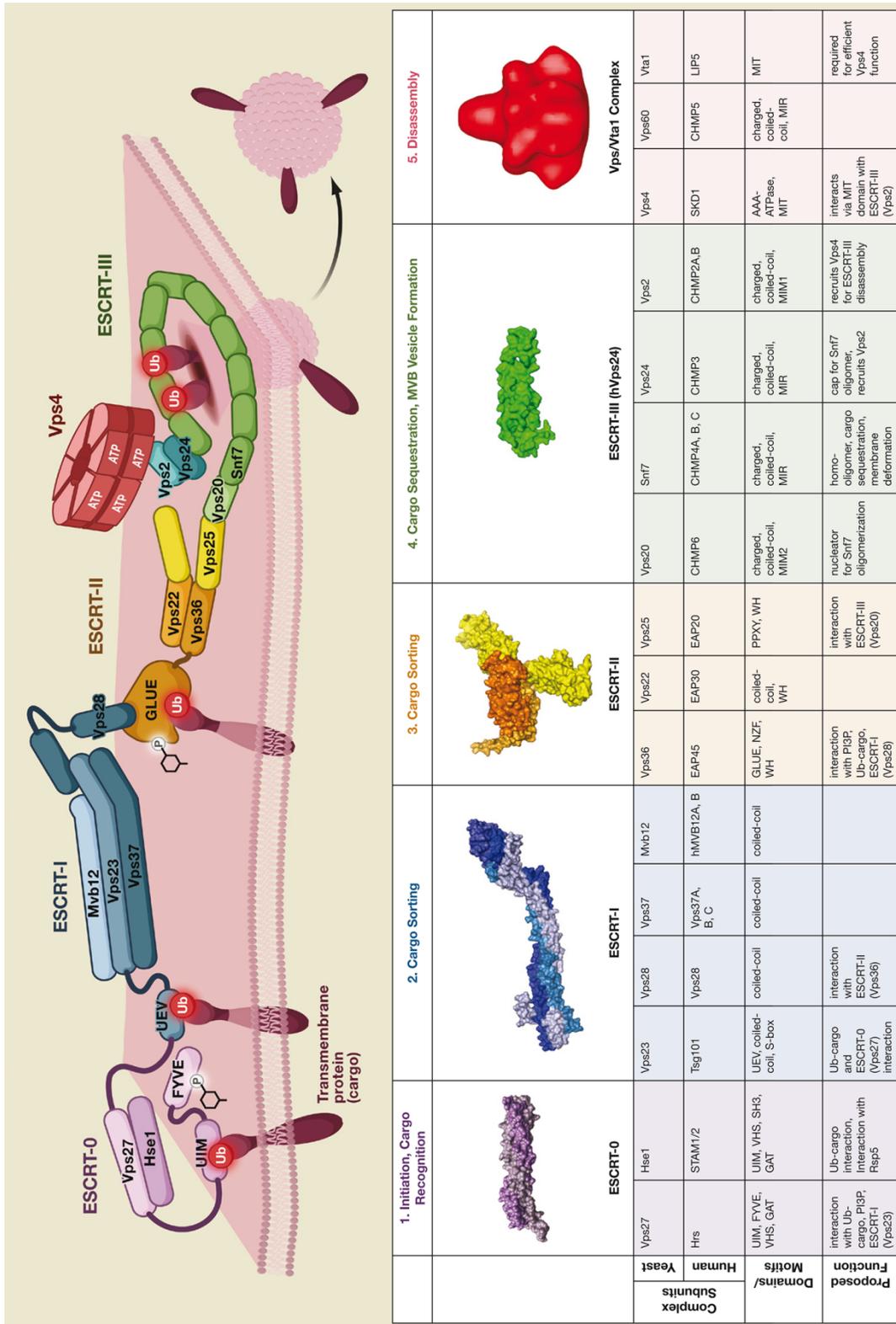


Figure 30 : La machinerie ESCRT

Schéma représentant les différents complexes de la machinerie ESCRT.
(Teis et al., 2009)

La machinerie ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) est un bel exemple de système spécialisé dans la genèse de compartiments. De plus, ce qui rend la machinerie ESCRT particulièrement intéressante, c'est que, bien que les différents acteurs qui la composent soient cytosoliques, elle permet cependant la formation de vésicules dans le sens opposé au cytoplasme. La machinerie ESCRT agit principalement au niveau des corps multivésiculaires (MVB), permettant la formation de vésicules intraluminales (ILV). Grâce à différents complexes, la machinerie ESCRT est capable d'assurer les différentes étapes de la formation des ILV : la reconnaissance du cargo, la déformation de la membrane pour créer la vésicule ainsi que l'étape finale de la scission.

Les différents éléments constituant la machinerie ESCRT sont regroupés en différents complexes : ESCRT-0, I, II, III. (Henne, Buchkovich et al. 2011) (Teis, Saksena et al. 2009) (Fig. 30).

Les trois premiers complexes sont impliqués dans les étapes précoces de la formation des ILV. Une fois ce supercomplexe (ESCRT-0-I-II) assemblé au niveau de la membrane de l'endosome, grâce à ces domaines d'interaction avec le PtdIns(3)P, il va permettre de regrouper localement les différents cargos ubiquitinylés destinés à être internalisés dans le MVB (Wollert and Hurley 2010). Ceci constitue la première étape de la formation des ILV.

Ensuite afin d'internaliser ces cargos il va falloir générer une vésicule par courbure de la membrane. Des études *in vitro* ont montré que le complexe ESCRT-I, ESCRT-II était capable de générer des invaginations mais sans pouvoir former d'ILV (Wollert and Hurley 2010). Cela signifie que ce complexe permet de produire une courbure membranaire mais que les étapes de scission nécessitent l'interaction d'autres acteurs. Le mécanisme par lequel ce complexe génère une courbure membranaire n'est pour l'instant pas compris, cependant la présence de ESCRT-I et ESCRT-II uniquement au niveau du "cou" de la vésicule suggère une implication de ce complexe dans la stabilisation de cette structure particulière (Fig. 31). Le fait que l'on ne trouve pas ce complexe à l'intérieur des vésicules, laisse penser également que son action sur la courbure des membranes est drastiquement différente des précédents mécanismes de type "scaffolding" que nous avons rencontré dans le cas des CCV ou des vésicules COP.

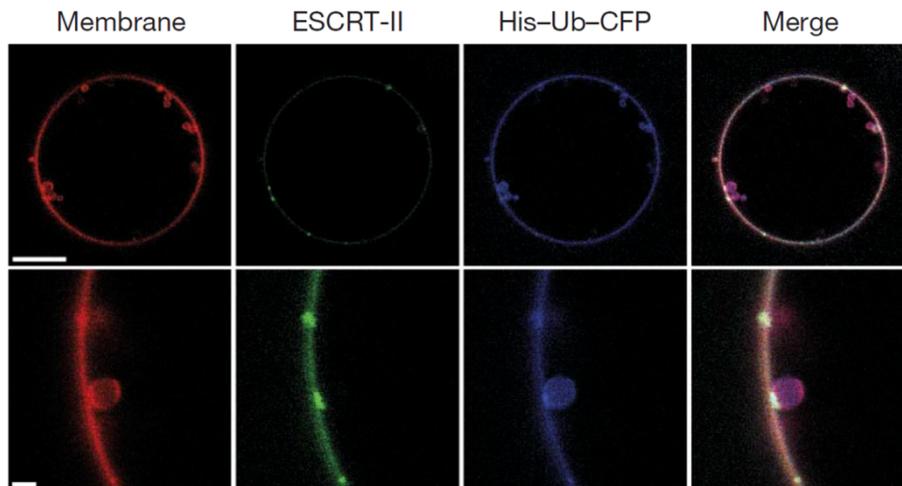


Figure 31 : La machinerie ESCRT est localisée au niveau du cou des vésicules

In-vitro, la machinerie ESCRT permet la séquestration de cargos ubiquitinés par formation de vésicules intraluminales. La machinerie ESCRT se trouve concentrée à la base de ces structures lors de leur formation. Echelle : 2 μ m.

(Wollert et Hurley, 2010)

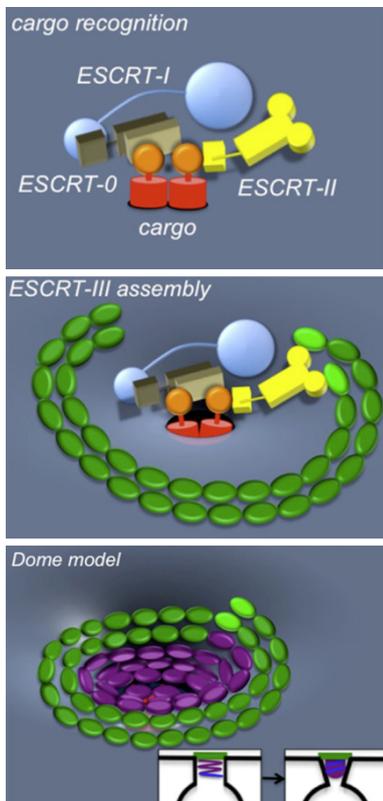


Figure 32 : Modèle d'action de la machinerie ESCRT lors de la formation d'une vésicule intraluminale

La reconnaissance du cargo ubiquitiné est effectuée par les complexes ESCRT 0, I et II. Le complexe ESCRT III s'assemble ensuite en s'accrochant à ESCRT II et forme une structure en anneau par homo-oligomérisation de Snf7 (vert). Cet anneau sert de base à la formation d'une structure protéique formant un dôme au niveau du cou de la vésicule. Ce dôme est constitué de Vps24 (violet) et de Vps2 (bleu), qui grâce à leur capacité à lier les membranes vont permettre d'induire un événement d'hémifusion au niveau du cou. Le désassemblage du complexe ESCRT provoque ensuite la scission et la formation de la vésicule.

Adapté de : Henne et al., 2011

La formation de ces invaginations est très rapidement suivie par le recrutement au niveau du "cou" de la vésicule du complexe ESCRT-III. Le recrutement de ce complexe *in vitro* est suivi de l'apparition de nombreuses ILV, indiquant que ESCRT-III est suffisant pour permettre la scission des vésicules. Ici aussi le mécanisme exact permettant la scission des vésicules fait encore débat. Le recrutement de Vps20 au niveau du "cou" déclenche l'assemblage du complexe et l'auto-assemblage de Snf7. Snf7 a la possibilité, lorsqu'il s'oligomérisse, de former des filaments qui ont tendance à s'associer et à former des structures en spirale (Hanson, Roth et al. 2008). De même, deux autres constituants du complexe ESCRT-III (Vps24 et Vps2) ont la capacité de former une structure tubulaire exposant ses domaines d'interaction avec la membrane vers l'extérieur de la structure (Lata, Schoehn et al. 2008). En intégrant ces observations, un modèle a été proposé afin d'expliquer le rôle probable du complexe ESCRT-III dans le mécanisme de scission. Le modèle propose que la spirale de Snf7, présente à la frontière du "cou", permette l'assemblage d'une structure constituée de Vps24 et Vps2, en forme de dôme à l'intérieur du "cou". Cette structure en forme de dôme, fortement liée à la membrane, permettrait une constriction du "cou" et un rapprochement des deux membranes, suffisant pour assurer une réaction de scission par hémifusion (Fabrikant, Lata et al. 2009) (Fig. 32).

La machinerie ESCRT intervient dans des processus autres que la formation des ILV au niveau des MVB. La capacité de la machinerie ESCRT à pouvoir générer des vésicules "de l'intérieur", s'est avérée être une des voies empruntée par les virus pour bourgeonner hors de la cellule. En effet un très grand nombre de virus ont été identifiés comme interagissant avec différents composants de la machinerie ESCRT pour achever leur cycle de réplication (Chen and Lamb 2008).

De même la capacité de la machinerie ESCRT à provoquer la fermeture et la scission au niveau de structures en forme de goulots, a été utilisée dans la cellule afin de faciliter les dernières étapes de la division cellulaire chez les mammifères (Carlton, Agromayor et al. 2008).

3. De la modulation de la forme à la genèse d'un compartiment

Cette analyse souligne comment une cascade d'évènements séquentiels peut se dérouler pour provoquer des déformations membranaires combinant les propriétés intrinsèques des lipides et de leurs partenaires protéiques.

Il est possible qu'une même machinerie moléculaire soit impliquée dans la genèse de compartiments différents. C'est une hypothèse notamment émise pour la machinerie ESCRT, qui, en plus de son implication dans la formation de MVBs pourrait être impliquée dans la formation de structures autophagiques (Rusten and Stenmark 2009). Il est intéressant de noter que, d'un point de vue topologique, un autophagosome pourrait être comparé à un MBV ne comportant qu'une seule vésicule intraluminale occupant tout le volume de la structure. Cette ressemblance topologique révèle également une similitude au niveau des mécanismes de formation. Le lien exact entre l'autophagie et la machinerie ESCRT n'est cependant pas encore élucidé.

Plusieurs mécanismes, pas nécessairement exclusifs, de morphogénèses peuvent se décrire dans une cellule, en partie basés sur des compartiments existants, et activés selon les besoins cellulaires :

- Formation par maturation d'un compartiment : il semble que ce soit le cas des compartiments *median* et *trans* du Golgi, et même du Trans Golgi network.
- Formation par des événements de fusion membranaire : le cis-Golgi par exemple ne peut se former que sur apport de vésicules ou tubules provenant du reticulum endoplasmique.
- Formation par "scission", ce mécanisme a été envisagé pour expliquer le doublement des empilements golgiens (la dictyogénèse) questionnant l'identité des machineries moléculaires mises en jeu.
- Formation par bourgeonnement associé à une différenciation membranaire on pense ici aux compartiments dérivés du réticulum qui renferment des compositions lipidiques spécifiques.

Parallèlement, la cellule est capable de former des compartiments *de novo* en réponse à des stimuli spécifiques. On citera par exemple dans les cellules végétales le cas des symbiosomes dont les mécanismes de formation sont encore mal compris.

Le positionnement de la formation des autophagosomes dans ce paysage de morphogénèse membranaire constitue encore un autre modèle d'intérêt dans l'étude de ces relations formes et fonctions.

Chapitre III. AUTOPHAGIE ET FORMATION DE L'AUTOPHAGOSOME

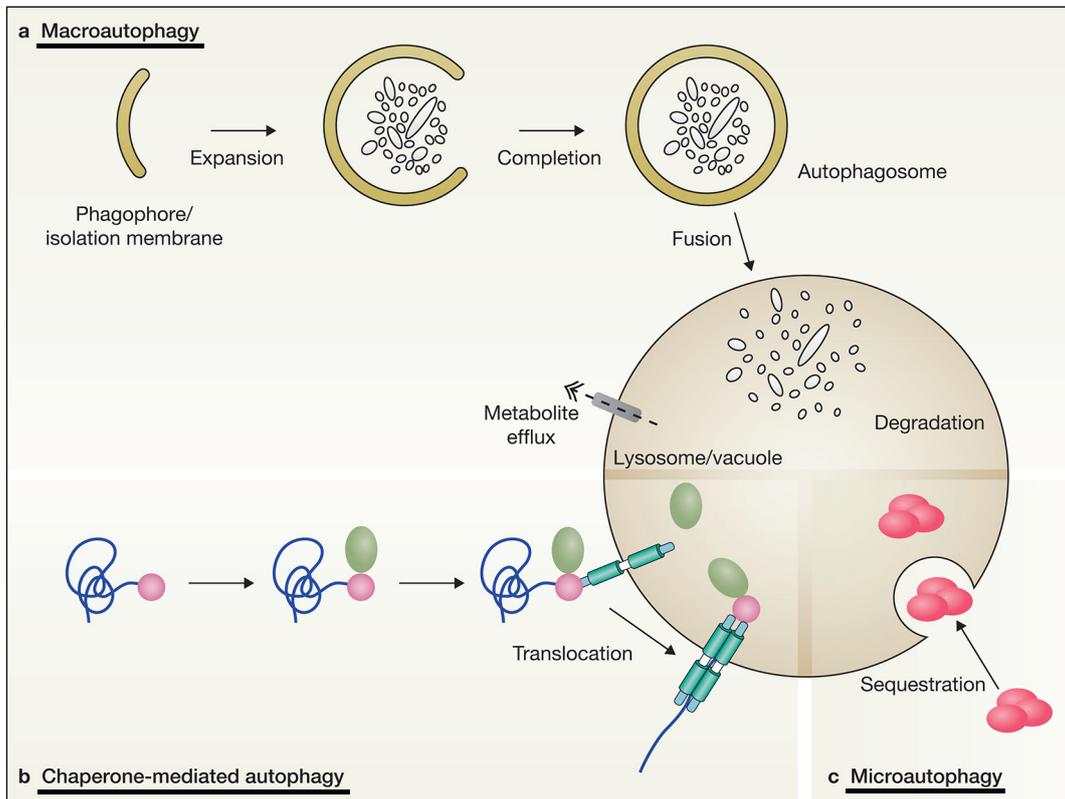


Figure 33 : Différents types d'autophagie

Il existe trois grands types d'autophagie : la macroautophagie (a), l'autophagie médiée par les chaperonnes (b), et la microphagie (c). Ces trois processus permettent la dégradation de composant cytosoliques, en provoquant leur internalisation dans le compartiment lytique.

(Boya et al., 2013)

L'autophagie a depuis longtemps été mise en évidence par des approches morphologiques, essentiellement *via* l'observation des autophagosomes en microscopie électronique en transmission (de Duve and Wattiaux 1966). Depuis, la compréhension de ce mécanisme a considérablement évolué, notamment grâce à la découverte, de la machinerie moléculaire associée à ce processus, ainsi qu'à l'identification de mutants, permettant de révéler le fonctionnement et les implications de l'autophagie dans de nombreux processus cellulaires.

1. La voie autophagique

Les cellules eucaryotes ont la capacité de pouvoir constamment s'adapter aux exigences de leur environnement, notamment grâce aux capacités morphodynamiques de leur système endomembranaire. Cela peut se traduire, comme nous l'avons vu précédemment, par la modification de la forme d'un compartiment, lui permettant de mieux moduler ses fonctions, mais également par la genèse d'un nouveau compartiment. La voie autophagique, et plus précisément les éléments qui contrôlent la formation de l'autophagosome, sont un parfait exemple de l'adaptabilité du système endomembranaire et de sa dynamique lui permettant de répondre aux différents besoins de la cellule.

L'autophagie est l'une des deux voies majeures permettant la dégradation de constituants cellulaires chez les eucaryotes. Alors que la voie ubiquitine-protéasome est majoritairement impliquée dans la dégradation de protéines solubles, la voie autophagique permet de dégrader une plus vaste famille de constituants cytosoliques incluant, des agrégats protéiques, mais également des organites entiers (Wong and Cuervo 2010). L'autophagie est un mécanisme très conservé chez les eucaryotes, que ce soit chez *Saccharomyces cerevisiae*, les mammifères ou les plantes (Devenish and Klionsky 2012) (Yoshimoto 2012).

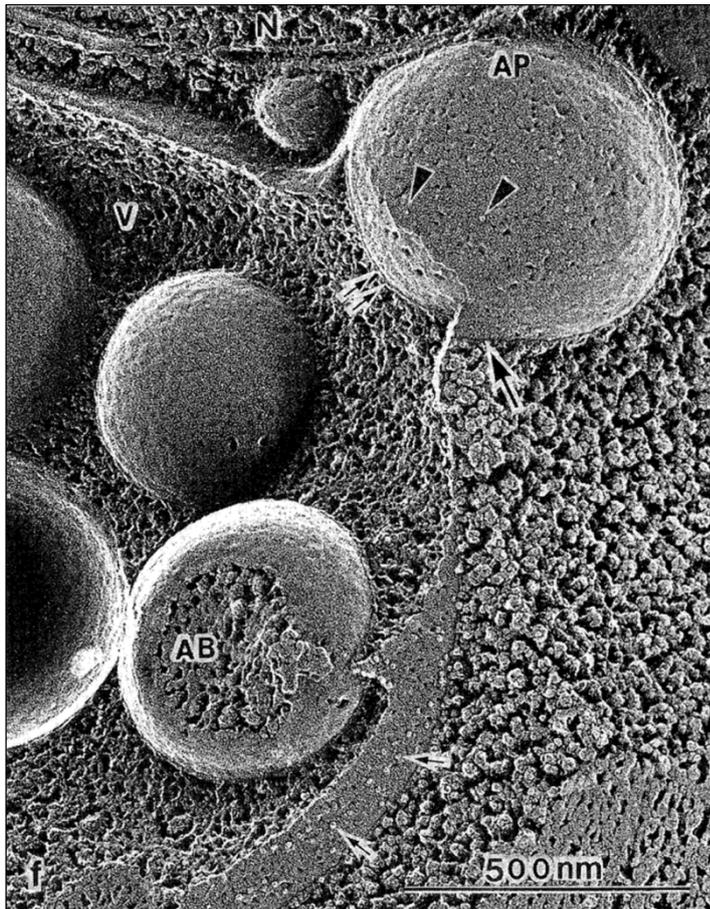


Figure 34 : Fusion d'un autophagosome avec la vacuole

Micrographie obtenue après cryofracture, chez *Saccharomyces cerevisiae*. Lors de la macroautophagie, l'autophagosome (AP), formé dans le cytoplasme, fusionne avec la vacuole (V). On observe la continuité membranaire entre la membrane externe de l'autophagosome avec la membrane de la vacuole. A l'intérieur de la vacuole sont présents de nombreux corps autophagiques (AB).
(Baba et al., 1995)

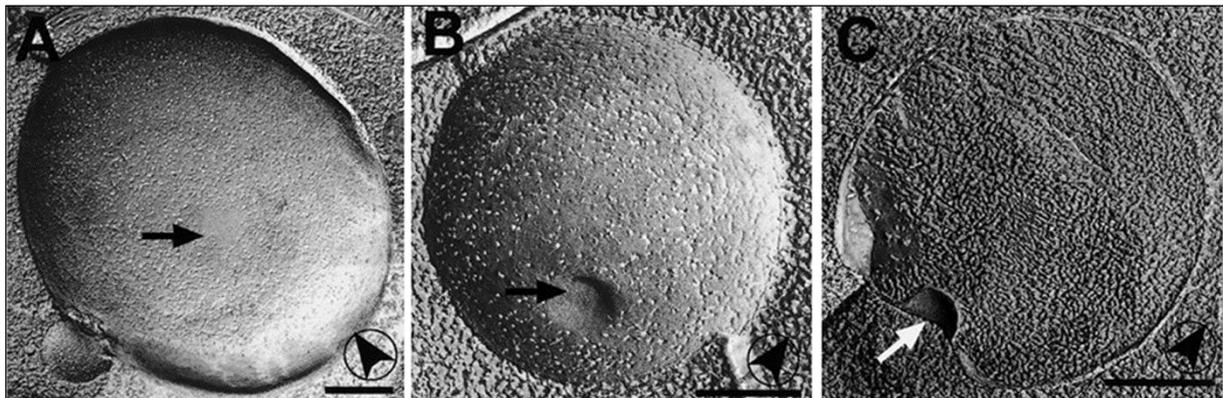


Figure 35 : Microautophagie chez la levure

Micrographie obtenue après cryofracture, sur des vacuoles isolées de *Saccharomyces cerevisiae*. (A) De nombreuses particules, correspondant à des protéines intégrales de membrane, sont présentes au niveau de la membrane de la vacuole. Cependant on observe également la formation d'un domaine dépourvu de particules. (B et C) L'invagination de la membrane de la vacuole permettant la formation de tubules autophagiques responsables de la microautophagie, se déroule au niveau de ces domaines de la membrane vacuolaire qui sont dépourvus de protéines membranaires.
(Müller et al., 2000)

1.1. Différents types d'autophagie

Le terme autophagie regroupe en réalité plusieurs mécanismes. Tous ces mécanismes ont en commun le fait de cibler des constituants cytosoliques et de les amener au compartiment lytique (vacuole ou lysosome), afin de permettre leur dégradation. On peut identifier ces différents types d'autophagie en fonction des mécanismes qu'ils emploient afin de délivrer leur cargo au compartiment lytique (Fig. 33):

1.1.1. La macroautophagie

Lors de ce processus, une citerne membranaire appelée phagophore (ou membrane d'isolement), est générée dans le cytoplasme. Grâce à un processus régulé par une machinerie dédiée, le phagophore croît puis se referme sur lui-même, formant ainsi une vésicule ceinte par deux membranes, l'autophagosome. Au cours de la formation de l'autophagosome, les constituants cellulaires se retrouvent piégés à l'intérieur puis sont dirigés vers le compartiment lytique. Enfin, grâce à la fusion de la membrane externe de l'autophagosome avec la membrane du compartiment lytique (Fig. 34), une vésicule à simple membrane contenant les éléments à dégrader, appelé corps autophagique (AB), est libérée à l'intérieur du compartiment lytique, puis dégradée (Klionsky 2005) (Li and Vierstra 2012). Cette voie est de loin la plus étudiée et on la retrouve dans la grande majorité des cellules eucaryotes.

1.1.2. La microautophagie

Au cours de ce mécanisme, le cargo est directement internalisé dans le compartiment lytique par invagination au niveau de la membrane vacuolaire (Fig. 35). Cette internalisation est rendue possible par la formation de tubules dirigés vers le lumen du compartiment, qui au moment de leur scission, permettent la séquestration des composés cytosolique et leur dégradation (Müller, Sattler et al. 2000) (Sattler and Mayer 2000). Tout comme la macroautophagie, la microautophagie est un processus présent chez de nombreux eucaryotes et qui requiert une machinerie dédiée (Li, Li et al. 2012) (Bassham, Laporte et al. 2006).

1.1.3. L'autophagie médiée par des chaperonnes

Contrairement aux deux précédentes formes d'autophagie, où la dégradation de composés cytosolique était rendue possible grâce à d'important événements de remodelage membranaire, l'autophagie médiée par des chaperonnes (CMA) est essentiellement basée sur un mécanisme protéique. Les protéines destinées à être dégradées vont être reconnues au niveau du cytoplasme par une protéine chaperonne (Hsc70), grâce à la présence d'une séquence spécifique d'acides aminés (KFERQ) (Li 2011). Cette séquence sert de signal d'adressage pour la CMA et son accessibilité traduit probablement un mauvais repliement de protéine, ou la dissociation d'une protéine de son complexe, ayant pour conséquence son adressage vers le compartiment lytique. La protéine chaperonne va par la suite être recrutée au niveau de la membrane du compartiment lytique, et par l'intermédiaire d'un complexe protéique, la protéine cible va être dépliée et transloquée à l'intérieur du compartiment lytique (Kaushik and Cuervo 2012). Ce processus n'a été identifié, au jour d'aujourd'hui, que dans les cellules de mammifères.

1.1.4. Autophagie et homéostasie vacuolaire

Ces différentes voies permettent de mettre en évidence la diversité de mécanismes, protéiques et membranaires, mis en œuvre par la cellule eucaryote, afin d'assurer la dégradation et le recyclage de ses constituants. Il est également important de noter que lors de la macroautophagie, la fusion de l'autophagosome avec la vacuole provoque un apport de membrane et une expansion de la surface membranaire vacuolaire. Au contraire, la microautophagie, *via* son mécanisme d'internalisation, provoque une dégradation progressive de la membrane vacuolaire et donc une réduction de sa surface. Il est donc fortement probable que ces deux mécanismes soient liés et que leur régulation conjointe soit essentielle pour le maintien de la taille, la forme et la fonction de la vacuole (Mijaljica, Prescott et al. 2007). Il se peut également qu'une modification de cet équilibre soit impliquée dans des phénomènes de croissance de la vacuole.

Pour la suite, par souci de simplification, nous utiliserons le terme d'autophagie pour évoquer le processus de macroautophagie, qui est l'objet de notre étude.

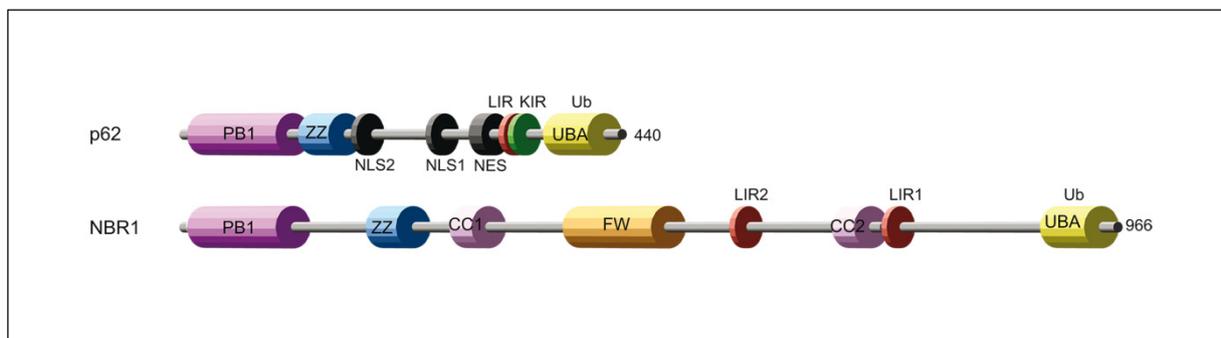


Figure 36 : Structure des protéines adaptatrices p62 et NBR1

P62 et NBR1 partagent de nombreux domaines, notamment le domaine PB1, permettant l'oligomérisation des ces protéines, le domaine LIR (*LC3 Interacting Region*) permettant de se lier à la membrane de l'autophagosome *via* Atg8 et aussi le domaine UBA (*ubiquitin-associated domain*) permettant de reconnaître les cargos ubiquitinés.

(Birgisdottir *et al.*, 2013)

1.2. Les cibles de l'autophagie

L'autophagie présente la capacité de pouvoir permettre la dégradation d'un grand nombre de composants cellulaires. Il existe cependant deux modes de séquestration du cargo par des autophagosomes : l'autophagie non sélective (en vrac) et l'autophagie sélective. Lors de l'autophagie non-sélective, de larges portions de cytosol ainsi que différents composants cellulaires sont aléatoirement piégés puis dégradés (Klionsky, Cuervo et al. 2007). Par contre, lors de l'autophagie sélective, un cargo spécifique est identifié puis séquestré au sein d'une structure autophagique, contenant peu de cytoplasme, avant d'être adressé au compartiment lytique. En quelle mesure les mécanismes de formation de l'autophagosome diffèrent dans ces formes d'autophagie, reste une question ouverte.

1.2.1. L'autophagie sélective

Afin de permettre une dégradation sélective, l'autophagie fait appel à des protéines adaptatrices, capables de reconnaître le cargo d'une part et de se lier à la membrane de la structure autophagique d'autre part.

Le premier adaptateur à avoir été identifié est p62 (également appelé sequestosome-1 ou SQSTM1) (Bjørkøy, Lamark et al. 2005). La protéine p62 possède trois domaines essentiels pour sa fonction d'adaptateur dans l'autophagie sélective : un domaine UBA, un domaine LIR et un domaine PB1 (Fig. 36).

Le domaine UBA (Ubiquitin Associated), comme son nom l'indique, permet la liaison de p62 avec des cargos ubiquitinylés. En effet, à ce jour, l'ubiquitination est considérée comme une des façons permettant d'adresser des cargos vers une voie d'autophagie sélective. L'ubiquitination (mono ou poly) d'agrégats protéiques, de peroxysomes, de mitochondries ou de bactéries, provoque la dégradation de ces cargos *via* la voie autophagique (Johansen and Lamark 2011). Cependant les mécanismes responsables de cette ubiquitination restent inconnus, on ignore notamment quel types d'ubiquitination sont ciblés et quelles ubiquitine-ligases (E3) en sont responsables.

Le domaine LIR (LC3-Interacting Region) de p62, permet grâce à un motif de type WxxL d'interagir avec LC3 (ATG8), qui est une protéine liée de manière covalente à la membrane de l'autophagosome dès sa formation. La reconnaissance de ATG8 va permettre à p62 d'être recrutée au niveau de la membrane de l'autophagosome, dès qu'elle se sera associée avec son cargo, et ainsi permet la dégradation de ce dernier par autophagie (Birgisdottir, Lamark et al. 2013). Le fait qu'il y a très peu de cytoplasme piégé dans les autophagosomes impliqués dans une voie d'autophagie sélective, suggère que la formation de l'autophagosome se fait autour du cargo. Il apparaît donc que la phase d'ancrage de l'adaptateur à la membrane de l'autophagosome pourrait influencer sur le processus de formation (Filimonenko, Isakson et al. 2010).

Enfin le domaine PB1, qui est un domaine permettant des interactions protéines-protéines, permet l'homo-polymérisation de p62. Ces agrégats de p62 forment une structure concentrant les protéines destinées à être dégradées. Cette étape d'oligomérisation est essentielle car son inhibition provoque un retard conséquent de la dégradation des substrats, montrant à quel point l'efficacité du processus autophagique dépend de cette étape d'agrégation du cargo (Ichimura, Kumanomidou et al. 2008).

Par la suite d'autres adaptateurs possibles impliqués dans l'autophagie sélective ont été mis en évidence et notamment NBR1, qui possède une structure très proche de p62 (Fig. 36), mais se différencie par la présence d'un domaine globulaire, caractérisé par quatre résidus tryptophane (le domaine FW). La fonction de ce domaine est pour l'instant peu connue : il semblerait qu'il soit impliqué dans diverses interactions, notamment avec des membranes ou le cytosquelette (Marchbank, Waters et al. 2012). D'un point de vue évolutif, les métazoaires possèdent en général au moins un homologue de p62 et parfois également NBR1 comme c'est le cas pour l'homme (Kraft, Peter et al. 2010). Cependant, la majorité des organismes non-métazoaires possèdent au moins un homologue de NBR1 mais pas d'homologue de p62. C'est le cas chez les plantes, où *Arabidopsis thaliana* possède un gène codant pour AtNBR1 (Svenning, Lamark et al. 2011). Aujourd'hui de nombreuses protéines possédant un domaine LIR ont été identifiées comme étant impliquées dans des voies d'autophagie sélective, jouant potentiellement le rôle d'adaptateurs (Birgisdottir, Lamark et al. 2013). De manière surprenante, aucun homologue de p62 ou NBR1 ni aucun adaptateur reconnaissant des protéines ubiquitinées n'a pour l'instant été identifié chez *Saccharomyces cerevisiae* (Kraft,

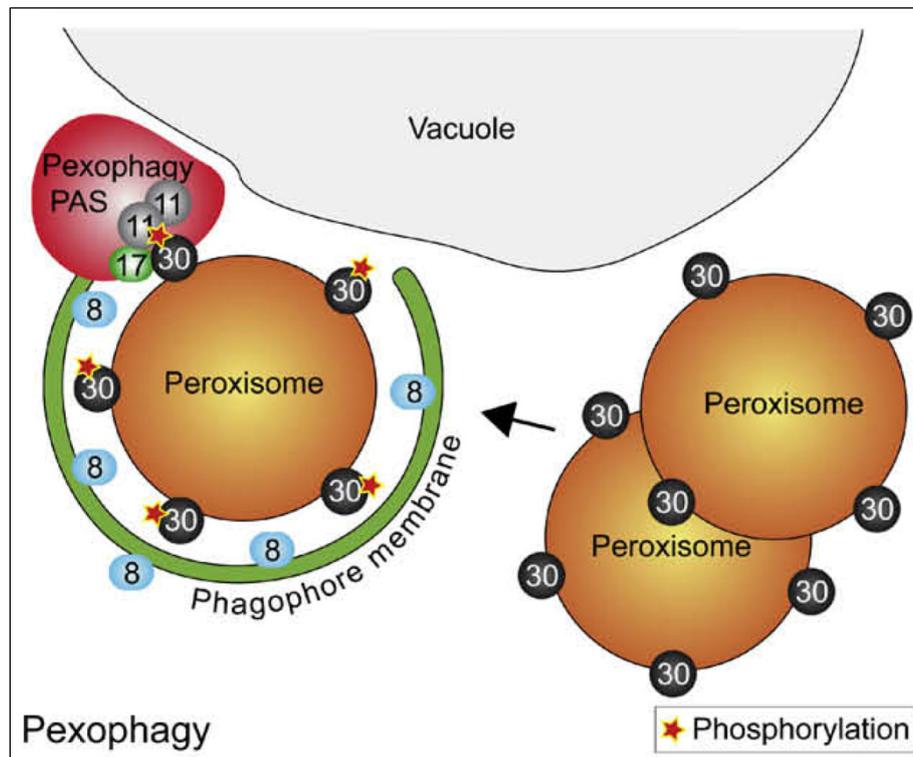


Figure 37 : La pexophagie chez *Saccharomyces cerevisiae*

Chez la levure la pexophagie fait tout d'abord intervenir la protéine Atg30 qui joue le rôle de récepteur au niveau du peroxysome. Atg30 se retrouve phosphorylée lors de la pexophagie et interagit alors avec deux protéines adaptatrices présentes au niveau du PAS : Atg11 et Atg17. Ces interactions permettent la formation de l'autophagosome autour du peroxysome ciblé, puis sa dégradation de manière spécifique.

(Manjithaya et al., 2010)

Peter et al. 2010). D'autres protéines interagissant avec Atg8, comme Atg19, Atg30 et Atg32, jouent le rôle d'adaptateur. Chez la levure, cependant, il semble que l'autophagie sélective ne soit pas dépendante de l'ubiquitine.

➤ *Pexophagie*

La pexophagie fait référence à la dégradation sélective de peroxysomes par la voie autophagique, impliquant soit la macroautophagie soit la microautophagie. Cette forme spécifique d'autophagie a été mise en évidence chez les levures, essentiellement dans des conditions d'importantes modifications métaboliques (Klionsky, Cuervo et al. 2007) (Manjithaya, Nazarko et al. 2010). En effet, la levure *Pichia pastoris* est capable d'utiliser le méthanol comme source de carbone, mais cela nécessite une importante quantité d'enzymes peroxisomales, et donc un grand nombre de peroxysomes. Lorsque l'on transfère ces cellules sur un milieu contenant du glucose, cette importante quantité de peroxysomes devient superflue, du fait des nouvelles voies métaboliques nécessaires, et l'on observe une dégradation rapide et sélective des peroxysomes par l'autophagie (Dunn and Cregg 2005). Depuis, la pexophagie a également été mise en évidence chez d'autres modèles eucaryotes et notamment chez les mammifères (Iwata, Ezaki et al. 2006) (Fig. 37).

➤ *Mitophagie*

La mitophagie correspond à la dégradation de mitochondries par autophagie sélective. Tout comme dans le cas des peroxysomes, le nombre de mitochondries présentes dans la cellule est fortement influencé par le métabolisme. En effet lors du passage d'un métabolisme de type respiratoire à un métabolisme de type fermentation, les besoins en activité enzymatique mitochondriale vont grandement diminuer et les mitochondries se retrouvent en excès. La régulation du contenu mitochondrial dans de telles conditions est fortement régulée par la dégradation sélective de mitochondries par autophagie (Kiššová, Salin et al. 2007). En plus de ce rôle permettant l'adaptation en fonction des conditions métaboliques, la mitophagie est impliquée dans le contrôle de la qualité des mitochondries (Priault, Salin et al. 2005) (Kurihara, Kanki et al. 2012). En effet les mitochondries font partie des principales sources

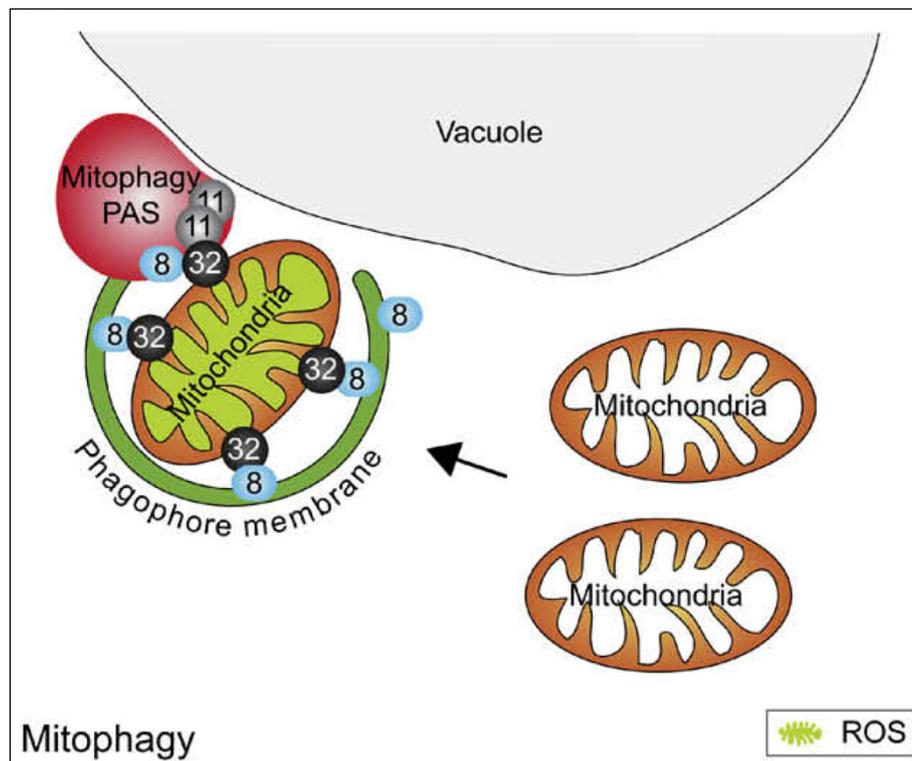


Figure 38 : La mitophagie chez *Saccharomyces cerevisiae*

Chez la levure la mitophagie permet la dégradation de mitochondries lorsqu'elles sont trop nombreuses ou endommagées, de manière sélective. Les mitochondries affectées par les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) vont être reconnues par la protéine récepteur Atg32. Cette protéine va permettre, grâce à son interaction avec Atg8 et Atg11, la formation de l'autophagosome autour de la mitochondrie endommagée ou en excès, et par la suite sa dégradation.

(Manjithaya et al., 2010)

des dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), en particulier lorsqu'elles subissent des altérations et que leur fonctionnement est perturbé. La régulation de leur nombre et de leur intégrité est donc un processus essentiel afin de limiter les impacts d'un stress oxydatif trop important pouvant causer d'importants dommages cellulaires. L'implication de la mitophagie dans ce processus en fait un mécanisme essentiel dans la survie cellulaire.

Chez *Saccharomyces cerevisiae* la séquestration des mitochondries par la voie autophagique est possible grâce à la présence d'Atg32, une protéine présente dans la membrane externe des mitochondries et qui permet, en interagissant avec Atg8, d'être recrutée au niveau de l'autophagosome (Kanki, Wang et al. 2009) (Fig. 38). La mitophagie a également été mise en évidence chez les mammifères, impliquant des protéines comme Nix (proche de Atg32 d'un point de vue structural) (Novak, Kirkin et al. 2010) ou Parkin (Narendra, Tanaka et al. 2008) qui jouent le rôle de récepteurs spécifiques permettant la détection des mitochondries ciblées par les adaptateurs comme p62.

➤ *Ribophagie*

Les ribosomes représentent une importante quantité de protéine, et d'acides nucléiques disponibles sous forme d'ARN ribosomiaux. Ces structures ayant une longue durée de vie, il est essentiel, en cas de carence, de pouvoir accéder à cette ressource de manière rapide et efficace. De plus, leur intégrité doit être finement contrôlée car le moindre dysfonctionnement au niveau d'un ribosome peut induire de graves perturbations au niveau de la traduction mais aussi plus généralement au niveau de l'homéostasie cellulaire (Lafontaine 2010). Chez la levure, il a été démontré que lors d'une carence azotée, les ribosomes sont rapidement dégradés par autophagie sélective : c'est la ribophagie (Kraft, Deplazes et al. 2008). Ce processus sélectif semble lié aux voies d'ubiquitination et de dés-ubiquitination mais ces mécanismes, de même que ceux permettant la reconnaissance de ribosomes défectueux sont aujourd'hui peu connus (Kraft, Reggiori et al. 2009). Chez les mammifères et chez les plantes, bien que certaines études semblent suggérer l'existence d'un processus similaire, la ribophagie n'a pour l'instant pas été formellement identifiée.

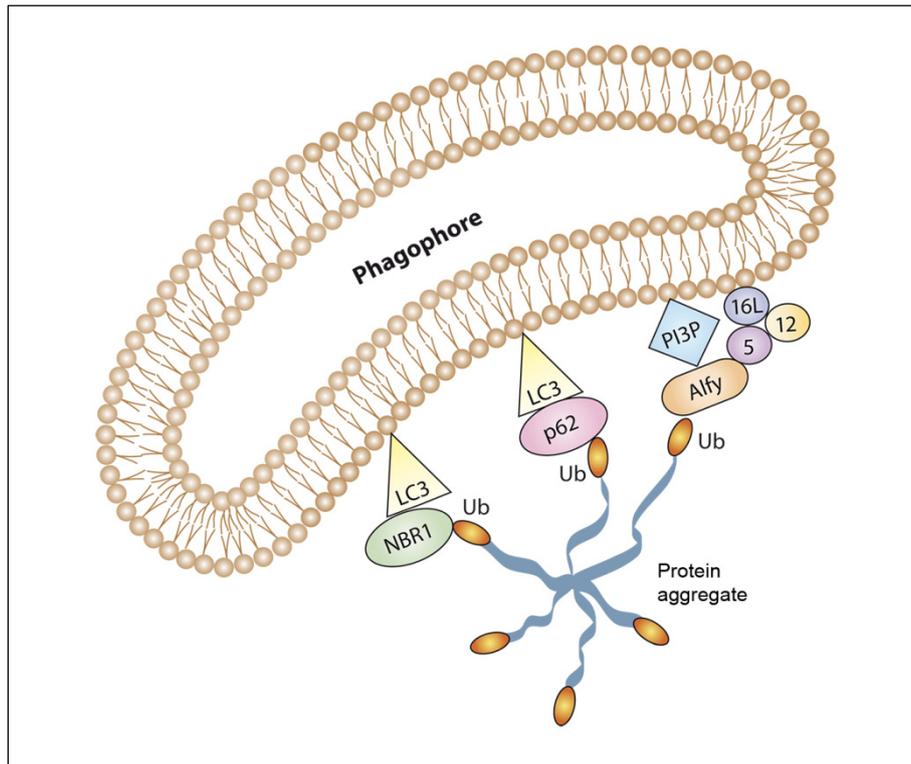


Figure 39 : L'agrégation chez les mammifères

Chez les mammifères, les agrégats protéiques, peuvent être dégradés grâce à une forme sélective d'autophagie. L'ubiquitination de ces agrégats va permettre leur reconnaissance par des protéines adaptatrices, comme p62, NBR1 ou Afy. L'interaction entre les adaptateurs et LC3 (homologue de Atg8) va permettre l'ancrage des agrégats à l'intérieur des autophagosomes, ainsi que leur dégradation.

(Weidberg et al., 2011)

➤ *Agréphagie*

L'agréphagie est un terme qui correspond à la dégradation sélective d'agrégats protéiques par un mécanisme d'autophagie. De nombreux types de stress et de dysfonctionnements peuvent aboutir à l'apparition de protéines mal repliées. Ces protéines mal repliées vont présenter une structure aberrante provoquant ainsi une perte de fonction mais également l'exposition de domaines hydrophobes, normalement enfouis au cœur de la protéine. Ce phénomène provoque l'accumulation d'agrégats protéiques (Johnston, Ward et al. 1998). Ces agrégats sont difficilement réversibles, ce qui rend leur dégradation par la voie ubiquitine protéasome impossible. Leur accumulation peut induire de nombreuses perturbations au niveau cellulaire. Cependant l'autophagie a été identifiée chez les mammifères comme un mécanisme permettant de dégrader efficacement les agrégats protéiques (Iwata, Christianson et al. 2005). Les agrégats protéiques présentant un fort niveau d'ubiquitination, ils vont pouvoir être détectés par des protéines adaptatrices comme p62 puis dirigés vers une dégradation par la voie autophagique (Tung, Hsu et al. 2010) (Fig. 39). Pour l'instant, ce processus n'a été identifié que chez les métazoaires, mais certains travaux indiquent qu'une voie permettant la dégradation sélective d'agrégats protéiques existe également chez les plantes (Zhou, Wang et al. 2013).

➤ *Autres formes d'autophagie sélective*

Régulièrement, de nouvelles voies permettant la dégradation spécifique de différents composés cellulaires sont découvertes, que ce soit chez la levure, les mammifères ou les plantes.

ER-phagie : un stress du réticulum provoque une accumulation de protéines mal repliées dans le lumen du RE déclenchant la "*Unfolded Protein Response*". Il a été montré que dans de telles conditions, des portions de réticulum pouvaient être dégradées sélectivement par l'autophagie au cours d'un processus nommé : ER-phagie (Bernales, McDonald et al. 2006).

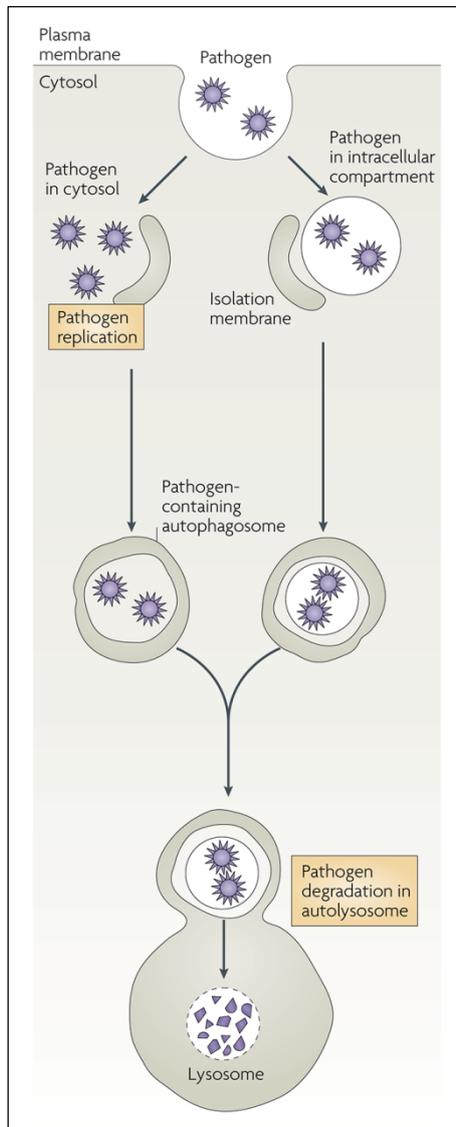


Figure 40 : Exemple de xénophagie chez les mammifères

Chez les mammifères, les pathogènes intracellulaires, présents au niveau du cytosol ou dans des phagosomes, peuvent être piégés au sein d'autophagosomes puis dirigés vers le lysosome pour dégradation.

(Levine et Deretic, 2007)

Une forme similaire d'autophagie sélective à récemment été mise en évidence chez *Arabidopsis thaliana*, montrant à quel point ce mécanisme essentiel pour la tolérance à un stress du réticulum est conservé chez les eucaryotes (Liu, Burgos et al. 2012).

"Piecemeal microautophagy of the nucleus" : en condition de carence nutritionnelle, *Saccharomyces cerevisiae* dispose d'un mécanisme permettant de dégrader des portions de son noyau par un mécanisme d'invagination de la vacuole. Cette forme de microphagie partage une partie de la machinerie de l'autophagie (Krick, Muehe et al. 2008).

Xenophagie : l'autophagie représente également un moyen efficace permettant de limiter la prolifération intracellulaire de pathogènes ainsi que la réplication de certains virus (Levine and Deretic 2007). Ces différents intrus peuvent être dégradés soit par une autophagie sélective par ubiquitination (impliquant une interaction avec p62) soit en étant reconnu par un autre type de protéine adaptatrice comme TECPR1 qui est spécialement impliquée dans la reconnaissance de bactéries comme *Shigella* (Ogawa, Yoshikawa et al. 2011) (Fig. 40).

RCB-autophagie : Chez les plantes, la RuBisCO, présente à l'intérieur des chloroplastes, constitue entre 12 % et 30 % des protéines présentes dans les feuilles. La RuBisCO représente donc une quantité importante de carbone et d'azote qu'il va falloir dégrader efficacement pour remobiliser ces ressources en cas de carence ou lors de la sénescence foliaire. La dégradation de la RuBisCO s'effectue par bourgeonnement d'une partie du chloroplaste formant une vésicule (RCB, Rubisco Containing Body), qui va dès sa formation être séquestrée par un autophagosome, avant d'être déversée dans la vacuole pour être dégradée (Ishida, Yoshimoto et al. 2008).

L'existence de ces nombreuses voies d'autophagie faisant intervenir de nombreux récepteurs et adaptateurs spécifiques, met en exergue le haut niveau de régulation de ces processus de dégradation, sélectifs ou non. De plus, la grande diversité de constituants cellulaires ciblés par l'autophagie, laisse penser que l'autophagie est un mécanisme jouant un rôle central dans la cellule, participant à de nombreuses fonctions cellulaires.

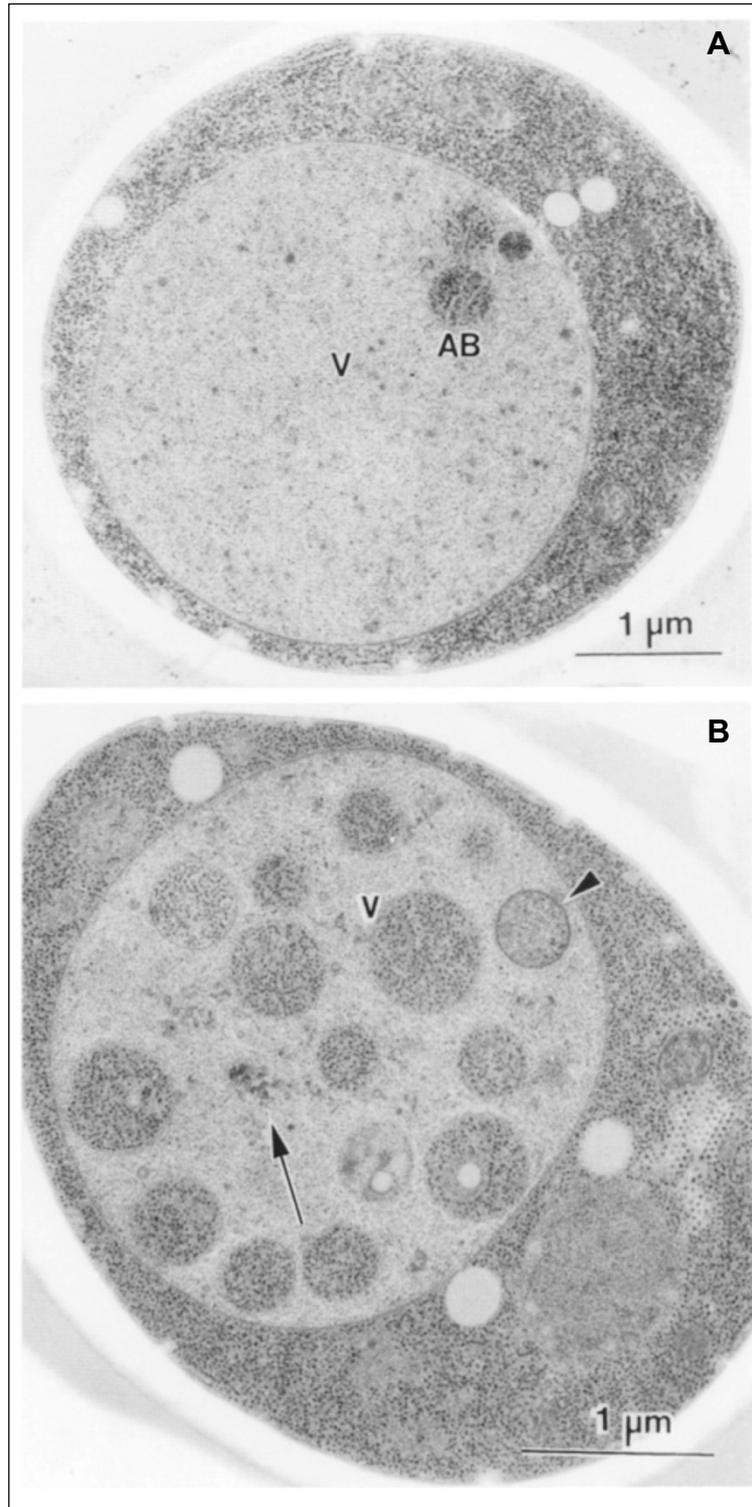


Figure 41 : Induction de l'autophagie par carence carbonée chez *Saccharomyces cerevisiae*

Cellules BJ926, déficientes en protéases vacuolaires, mises en culture dans un milieu déficient en carbone pendant 30 minutes (A), ou 8 heures (B), mettant en évidence l'accumulation de corps autophagiques (AB) dans la vacuole (V).

(*Takeshige et al., 1992*)

1.3. Rôles de l'autophagie

1.3.1. Recyclage des acides aminés

L'un des rôles majeurs de l'autophagie a été mis en évidence chez *Saccharomyces cerevisiae*, en étudiant les niveaux de synthèse protéique d'une souche déficiente pour l'autophagie, en conditions de carence azotée (Onodera and Ohsumi 2005). Dans ces conditions, certaines protéines comme des enzymes assurant la synthèse des acides aminés et les enzymes vacuolaires sont synthétisées de manière importante chez les levures sauvages mais pas chez les levures déficientes pour l'autophagie. Cette déficience en synthèse protéique chez les mutants, alors que les quantités d'ARNm étaient similaires, ont permis de mettre en évidence une forte réduction de la quantité globale d'acides aminés libres dans la cellule, atteignant pour certains des valeurs critiques (Onodera and Ohsumi 2005). Ces études ont permis de démontrer que l'autophagie, en assurant la dégradation de nombreuses protéines, permet à la cellule de disposer d'une plus grande quantité d'acides aminés libres, afin de permettre la synthèse protéique. De plus, l'autophagie étant un processus inductible, son induction dans des conditions de carence carbonée (Takeshige, Baba et al. 1992) va augmenter le turnover des protéines, permettant ainsi à la cellule de modifier, de manière très réactive, les niveaux de certaines protéines, permettant des adaptations efficaces face aux changements environnementaux (Fig. 41).

Chez les animaux, en plus d'assurer la synthèse protéique, cette réserve d'acides aminés libres, générée par l'autophagie, peut également servir au maintien de la glycémie en période de carence nutritionnelle. En effet il a été montré que ces acides aminés provenant de l'autophagie contribuaient à la synthèse directe de glucose *via* la néoglucogenèse au niveau du foie (Ezaki, Matsumoto et al. 2011). L'autophagie contribue également à la production d'énergie en modifiant le métabolisme lipidique et plus précisément en favorisant la lipolyse. En effet, *via* une forme sélective de l'autophagie, spécialement dirigée contre les gouttelettes lipidiques, l'autophagie va permettre la dégradation de ces structures de réserve afin de produire des acides gras qui permettront ensuite de produire de l'énergie (Suzuki, Onodera et al. 2011).

1.3.2. Remobilisation de l'azote et du carbone

Chez les plantes également, l'autophagie est fortement induite en conditions de carence nutritionnelle (Thompson, Doelling et al. 2005). Elle joue un rôle important pour la remobilisation du carbone et de l'azote (Guiboileau, Yoshimoto et al. 2012). En effet il a été montré que les protéines chloroplastiques, qui représentent une très importante source d'azote (Guiboileau, Avila-Ospina et al. 2013), sont dégradées grâce à une autophagie probablement sélective (RCB autophagy). Cette remobilisation des ressources permet à la plante de prélever le carbone et l'azote présents dans des organes vieillissants, lorsqu'ils entrent en sénescence, afin de le redistribuer aux organes en croissance, comme les nouvelles feuilles et les graines en formation. L'autophagie est, tout comme chez la levure et les animaux, nécessaire pour la survie en condition de carence nutritionnelle.

1.3.3. Détoxification cellulaire

L'autophagie, de par sa capacité à dégrader un grand nombre de cargos, va également permettre de débarrasser le cytoplasme de composants indésirables ou toxiques. Chez les plantes, comme pour une grande partie des eucaryotes, la grande majorité des stress biotiques ou abiotiques se traduisent par une augmentation de la quantité de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS) (Mittler 2002). Ces dérivés, hautement réactifs, vont causer de nombreux dégâts cellulaires que ce soit au niveau des lipides, des protéines ou même de l'ADN. Chez *Arabidopsis thaliana*, les mutants défectueux pour l'autophagie, sont hypersensibles aux différents stress abiotiques et présentent au niveau cellulaire une importante quantité de protéines oxydées (Xiong, Contento et al. 2007) (Liu, Xiong et al. 2009). Ces résultats suggèrent que l'autophagie joue un rôle dans la dégradation des protéines oxydées, permettant une meilleure tolérance aux différents stress biotiques et abiotiques.

1.3.4. Un processus anti-vieillessement

Chez les mammifères, de nombreuses pathologies sont liées à une défaillance de l'autophagie. En effet beaucoup de maladies neurodégénératives résultent en partie de l'accumulation d'agrégats intracellulaires. Dans bon nombre de ces maladies il a été mis en

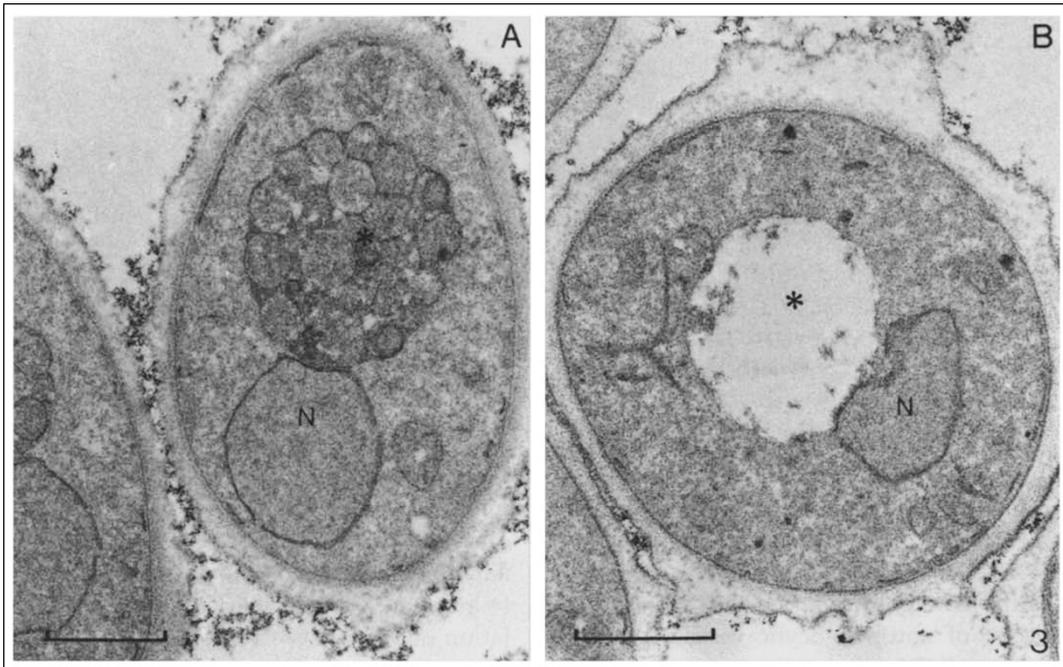


Figure 42 : Mise en évidence de mutants pour l'autophagie chez *S. cerevisiae*

(A) De nombreux corps autophagiques s'accumulent au niveau de la vacuole, chez une souche déficiente en protéinases (YMS3,pMT2), après 4 heures de carence en présence d'un inhibiteur de protéases PMSF. **(B)** La souche aut2 (FIM39,pMT2), cultivée dans les mêmes conditions, n'accumule aucune structure autophagique dans la vacuole, mettant en évidence un blocage de la voie autophagique.

Echelle, 1 μ m; N, noyau; *, vacuole.

(Thumm *et al.*, 1994)

évidence que ces accumulations coïncidaient avec un dérèglement de l'autophagie, suggérant le rôle crucial de l'autophagie dans la dégradation, spécifique ou non, des agrégats cellulaires (Levine, Mizushima et al. 2011). L'implication de l'autophagie dans de nombreuses autres pathologies comme, le cancer, les maladies infectieuses, maladies cardiovasculaires, maladies pulmonaires, montre à quel point ce mécanisme est central pour l'équilibre cellulaire (Levine, Mizushima et al. 2011). Enfin le fait qu'il assure le turnover des protéines à longue durée de vie et des organites altérés laisse penser que l'autophagie joue un rôle cyto-protecteur global permettant de ralentir le vieillissement.

2. La machinerie de formation de l'autophagosome

La découverte, chez *Saccharomyces cerevisiae* des gènes *ATG* (Autophagy Related Gene), par screening génétique de mutants déficients pour la formation d'autophagosomes (Tsukada and Ohsumi 1993) (Harding, Morano et al. 1995) (Thumm, Egner et al. 1994) (Klionsky, Cregg et al. 2003) (Fig. 42), a ouvert un vaste champ d'exploration sur la cascade d'interactions moléculaires régulant la formation d'un autophagosome. Aujourd'hui, chez la levure, on compte plus de 36 gènes *ATG*, composant la machinerie autophagique, dont la majorité sont conservés parmi les eucaryotes, des mammifères jusqu'aux plantes (Tanida 2011) (Li and Vierstra 2012).

Une cascade moléculaire impliquant les protéines *ATG*, semble commune à tous les eucaryotes, malgré des étapes morphologiques quelquefois distinctes d'un règne à l'autre. Ces différences posent la question du positionnement de ces évènements moléculaires dans la cellule (Avin-Wittenberg, Honig et al. 2012).

Ainsi, chez *Saccharomyces cerevisiae*, la formation se déroule au niveau d'une structure unique appelée le PAS (Pre-Autophagosomal Structure). Cette structure spécifiquement dédiée à la formation de l'autophagosome, est localisée au voisinage de la vacuole et est le lieu de recrutement de la machinerie *Atg* (Suzuki, Kirisako et al. 2001). Au niveau du PAS, se forme une première structure, correspondant à une membrane en forme de croissant, nommée le phagophore ou membrane d'isolement. Cette structure va ensuite croître jusqu'à se refermer sur elle-même afin de former une vésicule à double membrane :

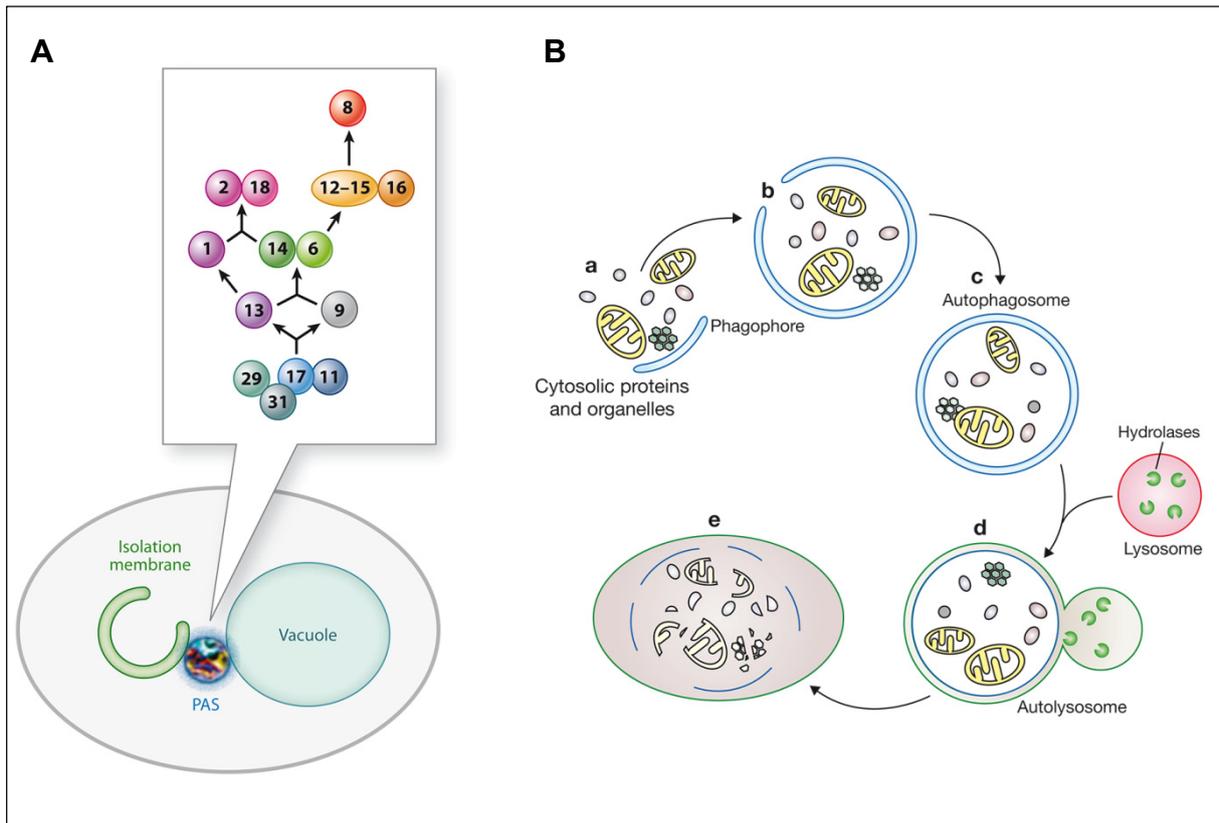


Figure 43 : Schéma de l'autophagie chez *S. Cerevisiae* et chez les animaux

(A) Chez la levure, la formation de l'autophagosome se déroule au niveau d'une structure unique, proche de la vacuole (PAS, *preautophagosomal structure*), où sont recrutées la majorité des protéines Atg (*Mizushima et al., 2011*). **(B)** Chez les animaux, la formation de l'autophagosome se déroule en de multiples endroits du cytosol. Une fois formé, il fusionne avec un lysosome pour former un autolysosome et permettre la dégradation de son contenu (*Xie et Klionsky, 2007*).

l'autophagosome. Enfin une fois formé, l'autophagosome fusionne avec la vacuole afin de permettre la dégradation de son contenu (Fig. 43A).

Par contre, chez les mammifères, comme chez les plantes, il n'y a pas de PAS, et la formation de l'autophagosome a lieu au niveau de multiples régions du cytosol. On retrouve cependant les étapes de la formation du phagophore / membrane d'isolement puis de la formation de l'autophagosome (Mizushima, Yamamoto et al. 2001). Alors que chez les plantes, l'autophagosome fusionne directement avec la vacuole lytique, chez les mammifères, l'autophagosome va pouvoir fusionner de manière directe avec le lysosome, et former ainsi un autolysosome (Fig. 43B), ou passer par une étape intermédiaire où il fusionne avec un endosome formant ainsi un amphisome (Fader and Colombo 2008).

2.1. Régulation de l'autophagie par TOR : le senseur

Parmi les multiples acteurs impliqués dans la régulation de l'autophagie, la kinase TOR (Target Of Rapamycin), joue un rôle central, permettant de réguler, entre autres, la croissance cellulaire et l'autophagie en fonction de l'état physiologique de la cellule ainsi que des différents stress environnementaux (Wullschleger, Loewith et al. 2006).

TOR fut initialement découverte comme étant la cible de la rapamycine, qui est un inhibiteur de la croissance cellulaire. Sa mutation confère une résistance aux propriétés inhibitrices de cet agent bactérien (Heitman, Movva et al. 1991). Les études qui suivirent, permirent d'identifier les nombreuses fonctions de TOR et de placer cette protéine au centre des voies de contrôle de la croissance cellulaire. Ce rôle central fait de TOR une protéine essentielle au sein de la cellule et explique parfaitement pourquoi, au jour d'aujourd'hui, dans tous les génomes eucaryotes étudiés, on trouve un gène codant pour cette protéine. Chez la levure comme chez les mammifères, TOR a la possibilité de former deux complexes, comprenant différents partenaires et assurant différentes fonctions : TORC1 et TORC2 (TOR Complexes) (Loewith and Hall 2011) (Fig. 44A). Le complexe TORC1 est sensible à la rapamycine, et contrôle la croissance cellulaire d'un point de vue temporel en favorisant l'initiation de la traduction, la biogénèse des ribosomes ainsi que l'import des nutriments (Díaz-Troya, Pérez-Pérez et al. 2008). Le complexe TORC2 est, quant à lui, insensible à la rapamycine, et est

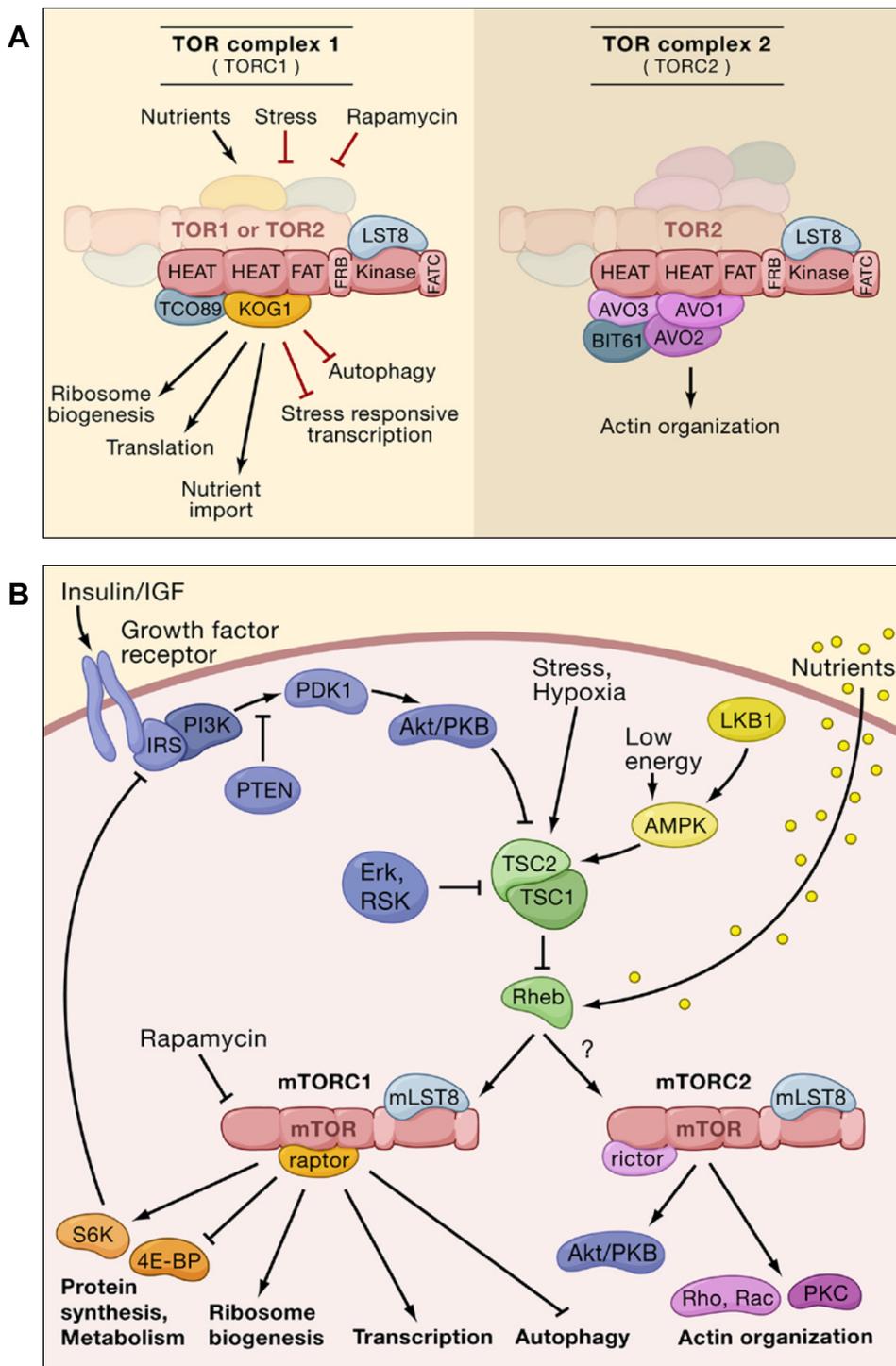


Figure 44 : Les complexes TOR

(A) Complexes TOR 1 (TORC1) et TOR 2 (TORC2) chez *S. Cerevisiae*. Grâce à ses nombreux domaines (HEAT, FAT, FRB, Kinase et FATC), TOR peut interagir avec de nombreuses protéines et se dimériser afin de former TORC1 ou TORC2. (B) Représentation des voies de signalisation liées à mTOR chez les mammifères.

(Wullschlegel et al., 2006)

impliqué dans de multiples processus assurant la croissance cellulaire d'un point de vue spatial. En effet son action sur la polarisation du cytosquelette d'actine va permettre de diriger les voies de sécrétion ce qui va favoriser une croissance localisée, mais également son implication dans les processus d'endocytose ainsi que dans biosynthèse des sphingolipides (Loewith and Hall 2011).

La kinase TOR (et plus particulièrement *via* le complexe TORC1) est capable de percevoir de nombreux signaux extra- et intra-cellulaires comme la disponibilité en nutriments, le statut énergétique de la cellule, la présence d'un stress hypoxique ou de facteurs de croissance (Wullschleger, Loewith et al. 2006). L'intégration de tous ces signaux au niveau de TOR, lui permet d'être un senseur de l'état de la cellule et ainsi de pouvoir diriger le comportement de la cellule vers de la croissance cellulaire ou vers la mise en action de différents processus destinés à survivre à un stress ou à une carence nutritionnelle (Fig. 44B).

En effet, dans un milieu riche en nutriments, TORC1 active les mécanismes favorisant la croissance cellulaire et bloque les mécanismes de réponse aux différentes formes de stress et notamment l'autophagie. Cependant lorsque les conditions de croissance deviennent limitantes, TORC1 lève son action inhibitrice sur les différents mécanismes d'adaptation et de survie, activant par la même occasion l'autophagie (Díaz-Troya, Pérez-Pérez et al. 2008).

Chez *Arabidopsis thaliana*, l'homologue de TOR a été identifié, cependant, la protéine AtTOR est insensible à la rapamycine (Menand, Desnos et al. 2002). Chez la levure la rapamycine se lie à un co-facteur intracellulaire (FKBP12), et ce complexe va ensuite interagir avec TOR et causer son inactivation. Des études ont montré que l'insensibilité de AtTOR à la rapamycine venait de l'incapacité de l'homologue végétal de FKBP12 à former un complexe avec la rapamycine. L'expression de ScFKPB, provenant de la levure, chez *Arabidopsis* restaure l'inactivation de AtTOR par la rapamycine (Sormani, Yao et al. 2007). Malgré cette différence de sensibilité face à la rapamycine, rendant l'étude du rôle de TOR plus difficile, il semble que comme chez la levure et les mammifères, AtTOR soit directement liée au contrôle de la croissance cellulaire et permet de réguler ce processus en fonction des conditions environnementales (Deprost, Yao et al. 2007). Enfin l'implication de AtTOR sur la régulation de l'autophagie a également été démontrée chez *Arabidopsis thaliana*, en générant des lignées RNAi-AtTOR, dans lesquelles, l'autophagie est induite de manière constitutive

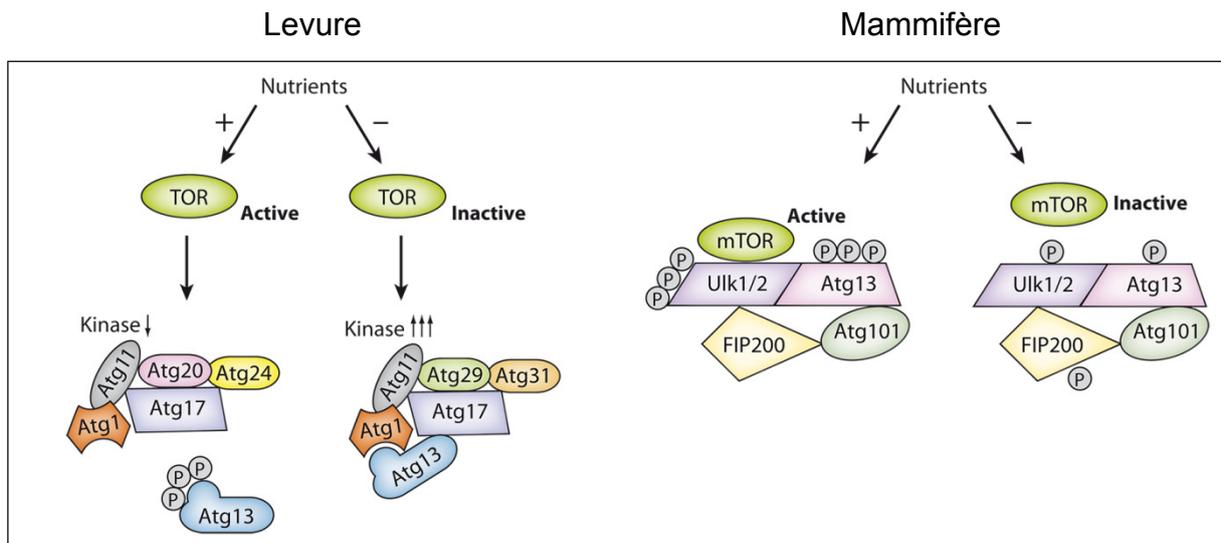


Figure 45 : Le complexe Atg1/Ulk1 régule l'autophagie chez la levure et chez les mammifères

Chez la levure, en présence de nutriments, TOR est activée et Atg13 se retrouve phosphorylée, ce qui diminue son affinité pour le reste du complexe Atg1. En condition de carence nutritionnelle, TOR est inactivée, provoquant ainsi la déphosphorylation de Atg13 et renforçant son recrutement au niveau du complexe Atg1. Une fois réuni, ce complexe va favoriser l'activité kinase de Atg1, responsable de l'induction de l'autophagie. Chez les mammifères, en présence de nutriments, mTOR interagit avec le complexe stable Ulk1/2-Atg13-FIP200-Atg101. mTOR va ainsi phosphoryler Ulk1/2 et Atg13, provoquant une inhibition de l'activité kinase d'Ulk1/2 et l'inhibition de l'autophagie. Une carence nutritionnelle provoque l'inactivation de mTOR et la déphosphorylation de Ulk1/2 et Atg13. Ulk1/2 retrouve ainsi son activité kinase et permet l'induction de l'autophagie par phosphorylation de Atg13 et FIP200.

(Weidberg et al., 2011)

(Liu and Bassham 2010). Ces données confirment que comme chez les autres modèles précédemment étudiés, TOR est un inhibiteur de la voie autophagique des cellules végétales.

2.2. Le complexe ATG1/ATG13 : l'interrupteur

Le complexe ATG1/13 a toujours été considéré comme le premier élément d'un modèle linéaire représentant la cascade d'évènements menant à la formation de l'autophagosome (Itakura and Mizushima 2010). De récentes études basées sur des approches d'imagerie révèlent l'implication de ATG1 à différentes étapes de la formation de l'autophagosome.

ATG1 est une sérine-thréonine kinase, et au jour d'aujourd'hui, est la seule protéine kinase parmi les protéines ATG. ATG1 est essentielle pour l'autophagie et l'on observe une forte augmentation de son activité kinase en conditions de carence nutritionnelle (Kamada, Funakoshi et al. 2000). Des études chez la levure ont permis d'identifier Atg1 au cœur d'un complexe protéique composé d'autres protéines accessoires comme Atg11, Atg13, Atg17, Atg29 et Atg31 (Mizushima 2010), et ce complexe impliqué dans la formation de l'autophagosome est relativement conservé chez les eucaryotes que ce soit chez les mammifères (le complexe ULK1) ou chez les plantes (Suttangkakul, Li et al. 2011) (Fig. 45). Parmi ces différentes protéines partenaires, ATG13 est un facteur essentiel de ce complexe car l'activité kinase de ATG1 est fortement dépendante de l'interaction ATG1/ATG13. Paradoxalement, alors que la régulation de cette interaction a longtemps été suggérée comme étant le mécanisme permettant de réguler l'activité de ce complexe, une étude récente a montré que chez la levure, comme chez les mammifères, l'interaction entre ATG1 et ATG13 ne semble pas être dépendante de la carence nutritionnelle (Kraft, Kijanska et al. 2012). Il doit donc exister un autre mécanisme permettant de réguler l'activité du complexe ATG1/ATG13 puisque l'association de ces deux protéines semble constitutive.

Tout comme ATG13, ATG1 se trouve hyperphosphorylée en conditions de croissance sur un milieu riche en nutriments, puis est rapidement déphosphorylée en conditions de carence nutritionnelle. Le principal acteur de cette phosphorylation est la kinase TOR. En effet la kinase TOR va réguler négativement l'activité du complexe ATG1/ATG13 en le

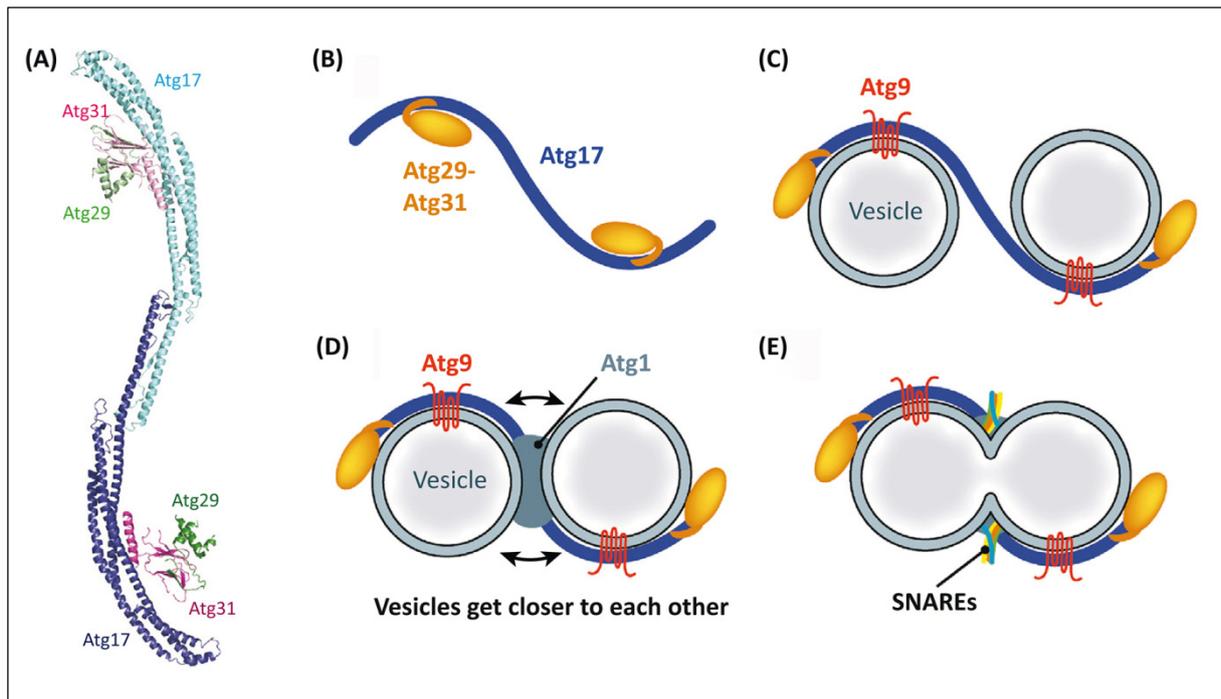


Figure 46 : Modèle impliquant le complexe Atg1 dans la fusion de vésicules

(A) Structure du complexe Atg17-Atg29-Atg31 dans sa forme auto-inhibée. (B) Lorsque l'autophagie est inhibée, ce complexe est présent au niveau du PAS mais la position de Atg29 et Atg31 au niveau de la face concave de Atg17 bloque l'activité de ce complexe. (C) L'induction de l'autophagie provoque le recrutement de vésicules Atg9 au niveau du PAS, qui vont remplacer par compétition Atg29-Atg31 au niveau de la partie concave de Atg17. (D) Le recrutement de Atg1 et Atg13 au niveau de ce complexe provoque le rapprochement des vésicules Atg9 liées à Atg17 pour permettre leur fusion. (E) Enfin dans la dernière étape de ce modèle spéculatif, des SNAREs interviendraient afin de faciliter la fusion homotypique des vésicules Atg9.

(Stanley et al., 2013)

phosphorylant, lorsque les conditions sont propices à la croissance cellulaire (Mizushima 2010) (Fig. 45). Il existe cependant d'autres niveaux possibles de régulation qui sont pour l'instant peu connus, comme la phosphorylation d'ATG1 et d'ATG13 par la PKA et l'AMPK, mais également d'autres modifications post-traductionnelles comme l'acétylation de ATG1 ou son ubiquitination (Wong, Puente et al. 2013).

Bien que l'activité kinase de ATG1 soit essentielle à l'autophagie (Chan, Longatti et al. 2009), le rôle précis de ce complexe reste à établir. En effet 1888 substrats potentiels de Atg1 ont été identifiés chez la levure sans pour autant révéler le fonctionnement de ce complexe (Mizushima 2010). On sait cependant que ATG1, une fois activée, a la possibilité de s'autophosphoryler et de phosphoryler ATG13. Il semble donc que suite à l'inactivation de TOR par une carence nutritionnelle, le complexe ATG1/ATG13 soit activé et que ATG1 puisse alors grâce à son activité kinase phosphoryler de nombreuses cibles comme ATG13.

ATG13 possède, en région N-terminale, un domaine HORMA, capable de recruter spécifiquement ATG14, qui fait partie du complexe PI3-K essentiel pour les étapes précoces de la formation de l'autophagosome (Jao, Ragusa et al. 2013). Le recrutement du complexe PI3-K semble être lié à l'état de phosphorylation de ATG13, faisant d'ATG13 un interrupteur permettant d'activer le recrutement de ce complexe au niveau du site de formation de l'autophagosome.

En plus de son activité kinase et du recrutement du complexe PI3-K, le complexe ATG1/ATG13 semble également impliqué dans des phénomènes de recrutement de vésicules lors des premières étapes de la formation de l'autophagosome (Fig. 46). En effet, Ragusa *et al.* (2012), ont mis en évidence que chez la levure, la partie C-terminale de Atg1 possède un domaine EAT capable de se lier aux membranes de manière peu spécifique. Au sein de ce complexe se les protéines Atg17, Atg29 et Atg31, ont la possibilité de s'assembler et de former une structure multimérique en forme de "S" qui va être un élément essentiel à la sélectivité du complexe Atg1/ Atg13. En effet la courbure de chaque anse du "S" va restreindre l'interaction de Atg1 avec des vésicules présentant une forte courbure, et de taille comprise entre 20 et 30 nm (Stanley, Ragusa et al. 2013). De plus alors que Atg1 possède la capacité de se lier à des vésicules, une fois intégrée au sein du complexe Atg1/ Atg13, cette capacité n'est possible que si le complexe reconnaît la protéine Atg9 (*via* une interaction avec Atg17), présente au niveau de la membrane des vésicules (Ragusa, Stanley et al. 2012). Ces

résultats montrent que grâce aux multiples acteurs du complexe Atg1/ Atg13, ce dernier a la capacité de reconnaître la présence de marqueurs spécifiques à la surface de vésicules de taille définie. Ce mécanisme met en avant le rôle du complexe Atg1/ Atg13 dans les événements membranaires très précoces de la formation de l'autophagosome, en permettant l'agrégation des vésicules Atg9. Cette étape et les événements de fusions qui vont en découler sont considérées comme étant à l'origine de la formation du phagophore (Stanley, Ragusa et al. 2013).

Enfin bien que le rôle du complexe ATG1/ATG13 soit clairement démontré lors des toutes premières étapes de la formation de l'autophagosome, il joue également d'autres rôles lors des étapes de maturation de l'autophagosome, notamment grâce à son interaction avec ATG8 (Alemu, Lamark et al. 2012). Cependant, ces rôles sont actuellement peu compris.

Arabidopsis thaliana possède des homologues pour ATG1 et ATG13, codés respectivement par 4 et 2 gènes. Le double mutant *atg13a-atg13b* présente un phénotype identique à celui des mutants où la voie autophagique est perturbée : sénescence précoce et hypersensibilité à la carence nutritionnelle (Suttangkakul, Li et al. 2011). Chez ce double mutant aucun autophagosome n'atteint la vacuole, cependant la lipitation d'ATG8 n'est pas affectée. Cela met également en évidence le rôle du complexe dans des étapes plus tardives de maturation de l'autophagosome. Enfin il a été montré que, contrairement aux autres protéines ATG, la quantité de ATG1 et ATG13 présent dans le cytoplasme était régulée, en cas de carence, par leur dégradation *via* l'autophagie (Suttangkakul, Li et al. 2011). Le fait que ce complexe soit à la fois un régulateur et une cible de l'autophagie a par la suite été également retrouvé chez la levure (Kraft, Kijanska et al. 2012). Ce mécanisme correspond probablement à une boucle de rétrocontrôle négatif, permettant de contrôler finement la formation de nouveaux autophagosomes.

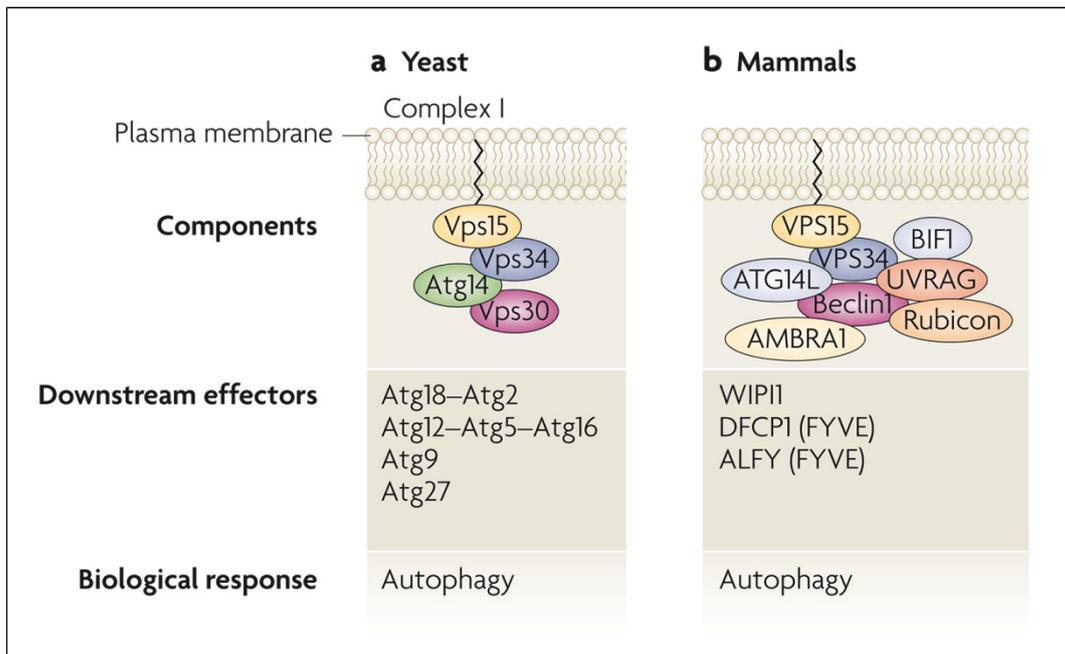


Figure 47 : Schéma du complexe PI3K régulant l'autophagie chez *S. cerevisiae* et chez les animaux

(A) Chez la levure, Vps34 forme 3 complexes. Le complexe I, impliqué dans l'autophagie est composé de Vps34-Vps15-Vps30-Atg14. (B) Chez les animaux, le complexe impliqué dans la formation des autophagosomes est composé des protéines homologues présentes chez la levure : VPS34-VPS15-Beclin1-ATG14L. Le complexe VPS34 est cependant plus élaboré chez les mammifères car il comprend des protéines partenaires comme BiF1, UVRAG, Rubicon et AMBRA1.

(Vanhaesebroeck et al., 2010)

2.3. Le complexe PI3-K : le signal membranaire

Le complexe PI3-K est un complexe formé autour de la phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-K) de classe III, Vps34.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Vps34 est présente dans trois complexes dont un seul est impliqué dans la formation de l'autophagosome. Ce complexe est composé de Vps34, Atg14, Atg6 et Vps15. (Obara and Ohsumi 2011) (Fig. 47A). Atg14 permet le recrutement de ce complexe au niveau du PAS notamment grâce à son interaction avec Atg13 (Jao, Ragusa et al. 2013).

Chez les mammifères, trois complexes comprenant hVps34 (homologue de Vps34) ont été identifiés. Parmi ces trois complexes, comme chez la levure, un seul est impliqué dans la formation de l'autophagosome. Il est composé de hVps34, Atg14L (également connu sous le nom de Barkor/Atg14(L)), Beclin1 (homologue de Atg6) et hVps15 (homologue de Vps15) (Vanhaesebroeck, Guillermet-Guibert et al. 2010) (Fig. 47B).

Atg14L est essentielle à la formation de l'autophagosome chez les mammifères car chez des cellules Atg14L knockout il y a une très forte diminution du nombre d'autophagosomes formés en condition de carence (Matsunaga, Saitoh et al. 2009). Atg14L permet de diriger le complexe PI3-K vers la voie autophagique en permettant, comme chez la levure, le recrutement du complexe PI3-K au niveau du site de formation de l'autophagosome. Atg14L est initialement présente au niveau de la membrane du RE grâce à la présence en N-terminale d'un domaine où se trouvent des cystéines très conservées, et cette localisation est indépendante de la carence nutritionnelle (Fan, Nassiri et al. 2011). Lorsque les conditions de croissance sont favorables, il n'y a pas d'induction de l'autophagie : Atg14L est présente au niveau du RE alors que le reste du complexe PI3-K est piégé au niveau du cytosquelette, empêchant ainsi la formation du complexe (Di Bartolomeo, Corazzari et al. 2010). Le complexe PI3K interagit par l'intermédiaire de Beclin1 avec AMBRA1 qui est directement liée par la dynéine aux microtubules. L'induction de l'autophagie va provoquer la phosphorylation de AMBRA1 par ULK1 (homologue d'Atg1), ce qui va provoquer la libération du complexe PI3-K (Di Bartolomeo 2010). L'induction de l'autophagie va également provoquer la réorganisation de Atg14L, se regroupant au niveau de régions

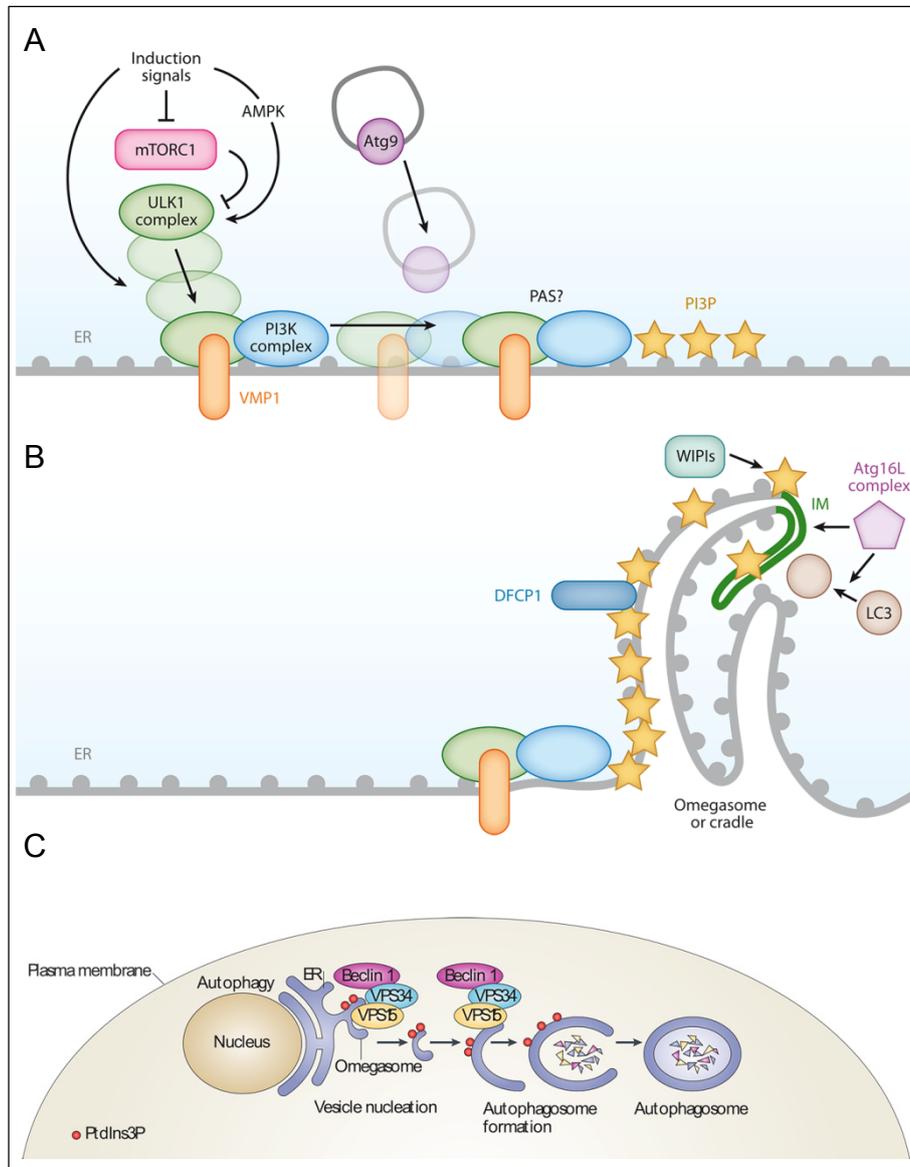


Figure 48 : Modèle illustrant l'implication du complexe PI3K dans la formation de l'autophagosome chez les mammifères

(A) Les signaux d'induction de l'autophagie provoquent l'inactivation de mTOR et l'activation du complexe ULK1, qui va se trouver relocalisé au niveau du RE et permettre le recrutement du complexe PI3K. Le recrutement du complexe PI3K provoque un enrichissement localisé en PtdIns3P. (B) Ensuite la membrane se déforme pour former l'omégasome, une structure riche en PtdIns3P permettant le recrutement de protéines comme DFCP1 et WIPI. Cette région du RE est le lieu où se forme la membrane d'isolement (*Mizushima et al., 2011*). (C) Enfin, la membrane d'isolement va s'étendre en se débarrassant du complexe PI3K et former l'autophagosome (*Adapté de Vanhaesebroeck et al., 2010*).

précises à la surface du RE, grâce à un mécanisme pour l'instant inconnu. Le recrutement du complexe PI3-K, par Atg14L, au niveau des sous-domaines du RE, provoque ainsi l'enrichissement de ces régions en PtdIns(3)P (Fig. 48A). Le PtdIns(3)P est majoritairement absent au niveau du RE, ce qui rend cette région particulièrement unique et va permettre des modifications membranaires spécifiques ainsi que le recrutement de certains acteurs essentiels pour la formation de l'autophagosome.

C'est notamment au niveau de ce domaine du RE, particulièrement riche en PtdIns(3)P, que va se former une structure appelée l'omégasome (Axe, Walker et al. 2008) (Fig. 48B). Cette structure a été mise en évidence en suivant le recrutement de DFCP1 (Double FYVE Containing Protein 1) qui est, en conditions normales, une protéine présente au niveau du RE, *via* un mécanisme indépendant de ses domaines FYVE. En condition d'induction de l'autophagie, cette protéine se retrouve recrutée au niveau de cette structure particulière du RE : l'omégasome, grâce à ses domaines FYVE (Axe, Walker et al. 2008). Ces études ont mis en évidence que l'omégasome désignait une portion du RE à proximité de laquelle se trouvaient recrutées ATG5 et LC3, à la surface d'une structure en croissance. Ces résultats suggèrent que chez les mammifères, la formation d'autophagosomes a lieu au niveau du RE et plus précisément des omégasomes (Fig. 48C).

Chez *Arabidopsis thaliana*, différents homologues des acteurs du complexe PI3-K ont été identifiés, notamment AtVPS34, qui est la seule PI3-K présente chez *Arabidopsis* et qui est impliquée dans de nombreuses fonctions physiologiques comme la croissance au niveau des poils racinaires (Lee, Bak et al. 2008) ainsi que le développement du pollen (Lee, Kim et al. 2008). Cependant le rôle de AtVPS34 sur la voie autophagique n'a, pour le moment, pas été révélé. On retrouve également chez *Arabidopsis*, un seul gène codant pour ATG6. Cette protéine semble colocaliser, lors de transformations transitoires de protoplastes, avec ATG8 au niveau des autophagosomes mais son rôle dans l'autophagie chez les plantes n'a pas encore été élucidé (Fujiki, Yoshimoto et al. 2007). Un homologue de Vps15 est également présent chez *Arabidopsis*, cependant aucun homologue de Atg14 n'a pour l'instant été identifié.

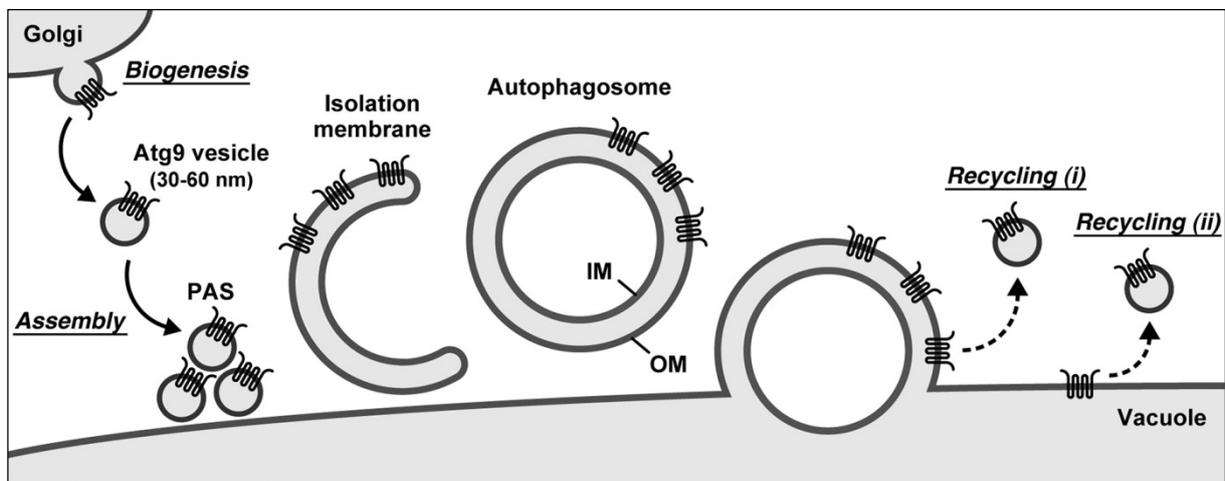


Figure 49 : Implication des vésicules Atg9 dans la dynamique membranaire de l'autophagie

Modèle présentant l'implication des vésicules Atg9 lors de la formation de l'autophagosome chez *S. cerevisiae*. Les vésicules Atg9, provenant du Golgi, sont recrutées au niveau du PAS en condition de carence nutritionnelle. Un petit nombre de ces structures vont participer à la formation de la membrane d'isolement, puis se détacher de la membrane externe (OM) de l'autophagosome au moment de la fusion avec la vacuole (i), ou plus tard, être recyclées à partir de la membrane de vacuolaire (ii).

(Yamamoto et al., 2012)

2.4. ATG9 : la navette vésiculaire

ATG9 est la seule protéine membranaire de la machinerie autophagique. Elle possède entre 5 et 7 domaines transmembranaires (en fonction des algorithmes de prédiction utilisés) et ses extrémités C-terminale et N-terminale sont exposées vers le cytoplasme (Young, Chan et al. 2006).

Chez la levure, Atg9 est présente au niveau de nombreuses structures punctiformes présentes dans le cytoplasme ainsi qu'au niveau du PAS, représentant des vésicules (Reggiori, Shintani et al. 2005). Ces vésicules Atg9 cyclent entre cytoplasme et PAS en conditions contrôles, mais lorsque l'autophagie est induite, Atg9 se retrouve préférentiellement recrutée au niveau du PAS *via* son interaction avec Atg17, un membre du complexe Atg1 (Sekito, Kawamata et al. 2009). Les vésicules Atg9 ont toujours été considérées comme étant une source de membranes pour la formation de l'autophagosome en assurant une navette entre le PAS et des compartiments donneurs de membrane. L'identité de ces structures fait encore débat. Certaines données suggèrent que ces structures correspondent à des complexes tubulo-vésiculaires à proximité avec les mitochondries (Mari, Griffith et al. 2010), d'autres suggèrent qu'il s'agit de petites vésicules indépendantes, provenant du Golgi (Yamamoto, Kakuta et al. 2012). Récemment, la contribution des vésicules Atg9 à la formation du phagophore a finalement été démontrée, cependant il semblerait que les vésicules Atg9 ne participeraient qu'aux étapes précoces de la formation du phagophore (Yamamoto, Kakuta et al. 2012). Ce dernier résultat met en évidence le fait que Atg9 semble apporter une faible quantité de membrane, afin de permettre la nucléation de l'autophagosome, par conséquent, d'autres sources de membranes sont donc nécessaires pour permettre la formation complète de l'autophagosome (Fig. 49).

Chez les mammifères le rôle ainsi que la localisation subcellulaire de mATG9 (mammalian ATG9) est moins bien compris. Comme chez la levure, mATG9 est présente au niveau de différentes structures, comme le TGN, les endosomes tardifs ou les endosomes de recyclage (Young, Chan et al. 2006) (Orsi, Razi et al. 2012). mATG9 possède également la capacité de cycler entre ces différents compartiments et lorsqu'il y a induction de l'autophagie, mATG9 est redistribuée à partir de la région péri-nucléaire du TGN vers des structures endosomales périphériques où elle colocalise avec LC3 (homologue de Atg8). Contrairement

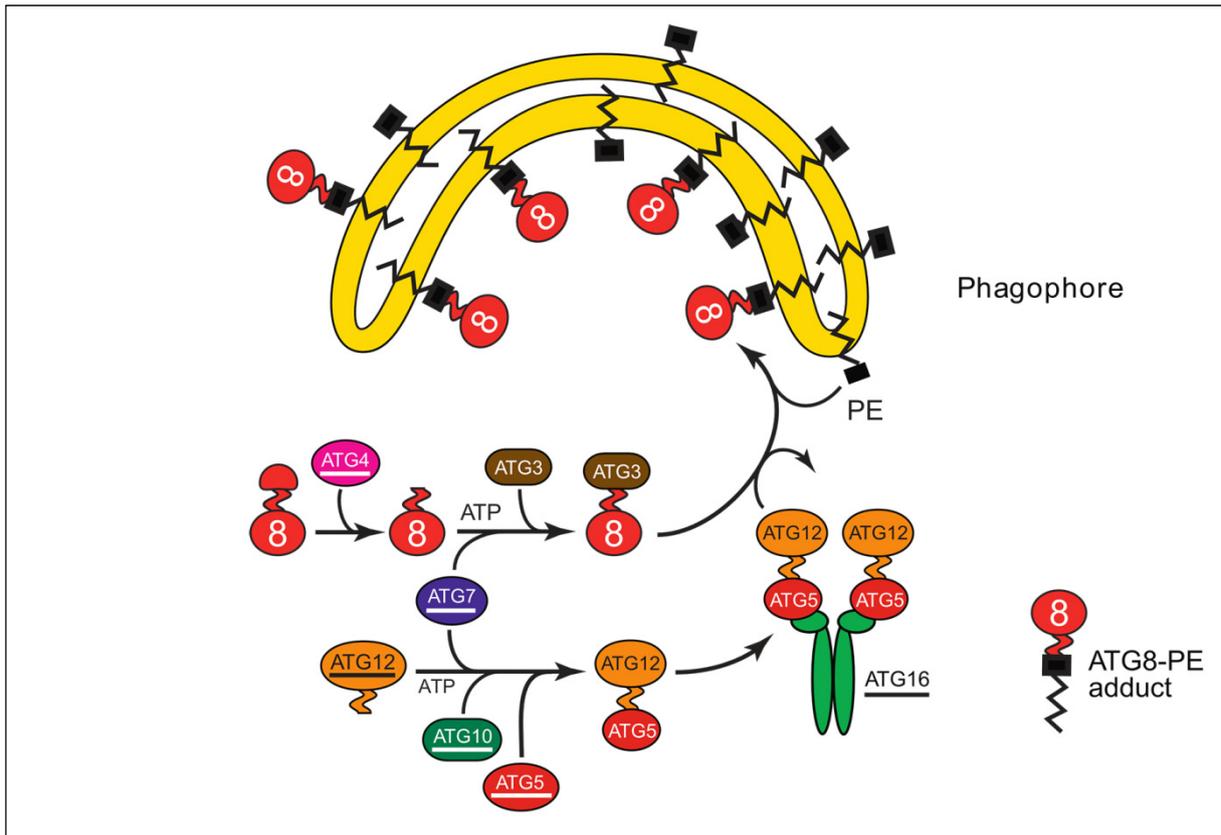


Figure 50 : Les deux complexes "ubiquitin-like" impliqués dans la formation de l'autophagosome

Atg12 et Atg8 jouent un rôle majeur dans la formation de l'autophagosome et leur implication est possible *via* des systèmes de conjugaison, présentant des mécanismes similaires à ceux assurant la conjugaison de l'ubiquitine. Ces deux voies de conjugaison permettent la formation du complexe Atg12-Atg5-Atg16 d'une part et la lipidação de Atg8 à la phosphatidyléthanolamine (PE), présente au niveau de la membrane de l'autophagosome, d'autre part.

(Adapté de Li et Vierstra, 2012)

aux études menées chez la levure, mATG9 colocalise avec les marqueurs du phagophore (ULK1 et DFCP1) et de l'autophagosome (Atg16L et LC3), mais ces interactions ne sont que transitoires et mATG9 ne semble pas faire partie intégrante de la membrane de l'autophagosome (Orsi, Razi et al. 2012).

Chez *Arabidopsis thaliana*, il existe un homologue de Atg9. Les plantes mutées pour le gène ATG9 présentent un phénotype de chlorose accélérée dans des conditions de carence carbonée ou azotée ainsi qu'une production de graines fortement affectée dans ces conditions de carence nutritionnelle (Hanaoka, Noda et al. 2002). Bien que le mutant *atg9* présente le phénotype classique des mutants de la voie autophagique, la formation des autophagosomes semble cependant perturbée de manière moins forte que pour le mutant *atg5* (Inoue, Suzuki et al. 2006). Ce résultat est pour l'instant difficile à expliquer car il n'existe que très peu d'informations sur le rôle d'ATG9 dans la formation de l'autophagosome chez *Arabidopsis thaliana*.

2.5. Deux systèmes de conjugaison "ubiquitin-like"

Il existe au sein de la machinerie ATG, assurant la formation de l'autophagosome, deux cascades d'évènements semblables à ceux que l'on retrouve lors de l'ubiquitination. La conjugaison de l'ubiquitine nécessite une activation par une enzyme E1, un transfert sur une enzyme de conjugaison E2 et son transfert sur la protéine à ubiquitiner grâce à l'intervention d'une E3-ligase (Pickart 2001). Dans la voie de l'ubiquitine, la E3-ligase est une enzyme déterminante pour la réaction d'ubiquitination, car c'est elle qui reconnaît le substrat et qui en définit la spécificité. Au cours de la formation de l'autophagosome, les deux protéines "ubiquitin-like" sont ATG8 et ATG12 et les mécanismes qui permettent leur conjugaison possèdent des similitudes (Fig. 50).

2.5.1. ATG8 : le bâtisseur

ATG8 est une protéine cytosolique, qui se retrouve liée de manière covalente à la membrane de l'autophagosome, lorsque l'autophagie est induite, faisant ainsi de ATG8 un

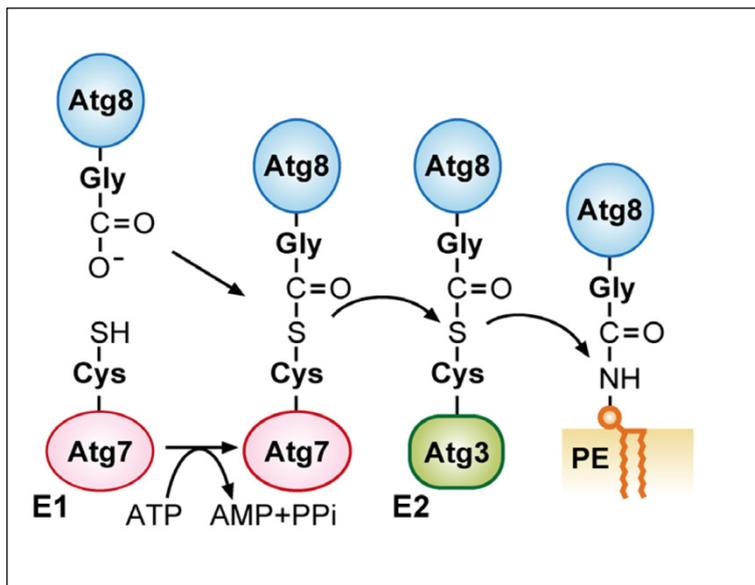


Figure 51 : Système de conjugaison d'Atg8

Après avoir été clivé en C-term, par Atg4, Atg8 se lie avec Atg7 qui joue le rôle d'une enzyme d'activation (E1). Atg8 va ensuite être transférée sur Atg3, qui joue le rôle de l'enzyme de conjugaison (E2). Enfin Atg8 va être transférée au niveau de la membrane de l'autophagosome en liant de manière covalente la PE.

(Sakoh-Nakatogawa et al., 2013)

excellent marqueur de la voie autophagique. Le fait que cette interaction soit covalente, va permettre de suivre les autophagosomes depuis leur formation jusqu'à leur dégradation dans la vacuole (Kirisako, Baba et al. 1999). La perturbation du recrutement de ATG8 au niveau du PAS et à la membrane de l'autophagosome, perturbe considérablement la formation de l'autophagosome, ce qui met en évidence le rôle essentiel de ATG8 dans ce processus (Huang, Scott et al. 2000).

ATG8 ne peut participer, dans son état natif, à la formation de l'autophagosome. ATG8 doit en effet être modifiée par ATG4, une cystéine protéase, qui va cliver l'arginine présente au niveau de son extrémité C-terminale, exposant ainsi un résidu glycine (Kirisako, Ichimura et al. 2000). Une fois clivée, ATG8 va être activée par ATG7, qui fonctionne comme une E1 (enzyme d'activation), puis va être liée à ATG3, jouant le rôle de l'enzyme de conjugaison E2. La dernière étape de ce processus semblable à celui de l'ubiquitination, va permettre l'interaction covalente entre ATG8 et la phosphatidyléthanolamine (PE), qui est un phospholipide abondant au sein des membranes (Ichimura, Kirisako et al. 2000) (Fig. 51). Une fois lipidée, ATG8 peut cependant être séparée de la PE, par clivage, effectué de nouveau par ATG4 (Kirisako, Ichimura et al. 2000). ATG4 joue un rôle essentiel pour l'autophagie, car elle permet le recrutement de ATG8 lors de la formation de l'autophagosome, mais aussi sa délipidation, une fois l'autophagosome formé. De plus ATG4 permet aussi de retirer les protéines ATG8 qui auraient été lipidées de manière accidentelle sur d'autres membranes, permettant ainsi de maintenir un maximum de protéines ATG8 disponibles pour participer à la formation de nouveaux autophagosomes (Nakatogawa, Ishii et al. 2012).

Ohsumi et ses collègues, ont mis en évidence *via* des approches *in vitro* que, une fois lipidée à la PE, ATG8 avait la possibilité de provoquer l'agrégation de liposomes en formant des multimères (Nakatogawa, Ichimura et al. 2007). En plus de permettre l'attachement de plusieurs vésicules entre elles, ATG8 favorise également leur fusion, par hémifusion (Nakatogawa, Ichimura et al. 2007). Depuis, ce dernier point est parfois remis en question (Nair, Jotwani et al. 2011) (Romanov, Walczak et al. 2012), notamment à cause de la concentration non physiologique de PE utilisée dans ces expériences. Ces résultats montrent cependant que ATG8, contrairement aux autres protéines "ubiquitin-like", qui constituent souvent des modifications post-traductionnelles, a la capacité d'agir de manière directe avec les membranes. Il a été montré que la quantité de ATG8 présente dans la cellule, n'influe pas

Figure 52 : Arbre phylogénétique des protéines Atg8 humaines, de *S. cerevisiae*, et de *Arabidopsis thaliana*

Alignements effectués en utilisant la méthode des plus proches voisins. L'arbre est enraciné grâce à la séquence de ScAtg8. Les nombres affichés présentent le nombre d'évènements où le nœud est présent sur 1000 itérations de simulation.
(Adapté de Sláviková *et al.*, 2005)

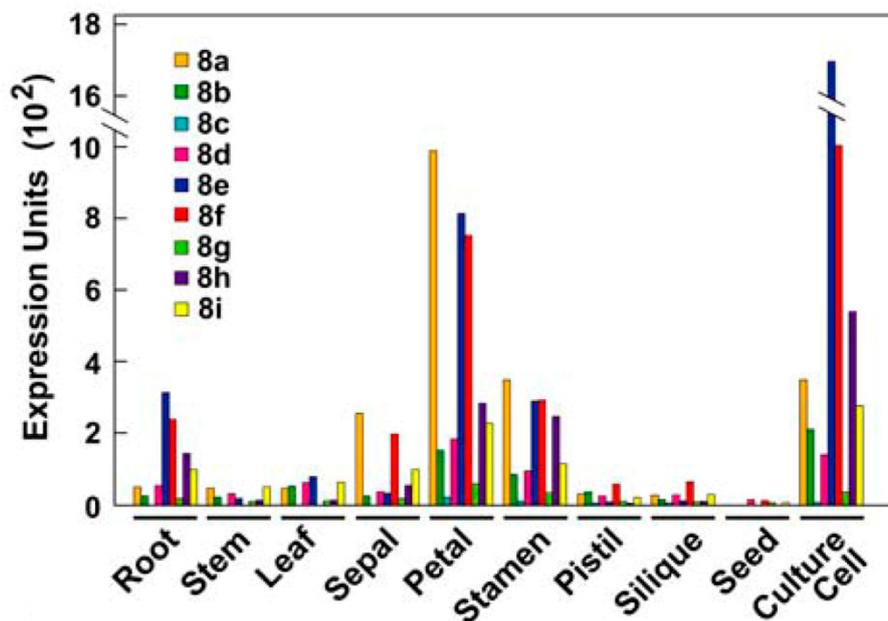
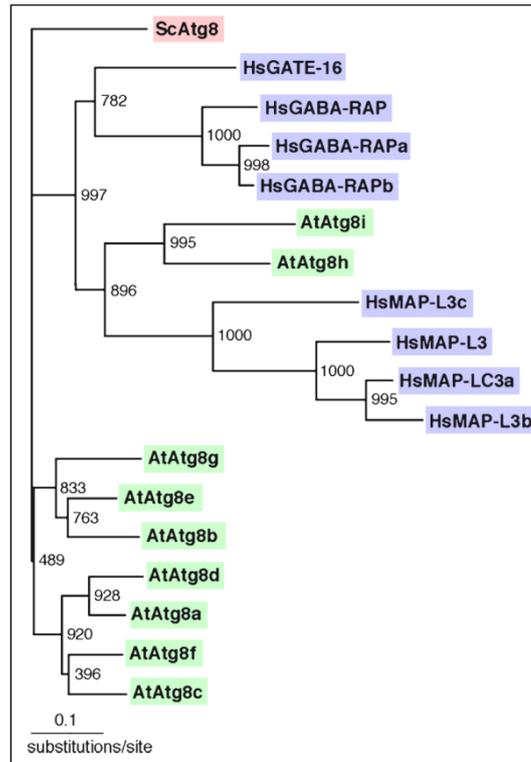


Figure 53 : Niveau d'expression des différentes isoformes de AtATG8
Résultats de puce à ADN, exprimant les niveaux d'expression des 9 isoformes de AtATG8 en fonction de différents tissus.
(Thompson *et al.*, 2005)

sur le nombre d'autophagosomes formés, cependant la taille de ces derniers en est fortement dépendante (Xie, Nair et al. 2008). Ces résultats suggèrent donc que ATG8 contrôle la phase d'expansion du phagophore, probablement grâce à ses capacités à lier des vésicules afin de permettre leur fusion.

ATG8 joue également un rôle important dans les formes d'autophagie sélective, puisqu'il assure le lien entre le cargo et l'autophagosome. En effet *via* de nombreux adaptateurs comme Atg19, Atg32, ou p62 et NBR1 chez les mammifères, ATG8 va permettre le recrutement au niveau de l'autophagosome de protéines spécifiques, d'organites, ou de cargos ubiquitinés (Schreiber and Peter 2013).

Chez les mammifères, on a pu identifier, par homologie de séquence, au moins deux grandes familles de protéines potentiellement homologues à Atg8 : la famille des LC3 et la famille GABARAP/GATE16 (Shpilka, Weidberg et al. 2011). Les différents homologues présents au sein de ces deux familles, possèdent un résidu glycine conservé dans la région C-terminale, correspondant au site de lipodation à la PE chez ATG8, et ont également la capacité de se lier aux membranes sous leur forme lipidée (Kabeya, Mizushima et al. 2004). Ces deux familles sont également essentielles pour la voie autophagique et sont requises pour permettre la formation de l'autophagosome (Weidberg, Shpilka et al. 2011). Cependant il semblerait que ces familles n'agissent pas aux mêmes étapes. En effet, les membres de la famille LC3 sont impliqués dans l'élongation de la membrane du phagophore, alors que les membres de la famille GABARAP/GATE16 participent aux étapes plus tardives de la formation de l'autophagosome, notamment la fermeture de la structure (Weidberg, Shvets et al. 2010).

Chez *Arabidopsis thaliana*; il existe 9 homologues de Atg8 (ATG8a – ATG8i) (Sláviková, Shy et al. 2005) (Fig. 52). Comme chez la levure on retrouve le système de conjugaison permettant de lier ATG8 à la membrane des autophagosomes (Yoshimoto, Hanaoka et al. 2004). Le rôle exact de ces différents homologues n'est pour l'instant pas connu, cependant leurs niveaux d'expression varient en fonction des tissus et des organes, suggérant que ces différentes isoformes permettent une adaptation de la voie autophagique en fonction du tissu (Thompson, Doelling et al. 2005) (Fig. 53).

Figure 54 : Système de conjugaison de Atg12

Atg12 est tout d'abord activée par sa liaison avec Atg7 (E1). Ensuite elle est transférée sur Atg10 qui joue le rôle de l'enzyme de conjugaison (E2) puis est liée de manière covalente sur Atg5.

(Sakoh-Nakatogawa et al., 2013)

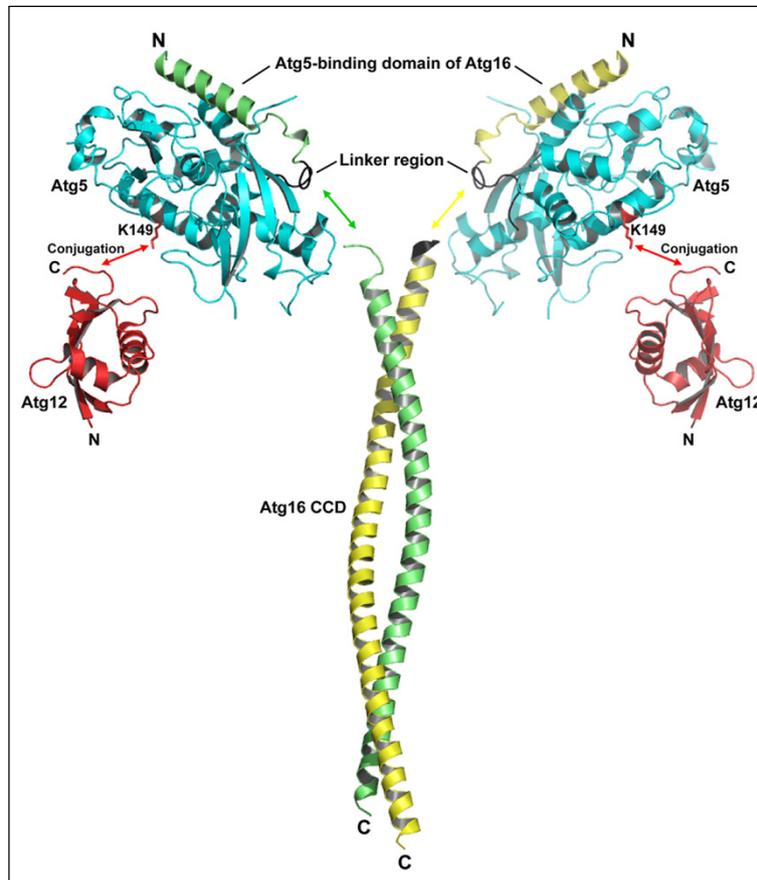
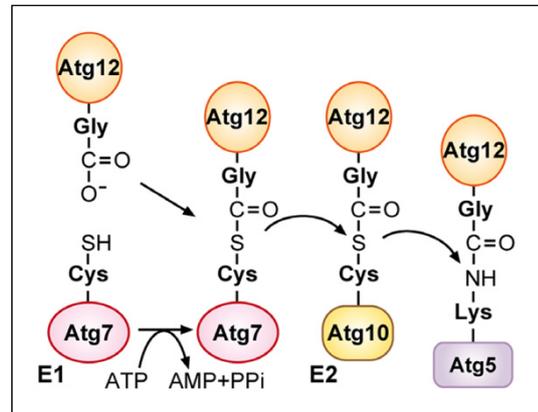


Figure 55 : Structure du complexe Atg12-Atg5-Atg16

Le complexe est très probablement présent sous forme d'un dimère, comprenant deux exemplaires de chaque membre du complexe. Ce dimère est rendu possible par l'oligomérisation au niveau des régions "coiled-coil" de Atg16.

(Fujioka et al., 2010)

2.5.2. Le complexe ATG12-ATG5-ATG16 : le recruteur

La formation du complexe Atg12-Atg5-Atg16, est une étape essentielle car en l'absence de ce complexe, la formation d'autophagosomes est très fortement perturbée (Kuma, Mizushima et al. 2002).

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, la formation de ce complexe débute par l'activation de Atg12 par Atg7, qui joue le rôle de l'enzyme d'activation E1, comme pour Atg8. Une fois activée, Atg12 va être transférée sur Atg10 qui joue le rôle de l'enzyme de conjugaison E2, puis fixée de manière covalente à sa cible Atg5 (Mizushima, Noda et al. 1998) (Fig. 54). La liaison avec Atg12 s'effectue au milieu de la protéine Atg5 (au niveau de la Lys149) et est irréversible. Atg5 a la capacité d'interagir de manière non covalente avec une petite protéine de type "coiled-coil" : Atg16. L'interaction avec Atg5 se fait grâce à la partie N-terminale de Atg16, alors que le domaine "coiled-coil" présent au niveau de la partie C-terminale est responsable de la capacité de cette protéine à s'oligomériser (Mizushima, Noda et al. 1999). La structure proposée de ce complexe est composée d'un dimère de Atg16 lié à deux exemplaires du complexe Atg12-Atg5 (Fujioka, Noda et al. 2010) (Fig. 55). Ce complexe se trouve localisé au niveau du PAS et cette localisation, dépendante de Atg16, suggère que ce complexe joue un rôle dans les étapes de la formation de l'autophagosome (Suzuki, Kirisako et al. 2001).

Ce complexe s'avère être conservé chez les mammifères, de même que le mécanisme de conjugaison (Mizushima, Sugita et al. 1998) (Mizushima, Kuma et al. 2003). Comme chez la levure, le rôle de ce complexe est déterminant pour former des autophagosomes. Chez les mammifères, le complexe ATG12-ATG5-ATG16L est présent dans le cytoplasme et se retrouve recruté au niveau des membranes d'isolement lors de l'induction de l'autophagie (Mizushima, Yamamoto et al. 2001). De manière étonnante, les études en microscopie électronique en transmission, on mis en évidence que ce complexe est majoritairement présent au niveau de la membrane externe du phagophore et s'en détache lorsque l'autophagosome est complètement formé (Mizushima, Yamamoto et al. 2001). La présence du complexe ATG12-ATG5-ATG16L sur la face convexe de la membrane d'isolement, a parfois poussé certains auteurs à comparer ce complexe aux protéines de manteau impliquées dans la formation de nombreuses vésicules dans la cellule. Cependant aucun domaine permettant de générer ou ayant une affinité avec une courbure membranaire, n'a pour l'instant été identifié chez les

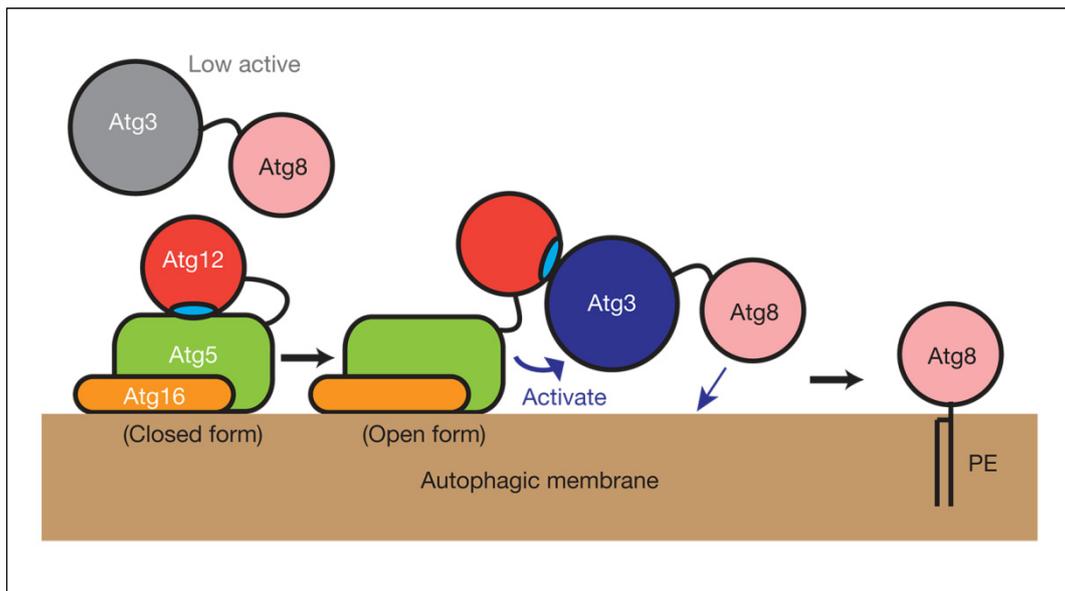


Figure 56 : Modèle de l'action du complexe Atg5-Atg12-Atg16 sur la lipodation d'Atg8 au niveau de la membrane de l'autophagosome

Le complexe Atg5-Atg12-Atg16 est recruté au niveau de la membrane de l'autophagosome grâce à Atg16. Il est présent dans une forme fermée, probablement pour des raisons de stabilité, puis acquiert une conformation ouverte en présence du composé Atg3-Atg8. Une fois le complexe ouvert, Atg12 va pouvoir interagir avec Atg3 et ainsi favoriser la lipodation de Atg8 à la phosphatidyléthanolamine.

(Noda et al., 2013)

différentes protéines qui forment ce complexe. De plus, le complexe ATG12-ATG5-ATG16L ne possède pas de forme intrinsèque propice à cette tâche (Fujioka, Noda et al. 2010). Enfin une étude basée sur l'analyse quantitative de la stoechiométrie des protéines Atg par microscopie chez la levure, a mis en évidence que la faible quantité de protéines du complexe Atg12-Atg5-Atg16 présent au niveau du PAS ne serait pas suffisante pour recouvrir l'autophagosome (Geng, Baba et al. 2008).

Le rôle de ce complexe a été mis en évidence chez les mammifères, en dirigeant de manière ectopique le complexe ATG12-ATG5-ATG16L à la membrane plasmique (Fujita, Itoh et al. 2008). Les résultats de cette expérience montrent que dans ces conditions, LC3 se retrouve lipidée au niveau de la membrane plasmique, suggérant que le complexe ATG12-ATG5-ATG16L permet de désigner le site d'ancrage de LC3 : le phagophore / la membrane d'isolement. Ce résultat est cohérent avec le fait qu'il a été montré chez la levure, que le complexe Atg12-Atg5-Atg16, fonctionne comme une E3 ligase et permet la lipodation de Atg8 à la phosphatidyléthanolamine (PE) (Hanada, Noda et al. 2007) (Sakoh-Nakatogawa, Matoba et al. 2013) (Noda, Fujioka et al. 2013) (Fig. 56).

Bien que l'implication du complexe Atg12-Atg5-Atg16, dans les étapes permettant l'élongation de la membrane d'isolement jusqu'à la formation de l'autophagosome, *via* la lipodation d'Atg8 sur la membrane du phagophore, soit aujourd'hui largement acceptée, les processus impliqués dans le recrutement de ce complexe au niveau du phagophore, sont encore majoritairement méconnus.

Une étude *in vitro* utilisant les protéines Atg purifiées de levure et des liposomes, a permis d'apporter de nombreuses pistes afin d'expliquer le recrutement de ce complexe à la membrane (Romanov, Walczak et al. 2012). Les auteurs ont montré que Atg5 possède intrinsèquement une aptitude à se lier aux membranes, cependant celle-ci est perdue lors de la formation du complexe Atg12-Atg5. Le recrutement de Atg16 va permettre au complexe de retrouver son aptitude à se lier aux membranes. De manière intéressante, les auteurs ont également montré que la présence de PtdIns(3)P au niveau de la membrane augmentait fortement le recrutement du complexe. Ainsi la forte concentration de PtdIns(3)P, présente au niveau de l'omégasome grâce à l'action du complexe PI3-K, permettrait de recruter le complexe Atg12-Atg5-Atg16 au niveau de la membrane d'isolement. Une fois conjuguée, Atg8 se retrouve liée à Atg3 (enzyme de conjugaison E2). Or le complexe Atg12-Atg5-Atg16

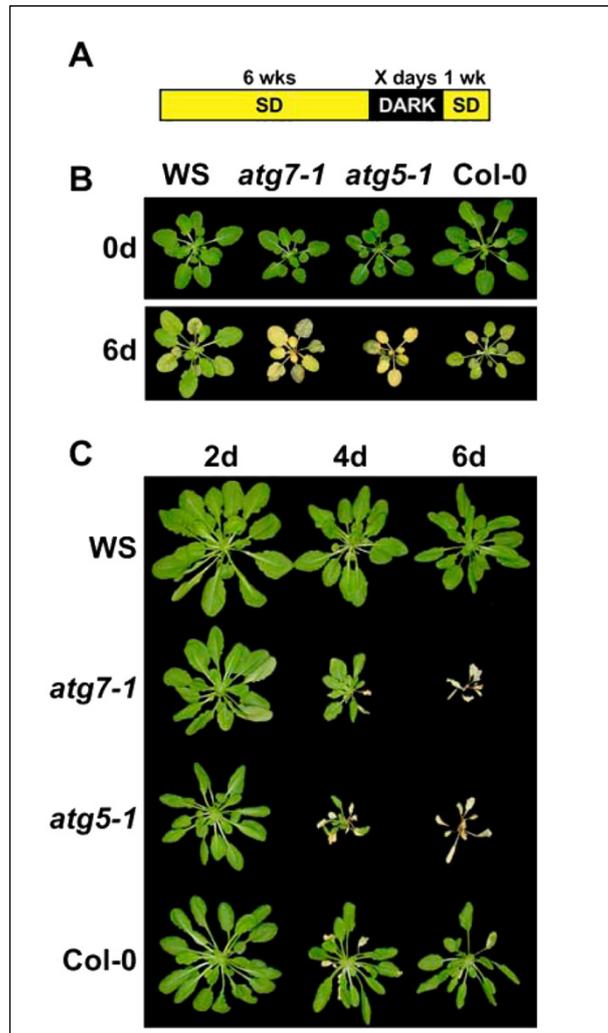


Figure 57 : Sensibilité accrue des mutant *atg7-1* et *atg5-1* à la carence en carbone

(A) Protocole : des plantes de 6 semaines sont placées une durée variable "X" à l'obscurité pour produire une carence carbonée, puis remises une semaine à la lumière. (B) Etude de différents génotypes sauvages (WS, Col-0) ou mutants, lorsque X=0 ou 6 jours. (C) Influence de la durée de la période de carence : X= 2, 4, et 6 jours.

(Thompson *et al.*, 2005)

possède également la capacité de se lier avec Atg3 (via une interaction directe avec Atg12). Ainsi, une fois recruté au niveau de la membrane d'isolement, le complexe Atg12-Atg5-Atg16, va permettre de recruter Atg3 et provoquer la lipodation d'Atg8 à la PE présente sur la membrane du phagophore.

Les interactions entre protéines ou avec les membranes, peuvent être fortement modifiées en fonction de la concentration des différents acteurs présents ainsi que de la composition du milieu où se déroulent ces réactions. C'est pourquoi, bien que très intéressants, ces résultats *in vitro* doivent être considérés avec précaution. Cependant il existe dorénavant un faisceau de preuves convergentes, tendant à identifier le complexe Atg12-Atg5-Atg16 comme le responsable de la lipodation de Atg8 au niveau du phagophore.

Chez *Arabidopsis thaliana*, les homologues de ce complexe ainsi que du système de conjugaison ont été identifiés (Fujioka, Noda et al. 2008). Des études *in vitro* puis *in vivo* ont permis de montrer que le système de conjugaison comprenant ATG12, ATG7, ATG10 et ATG5 fonctionne d'une manière semblable aux autres modèles précédemment étudiés (Phillips, Suttangkakul et al. 2008). Le rôle de ce complexe semble également conservé puisque la mutation d'une seule de ces protéines, provoque un blocage de la voie autophagique ainsi qu'un phénotype de sénescence précoce et une hypersensibilité à la carence nutritionnelle (Doelling, Walker et al. 2002) (Thompson, Doelling et al. 2005) (Phillips, Suttangkakul et al. 2008) (Fig. 57). Cependant, il est intéressant de noter que chez *Arabidopsis*, aucun homologue de Atg16, n'a pour le moment été identifié.

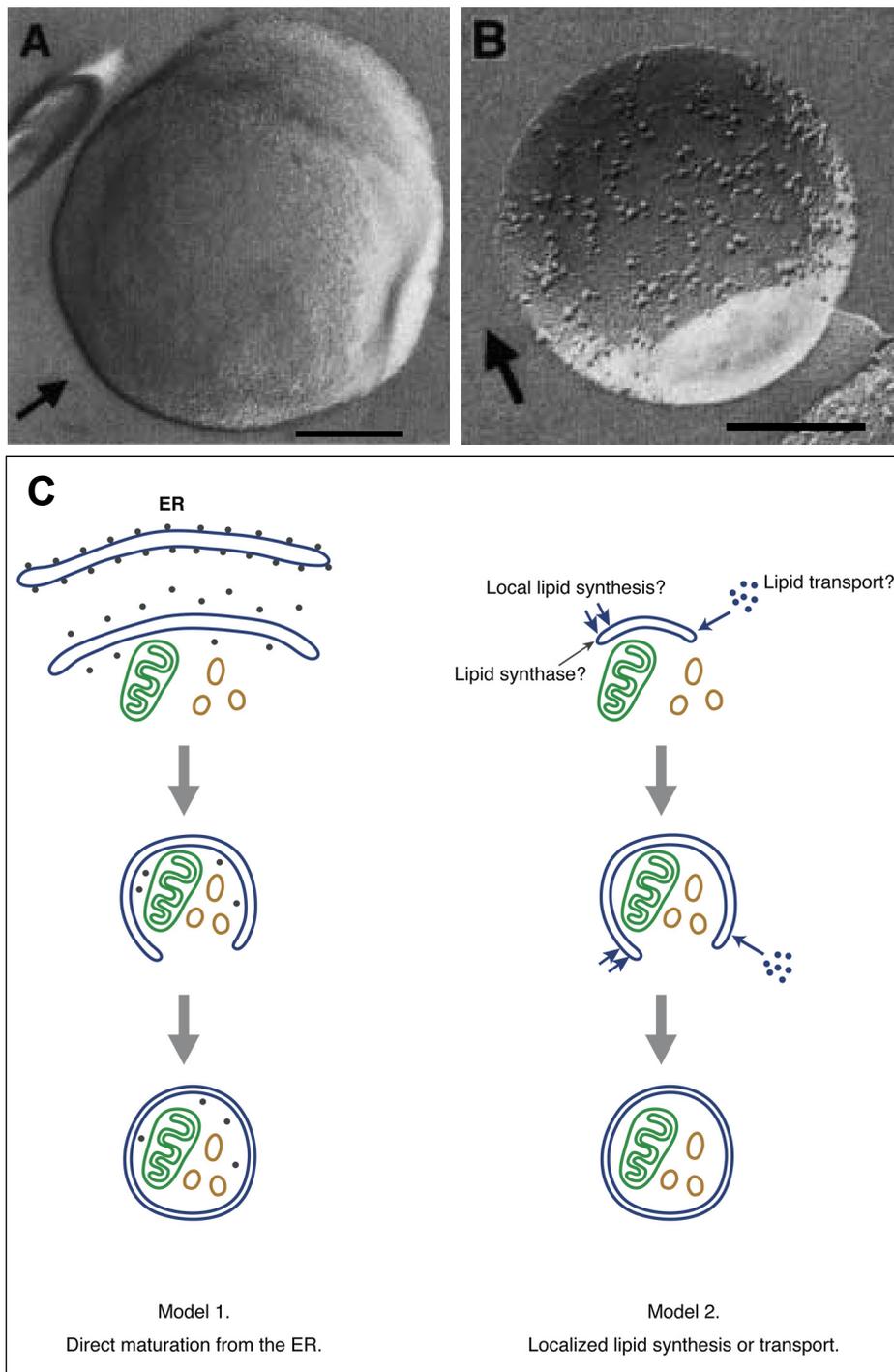


Figure 58 : Etude de l'origine de la membrane de l'autophagosome

(A) Les autophagosomes isolés à partir d'hépatocytes de rats puis observés par cryofracture, présentent très peu de protéines membranaires intrinsèques en comparaison avec un lysosome **(B)**. Echelle : 250 nm. (*Fengsrud et al., 2000*)

(C) Schéma présentant deux modèles de formation des autophagosomes. (*Hayashi-Nishido et al., 2009*)

3. Origine de l'autophagosome

Malgré la constante découverte de nouveaux acteurs participant aux différentes étapes de biogénèse de l'autophagosome, la compréhension globale des mécanismes de formation de cette structure sont encore matière à débat. L'origine de la membrane de l'autophagosome ainsi que l'identification du lieu de sa formation, font partie de ces questions qui depuis la découverte de ces structures restent sans réponse.

Grace à l'isolation d'autophagosomes, des études ont été menées afin d'en définir les propriétés membranaires. Les approches par cryofracture sur des autophagosomes provenant d'hépatocytes de rat, ont permis de montrer que contrairement aux membranes endosomales ou mitochondriales, la membrane de l'autophagosome est très faiblement pourvue en protéines membranaires (environ 100 fois moins) (Baba, Osumi et al. 1995) (Fengsrud, Erichsen et al. 2000) (Fig. 58A, 58B). De plus, les études de MET, ont mis en évidence que la membrane de l'autophagosome est une membrane fine (6-7 nm), comparable à celle du RE, du cis-Golgi, de l'enveloppe nucléaire ou des enveloppes mitochondriales (Juhasz and Neufeld 2006), alors que la membrane plasmique, celle des lysosomes et la majorité des membranes golgiennes sont plus épaisses (9-10 nm). Enfin des études de protéomique n'ont mis en évidence que des protéines périphériques, ne permettant pas de dégager une signature particulière afin d'identifier un hypothétique donneur de membrane (Øverbye, Seglen et al. 2007). L'ensemble de ces données laissent donc penser que la membrane de l'autophagosome possède une composition unique impliquant soit une formation *de-novo* soit d'importants remaniements d'une membrane préexistante (Fig. 58C).

Afin d'identifier l'origine de la membrane de l'autophagosome, les études se sont également penchées sur l'identification du site de formation de l'autophagosome. En effet la grande majorité des protéines impliquées dans la biogénèse de l'autophagosome, sont des protéines cytosoliques, qui au moment de sa formation, vont être recrutées au niveau de membranes (Xie and Klionsky 2007). Au vu des récentes publications traitant de cette question, plusieurs hypothèses s'opposent sur l'identification du site de formation de l'autophagosome (Rubinsztein, Shpilka et al. 2012).

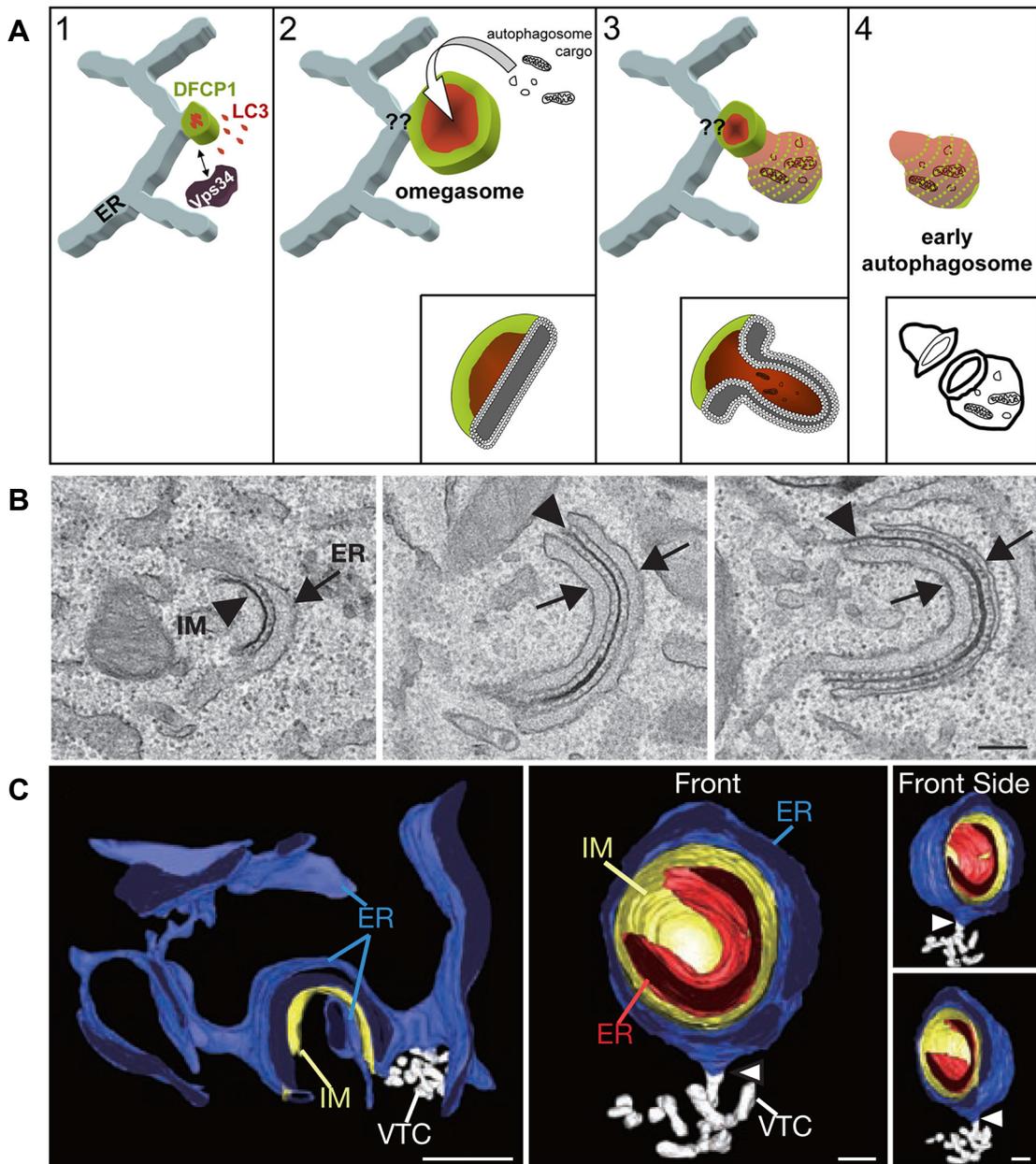


Figure 59: Implication du réticulum dans la formation de l'autophagosome

(A) L'omégasome est une structure riche en PI3P, marquée par DFCP1, très proche du RE, au niveau de laquelle vont être recrutées les protéines liées à la formation de l'autophagosome. L'omégasome semble être une région où se forment des autophagosomes. (*Axe et al., 2008*) (B) Dans des cellules de mammifère surexprimant un forme non fonctionnelle de Atg4, bloquant la formation d'autophagosomes, la membrane d'isolement (IM) en cours de formation est observée au milieu de deux citernes de réticulum endoplasmique. Echelle : 200 nm. (C) La tomographie confirme la présence de réticulum de part et d'autre de la membrane d'isolement et révèle également une connexion entre cette membrane d'isolement et le RE. Echelle : 100 nm. (*Hayashi-Nishido et al., 2009*)

3.1. Implication du réticulum endoplasmique

Le réticulum, parfois considéré comme "mère de toutes les membranes " (Robinson 2006), est le candidat le plus probable, permettant d'expliquer l'origine de l'autophagosome. La découverte en 2008, de DFCP1 et de sa localisation sur le RE mais également à proximité de structures marquées par LC3 au niveau de l'omégasome (Axe, Walker et al. 2008), permit d'identifier cette région du réticulum, qui constitue probablement une plateforme permettant la formation des autophagosomes (Fig. 59A). En 2009, Hayashi-Nishino *et al.*, mirent en évidence que dans les cellules en culture de mammifère, la membrane d'isolement se forme à proximité du RE (Hayashi-Nishino, Fujita et al. 2009). En effet dans cette étude, la membrane d'isolement, marquée par Atg16L, est très fréquemment retrouvée au cœur d'un "sandwich" formé par le RE, formant un complexe marqué par DFCP1, correspondant très probablement à l'omégasome décrit par l'équipe de Ktistakis (Fig.59B). Ces études ont également montré par tomographie électronique (Fig. 59C) que le réticulum endoplasmique forme au niveau de l'omégasome une structure courbe, entourant la membrane d'isolement, mais également que la membrane d'isolement est directement connectée à cette structure du réticulum (Hayashi-Nishino, Fujita et al. 2009) (Ylä-Anttila, Vihinen et al. 2009). Ces données semblent indiquer que la membrane de l'autophagosome provient du réticulum, cependant le fait que cette membrane soit dépourvue de protéines présentes à la membrane du RE (Yamamoto, Masaki et al. 1990) (Hayashi-Nishino, Fujita et al. 2009), suggère l'existence de phénomènes de modification membranaire, ou la possibilité de l'existence d'autres sources de membranes. L'importance du RE lors de la formation de l'autophagosome a été de nouveau démontrée avec les études sur Atg14L, un des composants du complexe PI3-K. En effet Atg14L est présent au niveau de la membrane du RE et cette localisation est essentielle pour la formation de l'autophagosome car en absence de Atg14L au niveau de la membrane du RE l'omégasome ne peut pas se former, ce qui provoque un blocage complet de la formation des autophagosomes (Matsunaga, Morita et al. 2010). L'ensemble de ces résultats montre que le réticulum est intimement connecté au processus de formation des autophagosomes, cependant, au jour d'aujourd'hui, on ne peut pas affirmer que le réticulum soit l'unique source de membrane, ni que tous les autophagosomes se forment au niveau du réticulum.

3.2. Contribution de la membrane externe des mitochondries ?

En 2010, Hailey et al. ont identifié la membrane externe de la mitochondrie comme possible source de membrane. En utilisant la séquence responsable de l'ancrage du cytochrome b5 à la membrane externe de la mitochondrie, les auteurs ont mis en évidence que ce marqueur mitochondrial colocalisait avec le marqueur autophagosomal, LC3, en conditions de carence nutritionnelle (Hailey, Rambold et al. 2010). Ce phénomène traduit bien un échange de membrane entre la mitochondrie et l'autophagosome et non de la mitophagie, puisque des marqueurs de la membrane interne ou du lumen de la mitochondrie ne sont pas présents au niveau de ces structures. Des autophagosomes en croissance ont également été observés au niveau de la membrane externe de la mitochondrie, indiquant que la formation de certains autophagosomes semble également possible à cet endroit (Hailey, Rambold et al. 2010) (Fig. 60A). Selon les auteurs ce résultat pourrait s'expliquer par le fait que les mitochondries sont, avec le RE, les principales productrices de PE qui est un phospholipide essentiel pour la formation de l'autophagosome.

3.3. Les sites de contact RE-mitochondries

Le récent papier de Hamasaki et al. (2013), réconcilie ces deux hypothèses en démontrant que la formation d'autophagosomes a lieu au niveau des points de contact entre le RE et les mitochondries (MAM). Lors de l'induction de l'autophagie par une carence nutritionnelle, on observe un recrutement de ATG14, de DFCP1 et de ATG5 au niveau des MAM (Hamasaki, Furuta et al. 2013). Comme précédemment, le recrutement de ATG14 au niveau de ces régions précises du RE est essentiel à la formation de l'autophagosome. Il en est de même pour l'interaction entre les mitochondries et le réticulum, suggérant que non seulement, le RE est une plateforme où se forme l'autophagosome, mais également que les échanges possibles avec la mitochondrie (comme la PE) sont essentiels à ce processus.

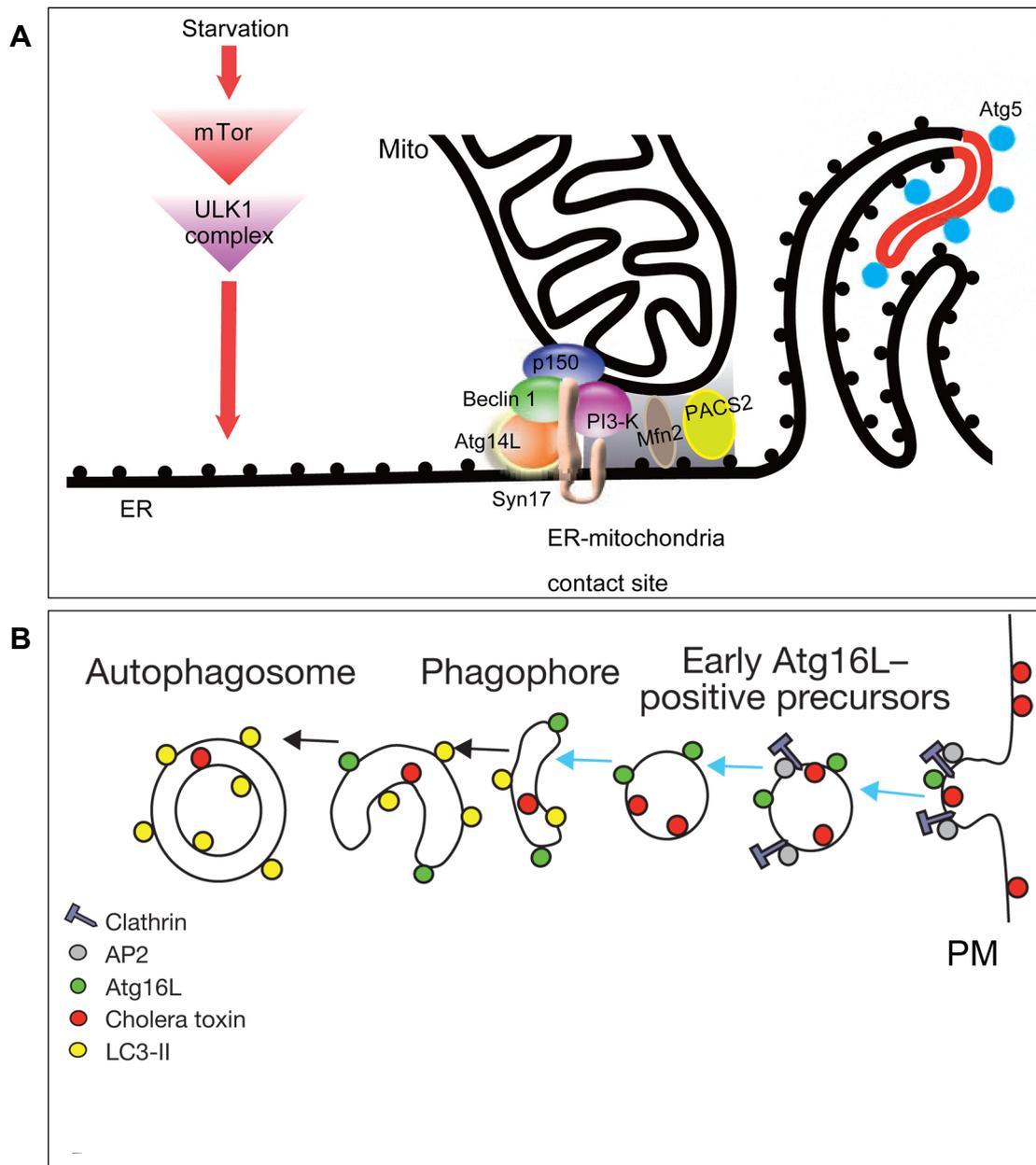


Figure 60 : Mise en évidence de l'implication des mitochondries et de la membrane plasmique dans la formation de l'autophagosome chez les mammifères
(A) Formation de l'autophagosome au niveau de sites de contacts entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique. (*Hayashi-Nishido et al., 2009*) **(B)** Mise en évidence de l'implication de la membrane plasmique (PM) dans la formation des autophagosomes chez les mammifères. (*Adapté de Ravikumar et al., 2010*)

3.4. Participation de la membrane plasmique ?

Les travaux de Rubinsztein suggèrent que la membrane plasmique participe également à la formation de l'autophagosome, et plus précisément à la formation des structures pré-autophagosomales (Ravikumar, Moreau et al. 2010). En effet, Atg16L, qui comme nous l'avons vu, permet, avec ATG12 et ATG5 la lipitation d'ATG8 au niveau des structures pré-autophagosomales, est observée au niveau de la membrane plasmique et il a également été montré qu'elle interagit avec la chaîne lourde de la clathrine. La formation des vésicules à clathrine lors de l'endocytose semble être une étape essentielle à la formation de vésicules marquées par Atg16L. N'étant pas marquées par LC3, on peut associer ces vésicules à des structures pré-autophagiques. Par la suite, ces vésicules vont participer à la formation de l'autophagosome (Fig. 60B). Les auteurs suggèrent donc que la membrane plasmique permet la formation de structures précédant la formation du phagophore, et que la fusion de ces structures va permettre la formation de l'autophagosome (Ravikumar, Moreau et al. 2010). De nouveau, ces travaux proposent un nouveau candidat pouvant fournir de la membrane lors de la formation de l'autophagosome chez les mammifères.

3.5. Implication des vésicules ATG9 ?

Nous avons vu précédemment que ATG9, de par sa caractéristique de protéine membranaire et de sa dynamique intercompartiments, était un candidat idéal pour assurer le rôle de fournisseur de membranes permettant la formation de l'autophagosome (Reggiori, Tucker et al. 2004). (Fig. 49). Certaines SNAREs et autres complexes (Ypt1, TRAP III, Atg1/Atg13), ont d'ailleurs été identifiés comme étant impliqués dans les mécanismes permettant à ATG9 de cycler, et jouent probablement un rôle important dans les étapes de fusion de vésicules permettant de former le phagophore (Nair, Jotwani et al. 2011) (Lynch-Day, Bhandari et al. 2010) (Ragusa, Stanley et al. 2012). Il a été cependant démontré chez *Saccharomyces cerevisiae* que les vésicules Atg9 n'apportent qu'une faible partie de la membrane nécessaire à la formation de l'autophagosome (Yamamoto, Kakuta et al. 2012). Ces résultats suggèrent donc que chez la levure, la formation du phagophore est initiée par la

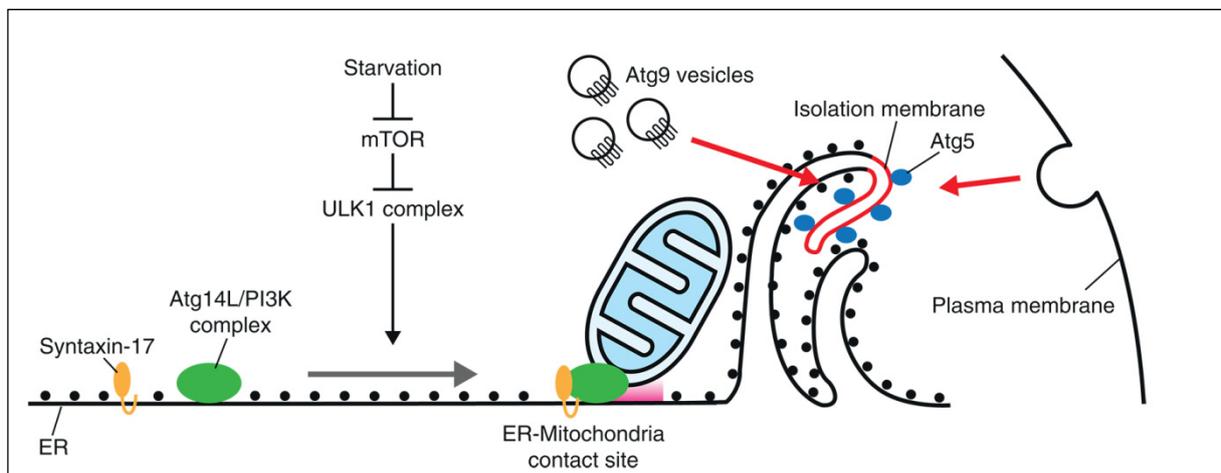


Figure 61: Principaux acteurs mis en évidence dans la formation de l'autophagosome

Représentation de la genèse de la membrane d'isolement au niveau de l'omégasome situé au niveau des sites de contact entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries. Les vésicules Atg9 ainsi que la membrane plasmique participent également à la formation de l'autophagosome.

(Hamasaki et al., 2013b)

fusion de vésicules Atg9, provenant du Golgi, cependant, d'autres sources de membranes sont également nécessaires afin de permettre la formation complète de l'autophagosome.

L'ensemble de ces résultats montre clairement que la question de l'origine des membranes permettant la formation de l'autophagosome est encore loin d'être parfaitement comprise. Il se pourrait que la formation de l'autophagosome soit un processus complexe, faisant simultanément appel à différentes sources de membranes (Hamasaki, Shibutani et al. 2013) (Fig. 61). Il se pourrait également que la formation de l'autophagosome, ainsi que la source de la membrane qui le compose soient fortement influencées en fonction du modèle d'étude, du type cellulaire ainsi que par la condition d'induction de l'autophagie.

OBJECTIF ET STRATEGIE DE LA THESE

Notre revue bibliographique révèle une explosion de données sur l'autophagie ces dernières années, et, par contraste, la pauvreté des connaissances sur les relations entre voies autophagiques et voies de trafic intracellulaires. On peut également noter que la progression des connaissances n'est pas égale entre les trois règnes : le modèle levure est un modèle de choix largement utilisé pour l'étude des partenaires moléculaires ; le modèle animal est aujourd'hui beaucoup mis en avant dans des recherches tant fondamentales qu'appliquées pour une analyse fonctionnelle de l'autophagie. Le modèle végétal reste encore timide dans sa lisibilité pour sa contribution à la compréhension de l'autophagie chez les eucaryotes.

L'un des défis d'aujourd'hui, entre autres questions soulevées par ces études sur l'autophagie, est probablement d'intégrer dans un modèle cellulaire la pléthore d'acteurs moléculaires identifiés et associés à ce processus. La localisation exacte des événements moléculaires couramment proposés et leur intégration dans le tissu membranaire de la cellule restent en effet à cartographier.

La genèse des autophagosomes et la régulation éventuelle de leur forme ou de leur taille en fonction d'une cible donnée restent des questions majeures à explorer. L'hypothèse d'une contribution des compartiments endomembranaires dans ces événements est envisagée mais peu de données permettent vraiment d'appréhender le dialogue entre les voies de trafic intracellulaires et la voie autophagique. Une meilleure compréhension des mécanismes liés à la biologie des autophagosomes pourrait pourtant modifier profondément la connaissance que l'on a aujourd'hui de la compartimentation subcellulaire.

Cette analyse nous conforte dans l'idée que l'étude de la formation de l'autophagosome trouve sa place dans un axe de recherche plus général sur la morphogenèse des compartiments subcellulaires. Nous sommes de plus convaincus que la capacité d'étudier l'autophagie dans un organe entier font du modèle végétal un modèle d'étude adapté pour contribuer à la compréhension de la formation des autophagosomes, et plus généralement aux discussions sur la spécificité des processus autophagiques.

1. Objectif de la thèse.

L'objectif de cette thèse est de contribuer à l'effort de recherche sur ces questions en étudiant les mécanismes en jeu dans la formation de l'autophagosome dans la cellule végétale.

2. Stratégie de la thèse.

L'étude de l'autophagie chez les plantes commence son essor. Elle a débuté, comme chez les autres modèles, par des approches morphologiques en microscopie électronique en transmission (Matile 1975). Puis l'utilisation de sondes sensibles au pH, comme le rouge neutre, le lysotracker, la quinacrine ou la monodensylcadaverine (MDC), a contribué à la formulation d'hypothèses sur l'existence de processus autophagiques chez les plantes (Moriyasu and Ohsumi 1996) (Contento, Xiong et al. 2005). Mais c'est essentiellement l'utilisation de mutants d'autophagie qui a récemment permis de préciser les fonctions de l'autophagie chez les plantes (Guiboileau, Avila-Ospina et al. 2013). L'utilisation de mutants combinée avec des approches de biologie et d'imagerie cellulaires devrait permettre de disséquer les mécanismes mis en œuvre par la cellule végétale pour former un autophagosome.

Nous avons choisi de porter une attention particulière à la dynamique cellulaire de protéines comme ATG8, le marqueur universel des autophagosomes, ATG5 qui marque les événements de la formation de l'autophagosome et ATG9, que beaucoup considèrent comme le "pourvoyeur" éventuel de membranes permettant la genèse de cet autophagosome.

La première étape de notre stratégie a été de développer les outils nécessaires pour aborder les spécificités de notre étude. L'établissement d'un cadre expérimental rigoureux a constitué une partie importante du temps imparti pour ce travail de thèse : choix du modèle biologique, conditions d'observations et de manipulation des flux autophagiques, l'identification de marqueurs fiables pour suivre ces processus et caractérisation de sa cinétique (Chapitre I de la section Résultats).

Dans un deuxième temps, nous avons étudié la dynamique cellulaire de ATG5 et ATG9 ainsi que leur implication dans la genèse de l'autophagosome, et leurs interactions potentielles avec le système endomembranaire (Chapitre II & III de la section Résultats).

Les données issues de ces études devraient nous conduire à proposer un modèle de formation de l'autophagosome dans la cellule végétale.

RESULTATS

**Chapitre I. CARACTERISATION DE L'AUTOPHAGIE
INDUITE PAR CARENCE NUTRITIONNELLE**

Rappel du contexte de l'étude

De nombreux travaux se sont intéressés au rôle de l'autophagie chez les plantes et son implication dans de nombreux phénomènes physiologiques (remobilisation des nutriments, mécanismes de défense) (Guiboileau, Yoshimoto et al. 2012) (Yoshimoto, Jikumaru et al. 2009), cependant, peu de choses sont connues d'un point de vue cellulaire concernant les autophagosomes ainsi que les étapes de leur formation. De plus, les conditions d'expérimentation sont très variables d'un laboratoire à l'autre, biaisant l'interprétation générale qui pourrait être faite de ces résultats et créant des controverses.

Il nous a donc semblé essentiel de définir un protocole fiable et rapide pour l'identification et le suivi du processus autophagique et de la formation des autophagosomes dans la cellule végétale.

Stratégie employée

Pour cela nous avons tout d'abord considéré les avantages ou contraintes d'un modèle de cellules en culture ou du modèle d'une plante entière, en comparant la cytologie de marqueurs potentiels des autophagosomes. Ensuite nous nous sommes investis dans la mise au point d'un protocole permettant d'induire la formation des autophagosome de manière contrôlée, rapide et reproductible afin de permettre l'étude de leur formation de manière aussi précise que possible : optimisation des paramètres de culture et d'observation, recherche et définition d'un niveau basal d'autophagie constitutive, identification et contrôle de sources d'induction de l'autophagie.

Enfin, nous avons été en mesure de définir les caractéristiques cinétiques et morphologiques d'une induction rapide de l'autophagie qui seront des paramètres précieux pour la poursuite de cette étude.

1. Mise au point des outils et des conditions expérimentales

1.1. Choix du modèle biologique

Notre démarche expérimentale se proposait de combiner la capacité d'obtenir aisément des données "*in cellulo*" par l'usage de cultures cellulaires de tabac, et "*in planta*" par l'utilisation de plantules d'*Arabidopsis thaliana*.

Les cellules en culture BY-2, de par leur accessibilité, leur absence de chloroplastes, leur cycle court, leur facilité d'utilisation pour les traitements pharmacologiques ainsi que leur compatibilité avec les techniques d'observation par microscopie, s'avèrent un modèle pertinent pour explorer des fonctions cellulaires. L'utilisation d'*Arabidopsis* est par contre incontournable de par la richesse des outils génétiques à disposition pour une étude fonctionnelle.

1.1.1. Les cellules BY-2 de Tabac[★]

Après le nouvel essor dans le domaine de l'autophagie, provoqué par la découverte des gènes *ATG* chez *Saccharomyces cerevisiae* (Tsukada and Ohsumi 1993), la collaboration entre Moriyasu et Ohsumi a permis de mettre en évidence un mécanisme de dégradation de type autophagique dans les cellules BY-2 cultivées en conditions de carence en saccharose (Moriyasu and Ohsumi 1996). Les auteurs ont mis en évidence, par coloration cytochimique, l'accumulation de vésicules dans une région périnucléaire lorsqu'un inhibiteur de cystéine protéase (E-64c) était ajouté au milieu carencé en saccharose. L'observation de ces structures a permis de mettre en évidence que ces compartiments présentaient un pH acide, une activité phosphatase acide et renfermaient des constituants cellulaires en cours de dégradation. Suite à ces observations, Moriyasu et Ohsumi, ont suggéré que ces vésicules étaient des autolysosomes.

[★]Cette étude n'ayant pas permis une avancée majeure de notre problématique, mais s'étant tout de même avérée utile pour l'établissement de notre cadre expérimental, nous avons choisi de ne présenter ici qu'un relevé de conclusions de plusieurs mois d'expérimentations. Le déroulement de ce travail est développé en Annexe 1.

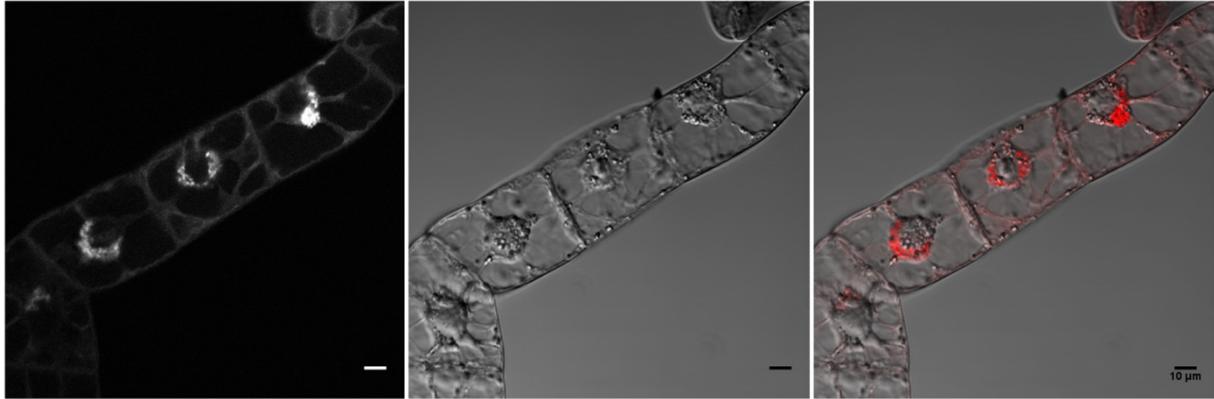


Figure 62 : Accumulation de structures de type "auto-lysosomes", marquées par le rouge neutre, en condition de carence azotée avec un inhibiteur de protéases (E-64)

Cellules BY2 marquées au rouge neutre (35 μM), après culture pendant 24 h dans un milieu MS-N + E-64 (10 μM)

Spinning Disk

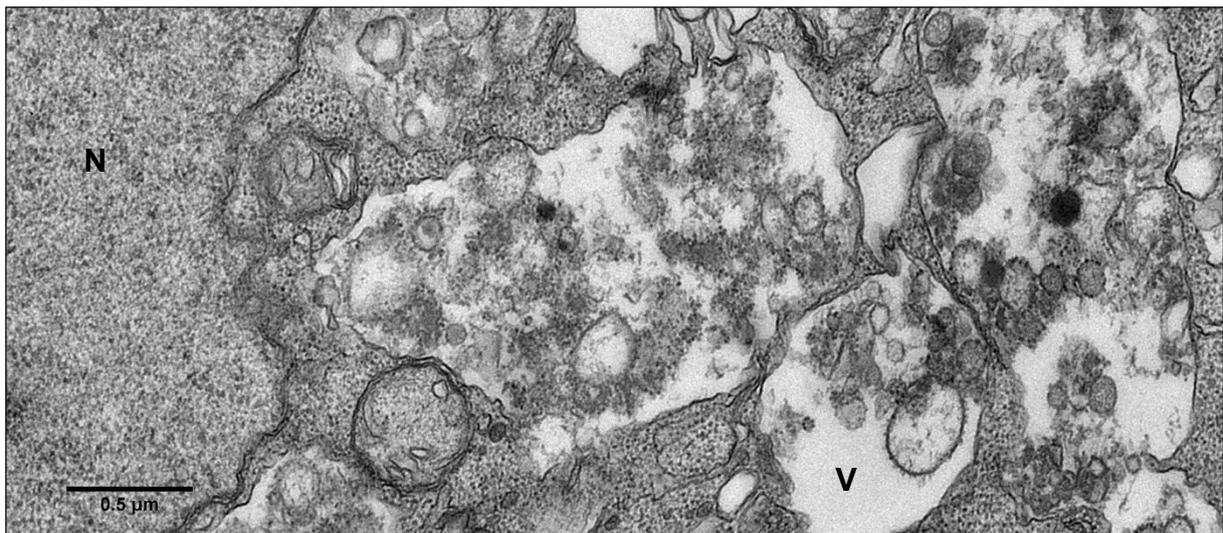


Figure 63 : Etude ultrastructurale des "auto-lysosomes"

Cellules BY2, après 24 h de culture dans un milieu MS-N + E-64 (10 μM). Observation autour du noyau, de nombreuse vacuoles contenant des vésicules et du matériel cytosolique en cours de dégradation.

N : noyau, V : vacuole

Microscopie électronique en transmission

Afin de valider les cellules BY-2 comme modèle approprié à l'étude de l'autophagie, nous avons entrepris de tester différentes approches et différents marqueurs afin de s'assurer de l'identité de ces "autolysosomes" observés dans ces conditions expérimentales. Les résultats de cette première étude, (Cf. compte-rendu détaillé en Annexe 1), mettent en exergue une difficulté d'interprétation des observations, due en partie au manque de marqueurs spécifiques permettant une corrélation entre les données issues d'approches cytochimiques et immunocytochimiques, en microscopie optique et électronique.

Les différentes approches que nous avons utilisées dans ce travail, que ce soit pour identifier les compartiments acides (utilisation du rouge neutre et du lysotracker) ainsi que différents inhibiteurs de la voie autophagiques (3-MA et wortmannine), ont bien permis de confirmer les résultats publiés précédemment, mettant en évidence une accumulation de vésicules acides en conditions de carence nutritionnelle en saccharose et en présence de E-64. La modification des conditions de carence nous a également permis d'observer des effets similaires dans le cas d'une carence en azote (Fig. 62). Ces vésicules n'ont cependant pas pu être formellement identifiées comme des structures autophagiques, ni par immunomarquages, ni par microscopie électronique en transmission, laissant planer le doute sur leur identité (Fig. 63).

Les marquages en immunofluorescence par un anticorps dirigé contre la protéine ATG8 d'*Arabidopsis*, ont cependant permis de mettre en évidence des structures cytosoliques très semblables aux autophagosomes précédemment décrits dans d'autres modèles (Axe, Walker et al. 2008). L'étude du nombre de ces structures dans des conditions de milieu riche (conditions contrôles) ou carencé, n'a cependant pas permis de mettre en évidence un quelconque phénomène d'induction. En tenant compte du nombre important de structures déjà présentes dans des conditions contrôles, il se pourrait que l'autophagie y soit déjà présente à un niveau élevé. L'autophagie étant un phénomène très sensible à l'état de stress des cellules, son niveau basal est très probablement altéré au sein d'une culture cellulaire telle que BY-2.

Afin de disposer d'un marqueur spécifique des autophagosomes, nous avons tenté de transformer des cellules BY-2 par co-culture avec *Agrobacterium tumefaciens*, exprimant la protéine de fusion GFP-ATG8e. Malgré de multiples essais, la tentative d'obtention de ces lignées est restée vaine.

En conclusion, ces observations permettent de jeter un regard critique sur l'utilisation de marqueurs de compartiments acides afin d'identifier des autophagosomes. De plus, l'autophagie étant un processus dont le fonctionnement est profondément lié à l'état de stress de la cellule, il se pourrait que l'étude de ce processus dans des lignées cellulaires telles que BY-2 ne soit pas un choix judicieux.

Ces résultats, associés à la difficulté d'obtenir des lignées BY-2 exprimant de manière stable des marqueurs spécifiques de la voie autophagique, ont orienté la suite de nos recherches sur un autre modèle : *Arabidopsis thaliana*.

1.1.2. *Arabidopsis thaliana*

Arabidopsis thaliana est de loin l'organisme modèle le plus étudié chez les plantes supérieures. Ce modèle présente de nombreux avantages, notamment grâce à la présence de multiples outils génétiques, ainsi qu'une large connaissance du système endomembranaire et des réactions provoquées par les stress abiotiques. Lors de ce travail nous avons choisi de concentrer notre étude, sur la racine d'*Arabidopsis*, qui présente, parmi d'autres avantages, un faible niveau d'autofluorescence, contrairement aux autres organes de la plante. Ceci favorisant ainsi les approches de microscopie à fluorescence. L'étude de l'autophagie au niveau de la racine d'*Arabidopsis*, permettra de pouvoir étudier ce processus au sein d'un organe intact, et dans des conditions plus proches de conditions environnementales normales.

Comme nous venons de le voir dans l'étude menée sur BY-2, les sondes telles que le lysotracker ou la monodansylcadaverine (MDC), bien que assimilées à des marqueurs de la voie tardive de l'autophagie, manquent de spécificité pour définir des compartiments autophagiques. Chez *Arabidopsis*, nous avons pu utiliser un marqueur beaucoup plus spécifique, la protéine ATG8.

Atg8 chez la levure, ou LC3 chez les mammifères, est utilisée de manière universelle pour identifier les autophagosomes depuis leur formation jusqu'à leur fusion avec le compartiment lysotique (Kirisako, Baba et al. 1999). Chez *Arabidopsis thaliana*, neuf homologues de Atg8 ont été identifiés, et présentent une forte similitude de séquence avec Atg8 de *Saccharomyces cerevisiae* (entre 73 % et 90 % d'identité) (Doelling, Walker et al.

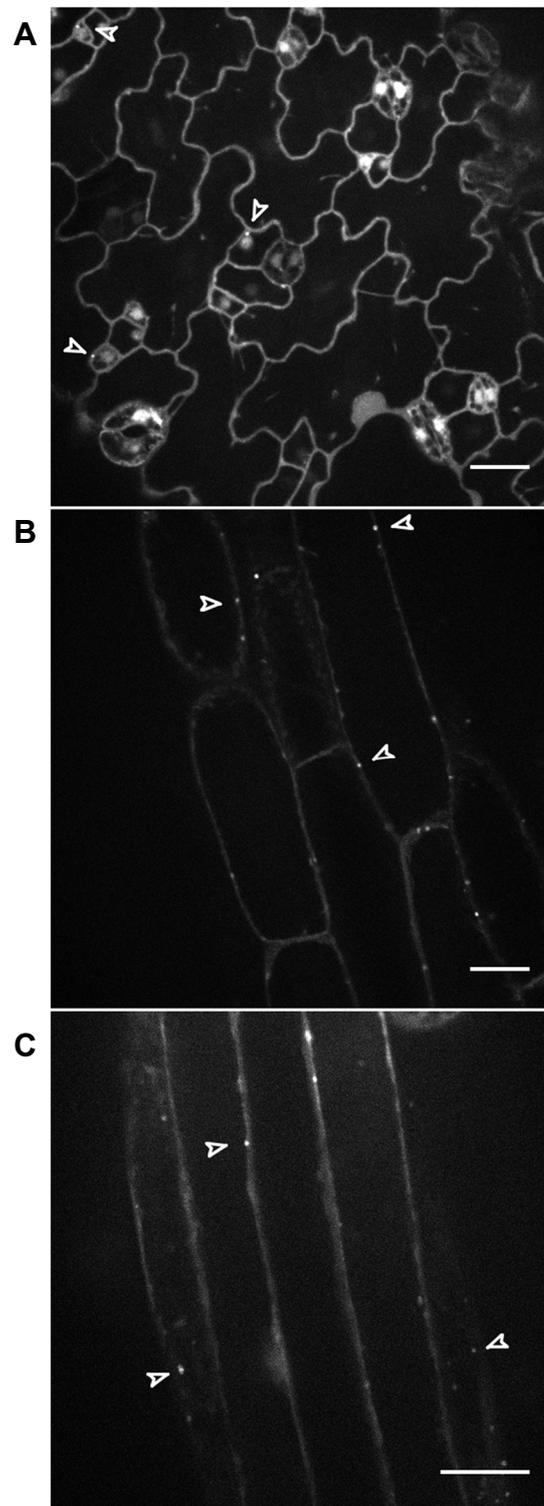


Figure 64 : La fluorescence de GFP-ATG8f chez Arabidopsis

Observation de cellules épidermiques au niveau des cotylédons (A), de l'hypocotyle (B) ou de la racine (C) de plantules de 5 jours, exprimant de manière constitutive GFP-ATG8f. Le signal marque les autophagosomes (◁) et est également présent de manière diffuse au niveau du cytosol et du noyau. Echelle : 20 μ m.

Spinning Disk

2002) (Hanaoka, Noda et al. 2002). Lorsque ces différentes isoformes d'ATG8, sont fusionnées avec la GFP, toutes ont la capacité de marquer des structures punctiformes de formes sphériques présentes au niveau du cytoplasme et sont également délivrées à la vacuole (Yoshimoto, Hanaoka et al. 2004). Lorsque la construction GFP-ATG8 est exprimée dans le mutant *atg5*, incapable de former des autophagosomes, ce signal punctiforme n'est plus observable. Ces données permettent de confirmer que, comme chez la levure ou les mammifères, ATG8 est un bon marqueur pour suivre de manière spécifique les autophagosomes *in vivo* chez *Arabidopsis* (Thompson, Doelling et al. 2005). Cependant, les études du niveau d'expression des gènes codant pour les isoformes d'ATG8, montrent que non seulement ces niveaux varient de manière importante entre les différentes isoformes mais également en fonction des différents tissus de la plante (Thompson, Doelling et al. 2005). Ces différences de niveau d'expression laissent penser qu'il existe différents rôles pour les isoformes d'ATG8, bien qu'aucun élément ne permette à ce jour d'appuyer cette supposition.

L'autophagie étant un processus hautement régulé et sensible à différentes formes de stress, nous nous sommes également affranchis, au maximum, des méthodes de transformation transitoire. En effet, bien que plusieurs publications aient mis en avant le rôle de l'autophagie dans les réactions de défense (Talbot and Kershaw 2009) (Lai, Wang et al. 2011), on ne connaît pas l'impact de la formation de protoplastes ni de la co-culture en présence d'*Agrobacterium tumefaciens*, sur la voie autophagique. Cependant il est fort probable qu'elle en soit affectée. Au vu de ces différentes considérations, nous avons choisi de n'utiliser que des plantes exprimant de manière stable nos constructions génétiques.

Nos premières études ont été menées avec les plantes exprimant de manière constitutive la construction GFP-ATG8f, sous contrôle d'un promoteur 35S (promoteur ubiquitaire, fort, issu du virus de la mosaïque du chou-fleur) provenant du laboratoire de G.Galili (Sláviková, Shy et al. 2005).

Les autophagosomes étant des structures très dynamiques, nous nous sommes rapidement tournés vers la microscopie confocale rapide (à disque de Nipkow ou Spinning Disk) pour effectuer nos analyses. En effet le Spinning Disk s'avère être un outil parfaitement adapté grâce à sa cadence d'acquisition très élevée mais également de par sa capacité à réduire la phototoxicité sur l'échantillon.

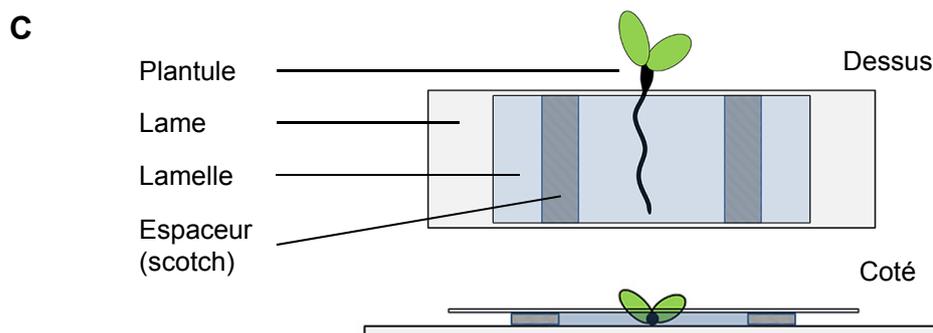
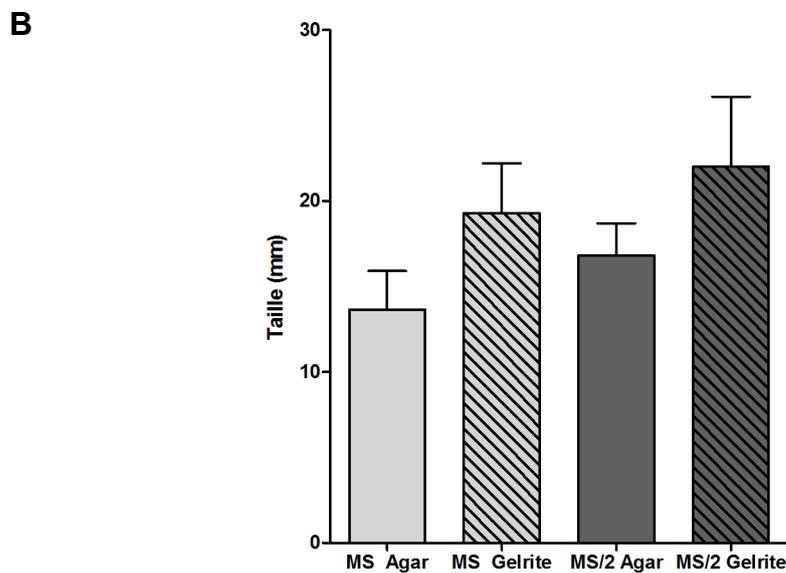
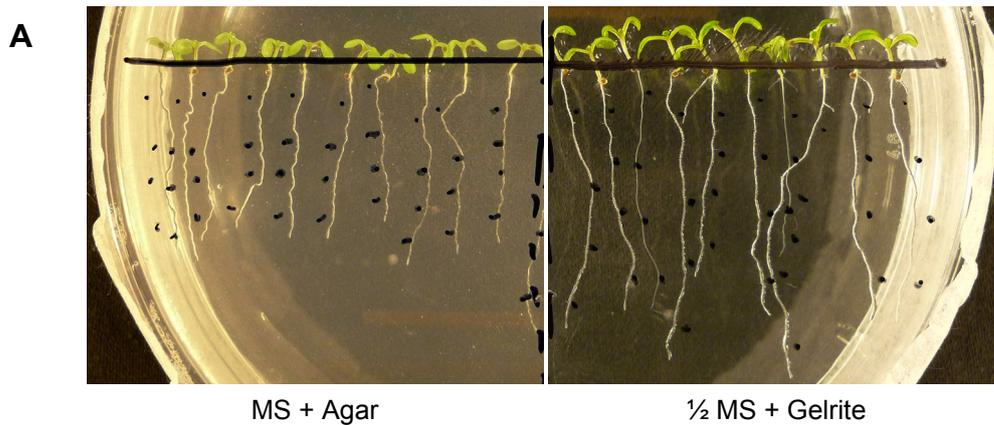


Figure 65 : Mise en place des conditions de cultures et d'observation

(A) Plantules d'Arabidopsis (Col-0) après 5 jours de croissance sur milieu 1/2 MS + Gelrite ou MS + Agar. (B) Mesure de la croissance racinaire de plantules GFP-ATG8f, après 5 jours, sur différents milieux (écarts-types). La croissance racinaire est maximale sur un milieu 1/2 MS + Gelrite. (C) Schéma décrivant le montage des lames pour l'observation au microscope. L'ajout de deux espaceurs permet d'éviter l'écrasement de la plantule.

L'imagerie de racines d'*Arabidopsis thaliana* issues de lignés mutantes ou exprimant de manière constitutive des protéines rapporteurs, par microscopie confocale rapide à disque de Nipkow, sera notre modèle expérimental de référence pour la suite de cette étude.

1.2. Contrôle du niveau basal de l'autophagie

Au niveau de la racine de plantules de 5 jours cultivées dans un milieu contrôle, riche en nutriments (milieu MS), GFP-ATG8f est présente de manière diffuse au niveau du cytoplasme et également au niveau de quelques structures punctiformes de tailles variables (entre 0,5 μm et parfois plus de 1 μm) : les autophagosomes (Fig. 64). Cependant il est relativement fréquent d'observer des plantules présentant un nombre élevé d'autophagosomes. Ces observations suggèrent que certains paramètres provoquent une induction de l'autophagie au sein des racines observées dans des conditions contrôles. Nous avons donc tenté d'identifier ces sources de variations. Celles-ci peuvent résulter de phénomènes présents en amont de nos observations, (liées aux conditions de cultures), être intrinsèques à une régulation cellulaire ou tissulaire différentielle, ou bien encore être liées à nos conditions d'observations en microscopie.

1.2.1. Optimisation des conditions de culture

Dans un premier temps, nous avons évalué l'effet de la composition du milieu de culture sur le niveau d'autophagie observé. Pour cela nous avons effectué des tests de croissance racinaire (Fig. 65A, 65B). Le milieu qui semble le plus propice pour la croissance des plantules, s'avère être le milieu Murashige et Skoog à demie concentration ($\frac{1}{2}$ MS), en présence de 1 % de saccharose, l'agar étant remplacé par de la Gelrite (0,3 % (w/v)). Afin de minimiser au maximum les variations des conditions environnementales, une attention toute particulière a également été apportée aux conditions de culture (température, illumination, hygrométrie relative), et la période comprise entre la sortie de la chambre de culture et l'observation est réduite au maximum. Lors du montage pour l'observation sur le microscope, les plantules sont manipulées avec le plus grand soin et des espaceurs sont placés entre la

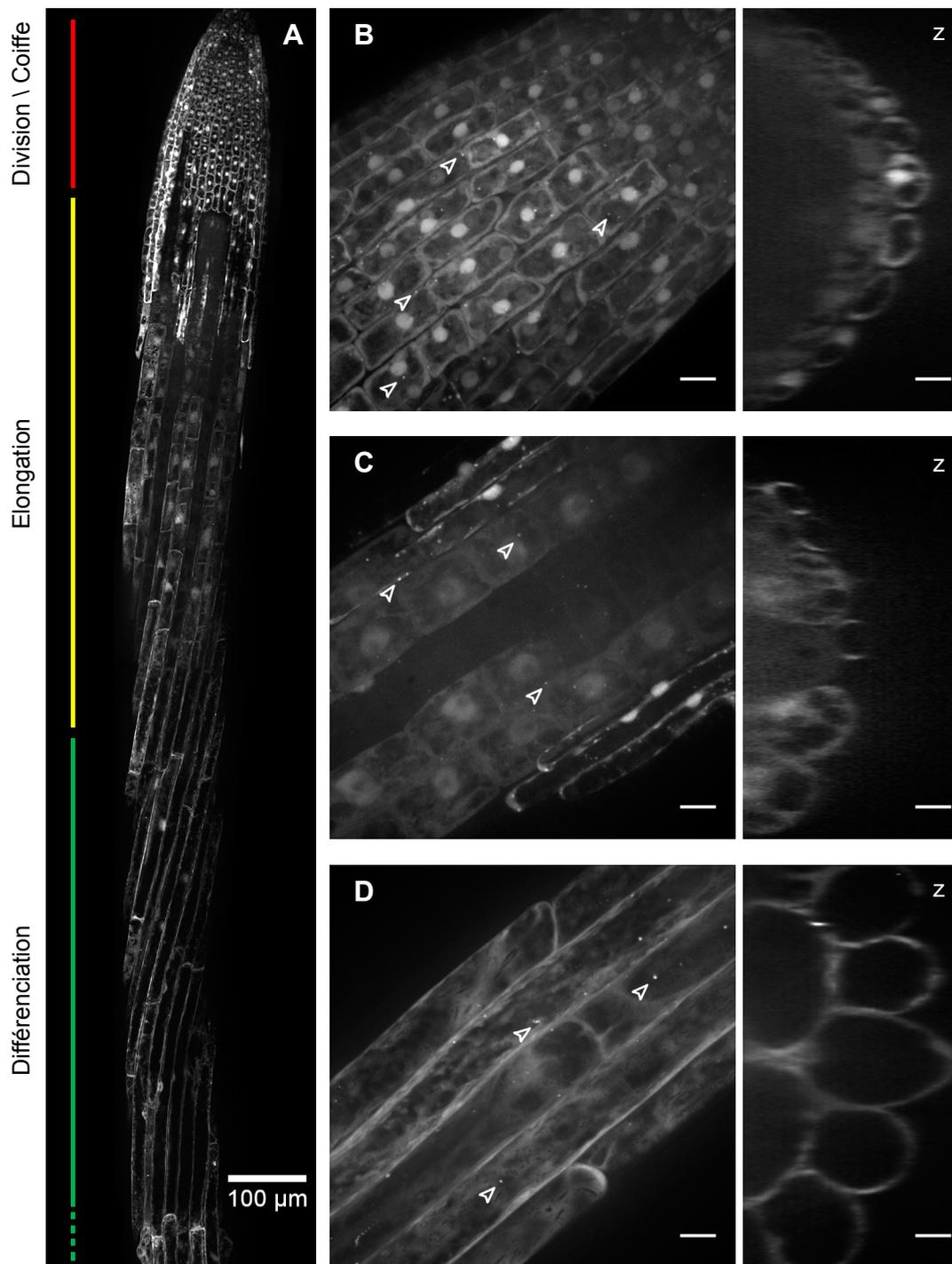


Figure 66 : Observation de l'autophagie basale au niveau de la racine d'Arabidopsis
(A) Racine d'Arabidopsis GFP-ATG8f après 5 jours de croissance sur milieu $\frac{1}{2}$ MS + Gelrite. **(B)** Zone de division recouverte par la coiffe, MIP (60 μm) et la projection selon l'axe z correspondant. **(C)** Zone d'élongation, MIP (60 μm) et la projection selon l'axe z correspondant. **(D)** Zone de différenciation, MIP (60 μm) et la projection selon l'axe z correspondant. Autophagosomes (\triangleright). Echelle : 10 μm .

Microscopie confocale à Spinning Disk

lame et la lamelle afin de limiter au maximum les stress mécaniques (Fig. 65C). Dans ces conditions, l'observation au Spinning Disk des racines, révèle une forte diminution du nombre d'autophagosomes, par comparaison avec les autres conditions précédemment utilisées.

Le faible niveau d'autophagie observé sur des racines de plantules cultivées en milieu $\frac{1}{2}$ MS + Gelrite constituera notre niveau basal de référence pour la suite de notre étude.

1.2.2. Un niveau d'autophagie dépendant du type cellulaire et du stade de différenciation

Lorsque l'on étudie plus précisément ce niveau d'autophagie "basale" au sein des différentes régions de la racine, on remarque certaines différences en fonction des types et des stades cellulaires (Fig. 66) :

La région de la coiffe racinaire est caractérisée par un "turnover" important des cellules, qui vont s'exfolier continuellement au cours de la croissance racinaire et sont le siège de certains mécanismes de mort programmée (Shishkova and Dubrovsky 2005) ainsi que d'une forte activité pectolytique (Hawes and Lin 1990). La coiffe racinaire présente un fort niveau de fluorescence cytosolique de GFP-ATG8, et quelques structures punctiformes sont marquées (Fig. 66B). En comparaison avec les autres régions étudiées, la coiffe présente un niveau d'autophagie plus variable et fréquemment très élevé.

Les cellules épidermiques de la zone de division ainsi que celles de la zone d'élongation présentent, par contre, un faible niveau de fluorescence cytosolique, et les autophagosomes ne sont observés que très rarement (Fig. 66C). Ces cellules impliquées dans des processus de division et de croissance semblent avoir un niveau d'autophagie basale très bas.

Enfin lorsque ces cellules ont atteint leur taille définitive, elles entrent dans la zone de différenciation ou elles vont se spécialiser. Ces cellules présentent un niveau de fluorescence cytosolique faible, et on y observe quelques structures autophagiques (Fig. 66D).

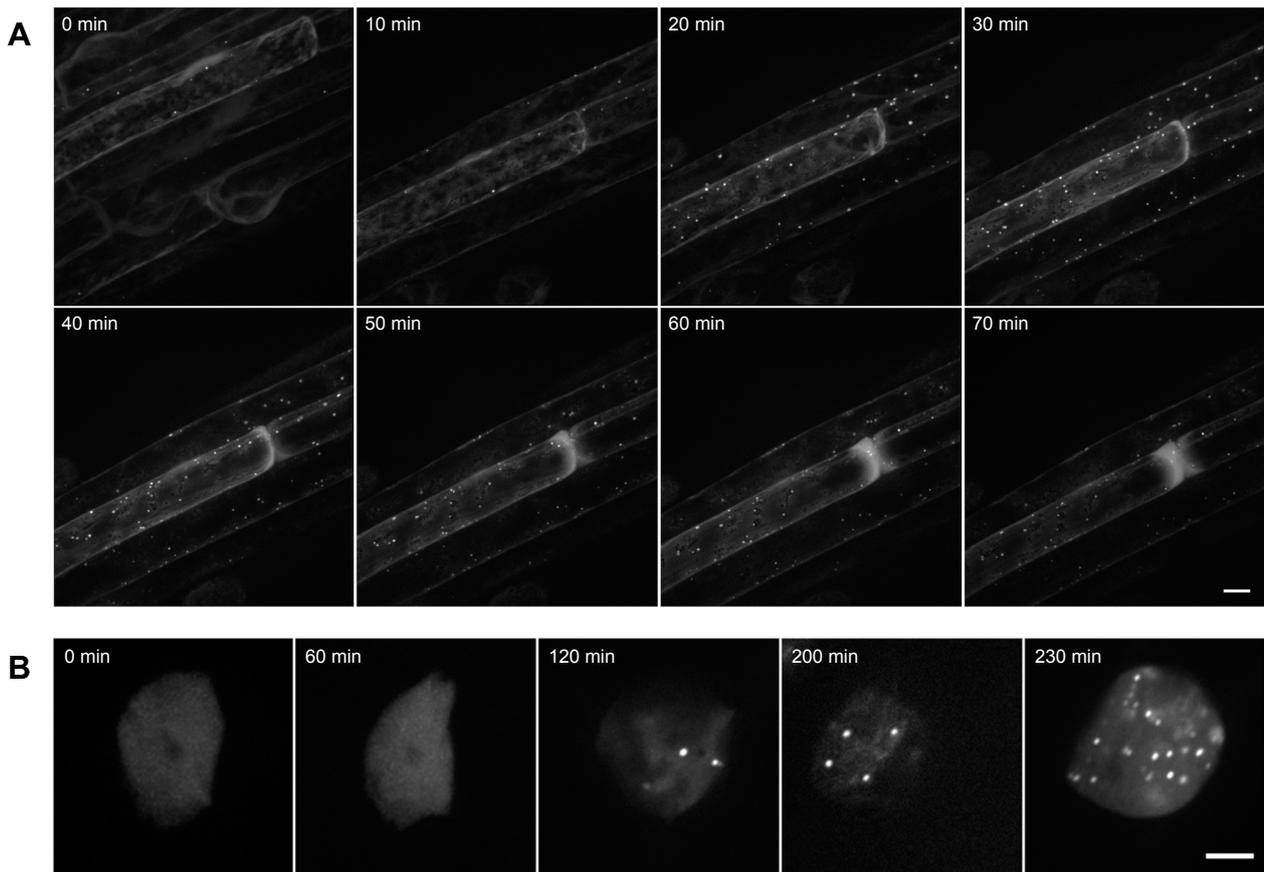


Figure 67 : Induction de l'autophagie chez Arabidopsis, placée entre lame et lamelle

(A) Cellules épidermiques racinaires, différenciées, de plantules GFP-ATG8f, observées après montage entre lame et lamelle dans du milieu riche. Echelle : 10 μ m. **(B)** Observation du signal nucléaire chez les plantules GFP-eIF4A-III après montage entre lame et lamelle dans du milieu riche. Echelle : 5 μ m.

Microscopie confocale à Spinning Disk

Ces observations confirment que le niveau basal d'autophagie peut varier au sein d'un même organe, soulignant une participation différentielle de l'autophagie en fonction des besoins cellulaires.

1.2.3. Impact des paramètres d'observation

Lors de ces observations nous avons également mis en évidence une source de variation du niveau d'autophagie, peut-être trop souvent négligée : le stress lié aux conditions d'observation. Lorsque les plantules sont mises entre lame et lamelle, dans un milieu riche, en présence de lumière, on observe que le niveau d'autophagie augmente de manière significative au cours de l'observation sous le microscope après une durée variable comprise entre 20 min pour les plus réactives et 90 min (Fig. 67A). Cette observation montre bien à quel point l'autophagie au niveau de la racine est un processus extrêmement sensible aux moindres variations environnementales. Nous avons tenté d'identifier la cause de cette induction.

Dans un premier temps nous avons mis en évidence que cette induction n'était pas reliée à l'impact du laser sur l'échantillon lors de l'observation, car même lorsque les plantules sont placées 1 h en chambre de culture entre lame et lamelle on observe un fort niveau d'autophagie dès la première observation.

Nous avons alors émis l'hypothèse que l'induction de l'autophagie pouvait être une conséquence de l'apparition d'un stress de type hypoxie, résultant de l'appauvrissement rapide en oxygène du milieu de culture contenu entre la lame et la lamelle. Afin de déterminer si, dans nos conditions d'observation, les plantules subissent un stress hypoxique, nous avons utilisé une lignée exprimant GFP-eIF4A-III, une RNA hélicase, localisée dans le noyau de manière diffuse mais qui possède la particularité de former des structures punctiformes nucléaires sous l'effet d'un stress hypoxique (Koroleva, Calder et al. 2009). L'observation de ce marqueur d'hypoxie nous a permis d'observer que ces plantules ressentent un stress hypoxique, se traduisant par la formation de "speckles" nucléaires, entre 1 et 2 h après leur montage entre lame et lamelle (Fig. 67B). Ces données confirment qu'il y a bien apparition d'un stress hypoxique au niveau de la racine dans de telles conditions. Cependant l'autophagie semble induite de manière plus précoce (20 min) que l'apparition des "speckles" nucléaires (120 min), suggérant soit l'implication d'autres formes de stress, soit que l'induction de

l'autophagie est plus sensible à l'hypoxie que le phénomène produisant la formation des "speckles" de GFP-eIF4A-III.

Nos études sur ce phénomène d'induction de l'autophagie entre lame et lamelle, nous ont amenés à être très vigilants quant au temps d'observation de nos échantillons. C'est pourquoi, pour la suite de ce travail, les plantules n'ont jamais passé plus de 15 min entre lame et lamelle.

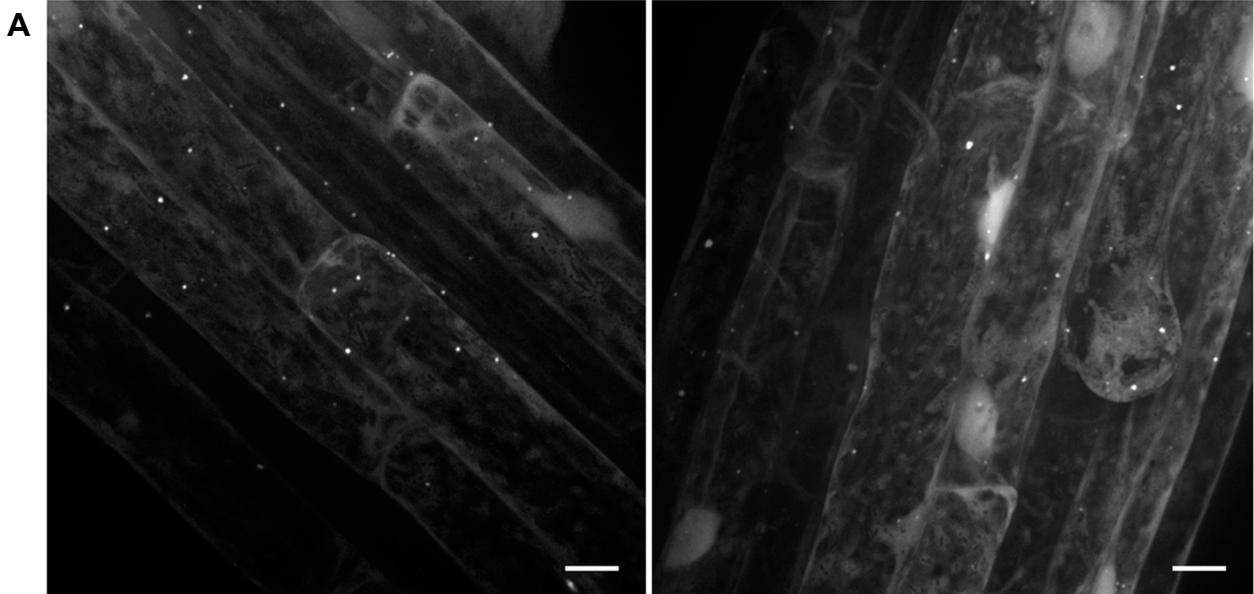
1.3. Optimisation des conditions d'induction de l'autophagie

Après avoir limité les sources parasites d'induction de l'autophagie, et défini les conditions d'observations de l'autophagie basale, nous nous sommes intéressés à provoquer l'induction de l'autophagie de manière contrôlée. En effet, cela devrait nous permettre de toujours observer le même type d'autophagie, et donc le même type d'autophagosomes. De nombreuses données dans la littérature décrivent l'induction de l'autophagie chez les plantes par carence nutritionnelle (carence azotée, carence carbonée), sur des durées prolongées allant de plusieurs heures à plusieurs jours (Yoshimoto, Hanaoka et al. 2004) (Thompson, Doelling et al. 2005) (Suttangkakul, Li et al. 2011) (Liu, Burgos et al. 2012). nous avons donc privilégié la mise au point de cette stratégie d'induction.

1.3.1. Protocole d'induction

Afin de carencer les plantes, celles-ci sont au préalable cultivées sur un milieu riche en nutriments, puis transférées pendant des durées variables sur un milieu liquide carencé. Pour nos expériences nous nous sommes concentrés sur la mise au point d'un protocole permettant l'induction de l'autophagie de manière rapide et efficace. Nous avons donc testé différents milieux carencés avec différents temps d'incubation. Le milieu qui s'est avéré le plus efficace pour induire l'autophagie de manière reproductible était un milieu dépourvu de toute source de carbone et d'azote ($\frac{1}{2}$ MS-N-C). Afin d'augmenter l'efficacité de ce traitement, les plantules ont été placées à l'obscurité, bloquant ainsi la production de sucres par la photosynthèse. Dans ces conditions, l'induction a lieu rapidement après le changement de

Conditions riches : ½ MS, lumière, 1h



Conditions de carence nutritionnelle : ½ MS-N-C, obscurité, 1h

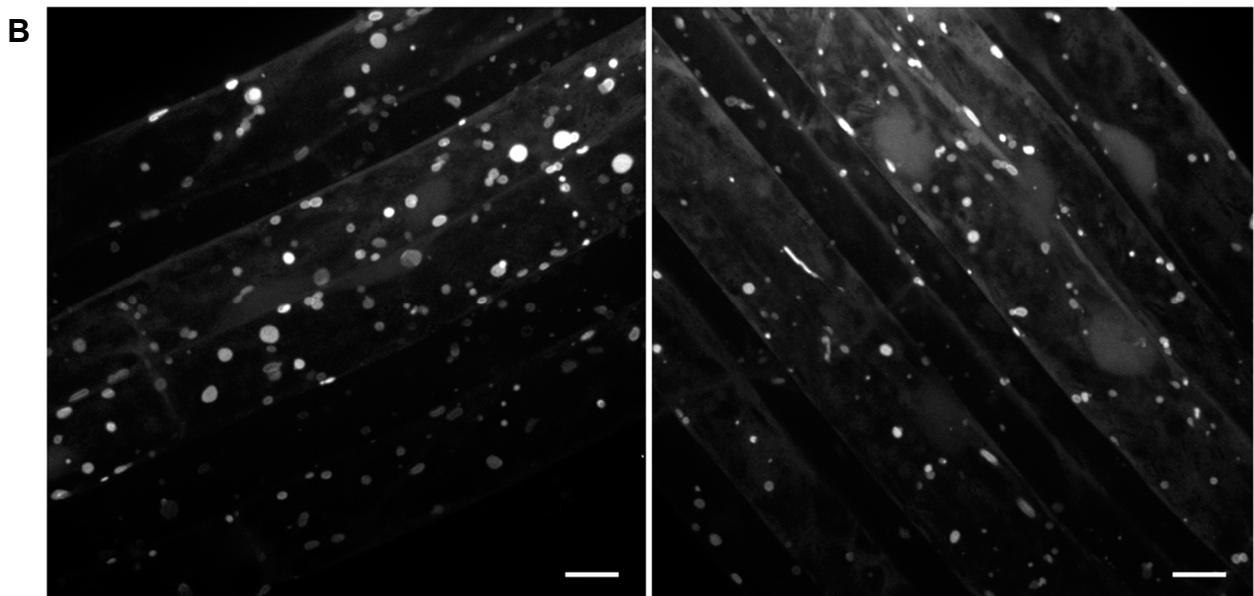


Figure 68 : Induction de l'autophagie par carence nutritionnelle

Observation de cellules épidermiques racinaires, différenciées, de plantules GFP-ATG8f. Après 5 jours de croissance sur milieu riche, les plantules sont transférées sur un milieu liquide riche (**A**) (½ MS, lumière), ou sur un milieu carencé (**B**) (½ MS-N-C, obscurité), pendant 1 h. MIPs (50 µm), échelle 10 µm.

Microscopie confocale à Spinning Disk

milieu : une augmentation massive et reproductive du nombre d'autophagosomes au sein des racines carencées est observable dès 1 h de carence (Fig. 68).

Dans la suite de notre étude, le milieu ½ MS-N-C sera utilisé pour déclencher l'induction de l'autophagie.

1.3.2. Choix de la région de différenciation de la racine comme zone d'observation

Dans les conditions où l'autophagie est induite, on retrouve une certaine hétérogénéité quant au nombre d'autophagosomes observés en fonction des différentes régions de la racine. Cette observation confirme l'hypothèse de régulations cellulaires distinctes précédemment suggérées par l'observation de plantes en milieu riche. Nous avons choisi de nous concentrer, pour la suite de ce travail, sur les cellules de l'épiderme racinaire de la zone de différenciation. En effet ces cellules s'avèrent être un bon modèle pour l'étude de la formation des autophagosomes, car elles présentent la plus forte induction suite à la carence nutritionnelle, tout en ayant un faible niveau basal d'autophagie en conditions contrôles.

L'observation des cellules de l'épiderme de la zone de différenciation de la racine sera privilégiée dans la suite de notre étude

1.4. Mise en évidence de l'augmentation du flux autophagique

L'augmentation du nombre d'autophagosomes observée dans les cellules des racines carencées peut traduire soit une augmentation de la formation d'autophagosomes, soit un blocage du flux autophagie, notamment lors de la fusion avec la vacuole. Afin de confirmer le phénomène d'augmentation du flux autophagique lors d'une carence nutritionnelle, nous avons procédé à un test biochimique, couramment utilisé chez la levure. Cette méthode consiste à détecter par western blot la quantité de GFP-ATG8 dégradée au niveau de la vacuole. En effet, lorsque GFP-ATG8, présente au niveau de la membrane interne de l'autophagosome arrive au niveau de la vacuole, après la fusion de l'autophagosome, la partie ATG8 est

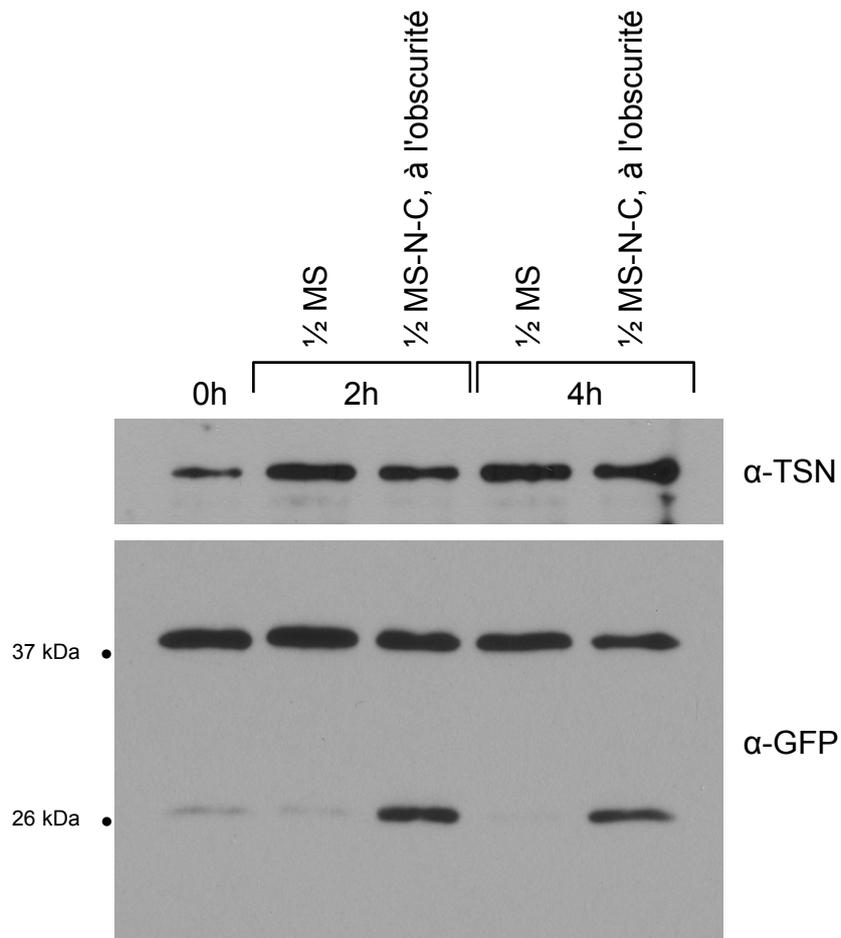


Figure 69 : Mise en évidence du flux autophagique

Western Blot effectué à partir d'extraits protéiques de racines d'*Arabidopsis* (5 jours), directement prélevées sur la boîte de culture, ou après transfert pendant 2h ou 4h sur un milieu liquide riche ($\frac{1}{2}$ MS) ou sur un milieu carencé ($\frac{1}{2}$ MS-N-C, à l'obscurité). Révélation à l'aide d'un anticorps dirigé contre la GFP (α -GFP). Contrôle de charge effectué à l'aide d'un anticorps dirigé contre Tudor-SN (α -TSN). Deux bandes sont observées avec l' α -GFP : l'une, autour de 37 kDa, correspondant probablement à la fusion GFP-ATG8f, et l'autre autour de 26 kDa, correspondant probablement à la GFP libre.

rapidement dégradée alors que la GFP, qui présente une relative stabilité face aux hydrolases vacuolaires, résiste un certain temps à la dégradation. Ainsi l'accumulation de la GFP libre dans le lumen de la vacuole est un bon indicateur du flux autophagique. Cette technique est donc complémentaire des approches de microscopie afin de mettre en évidence l'induction de la formation des autophagosomes.

Pour ce test, des extraits protéiques racinaires, provenant de plantules ayant poussé dans différentes conditions ont été générés. Concernant les plantules contrôles, prélevées directement sur le milieu riche, l'anticorps α -GFP, permet de détecter une bande majoritaire, légèrement supérieure à 37 kDa. Cette bande correspond à la fusion entre la GFP (27 kDa) et ATG8f (14 kDa) (Fig. 69). Une seconde bande, à peine détectable, autour de 26 kDa, est également marquée par l'anticorps α -GFP et représente la GFP libre résultant de la dégradation partielle de GFP-ATG8. Ce résultat confirme que dans nos conditions de culture, il y a très peu de dégradation de GFP-ATG8 et donc très peu d'autophagie. Les extraits protéiques provenant de plantules ayant été transférées, pendant 2 et 4 h, dans un milieu liquide riche, présentent exactement le même profil que pour les plantules prélevées directement sur la boîte. Ces données montrent que le fait de transférer les plantules du milieu de culture sur un milieu liquide, de même composition, ne provoque pas d'induction de l'autophagie. Par contre concernant les plantes transférées pendant 2 h à l'obscurité dans un milieu liquide $\frac{1}{2}$ MS-N-C, on observe ici une forte accumulation de la bande caractérisant la GFP libre. Ces données sont également retrouvées pour les extraits protéiques des plantules carencées pendant 4 h. L'ensemble de ces résultats montre que dans les conditions contrôles, le flux autophagique est présent uniquement à un niveau très faible, et l'évolution du ratio GFP-ATG8/GFP en faveur de la GFP libre traduit une augmentation du flux autophagique lorsque que les plantules sont soumises à une carence nutritionnelle pendant 2 ou 4 h.

Cela confirme que dans nos conditions l'augmentation du nombre d'autophagosomes observés dans le cytosol, résulte bien d'une augmentation de leur formation.

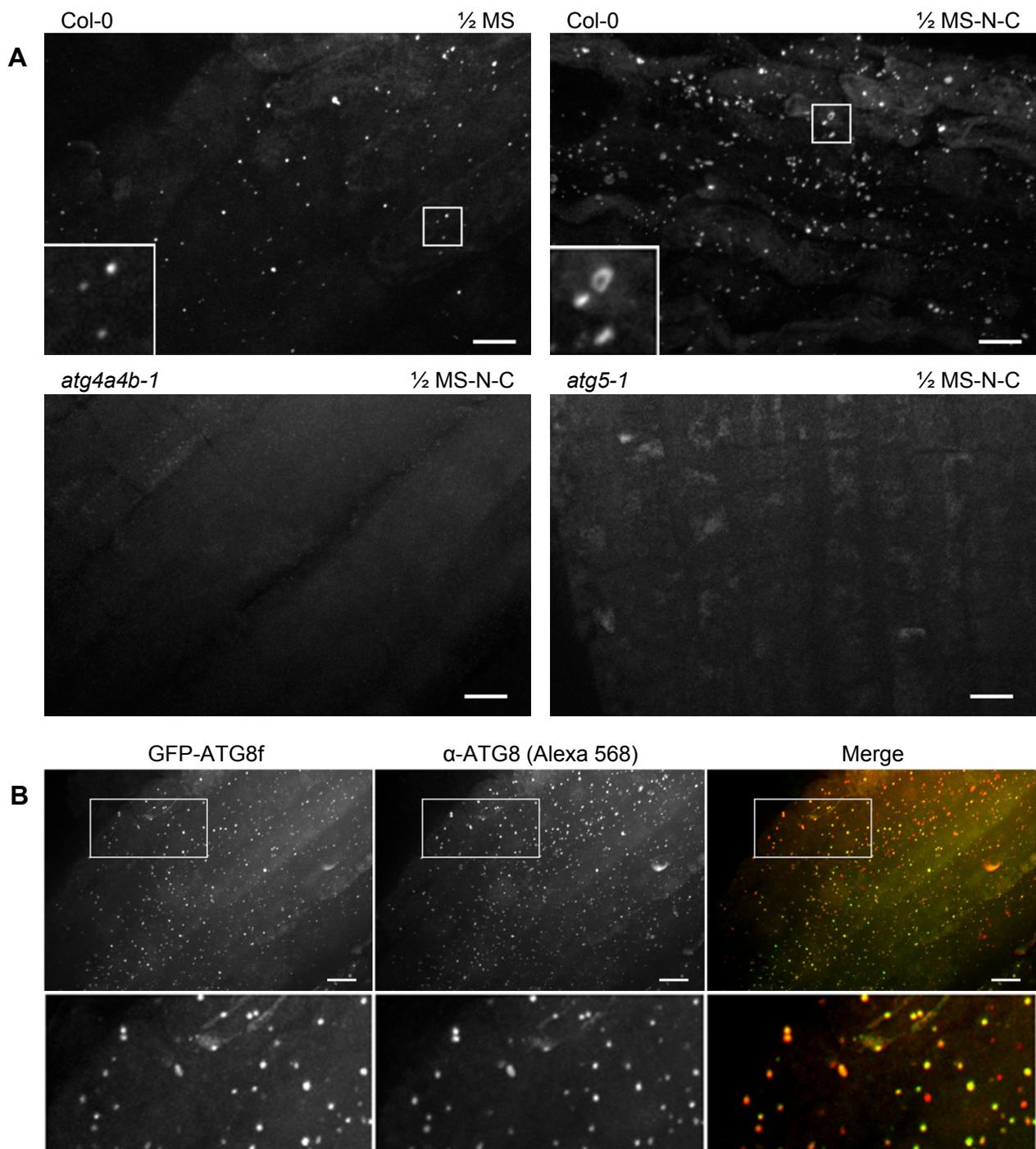


Figure 70 : Immunomarkage des autophagosomes dans la racine d'Arabidopsis

(A) Immunomarkage "whole mount" avec un anticorps α -ATG8 effectué sur différents génotypes. Chez Col-0, le nombre et la taille des structures marquées augmentent en condition de carence nutritionnelle. Chez *atg4a4b-1* et *atg5-1*, même en condition de carence, aucune structure n'est détectée. MIPs (40 μ m), échelle : 10 μ m. (B) Comparaison du marquage par la GFP et par l' α -ATG8 au niveau de racines GFP-ATG8f en condition de carence nutritionnelle. MIPs (40 μ m), échelle 10 μ m.

Spinning Disk

1.5. GFP-ATG8f : un marqueur de tous les autophagosomes ?

ATG8f, semble être un bon marqueur, permettant de marquer de manière efficace les autophagosomes et de suivre le niveau d'autophagie de la plante. Cependant, ATG8f n'est que l'une des neuf isoformes d'ATG8 présentes chez *Arabidopsis*. Afin d'estimer à quel point ATG8f est représentatif de la population globale d'autophagosomes, nous nous sommes intéressés à savoir si ATG8f était présente de manière générale sur tous les autophagosomes observés au niveau de la cellule, ou si elle se trouvait présente uniquement sur une population particulière d'autophagosomes.

➤ *Etude par immunofluorescence avec un anticorps α -ATG8*

Nous avons dans un premier temps procédé par immunofluorescence indirecte, en utilisant un anticorps dirigé contre ATG8. Cet anticorps, initialement généré contre ATG8a, et validé par des approches biochimiques, permet également de reconnaître ATG8i, qui est l'isoforme présentant le moins de similarité de séquence parmi tous les membres de cette famille très conservée, suggérant que cet anticorps reconnaît potentiellement toutes les isoformes de ATG8 (Thompson, Doelling et al. 2005).

Nos résultats d'immunomarquages sur des racines d'*Arabidopsis* révèlent, en conditions de carence nutritionnelle, une augmentation du nombre et de la taille de structures sphériques de 0,5 μ m à 3 μ m, correspondant probablement aux autophagosomes (Fig. 70A). Afin de s'assurer que ces structures sont bien des autophagosomes, nous avons effectué le même immunomarquage sur deux lignées mutantes pour des protéines ATG essentielles à la formation de l'autophagosome : *atg4a4b-1*, pour laquelle les deux isoformes de ATG4 sont mutées (Yoshimoto, Hanaoka et al. 2004), ainsi que *atg5-1*, mutée pour l'unique isoforme d'ATG5 (Thompson, Doelling et al. 2005). Ces deux lignées présentent un défaut de la voie autophagique, résultant de l'incapacité à lipider ATG8. L'immunomarquage effectué sur ces mutants, ne permet de distinguer aucune structure marquée par l'anticorps α -ATG8 (Fig. 70A). Ce résultat confirme la spécificité de cet anticorps envers ATG8 lui permettant de marquer les autophagosomes et valide son utilisation pour des approches d'immunomarquage sur la racine d'*Arabidopsis*.

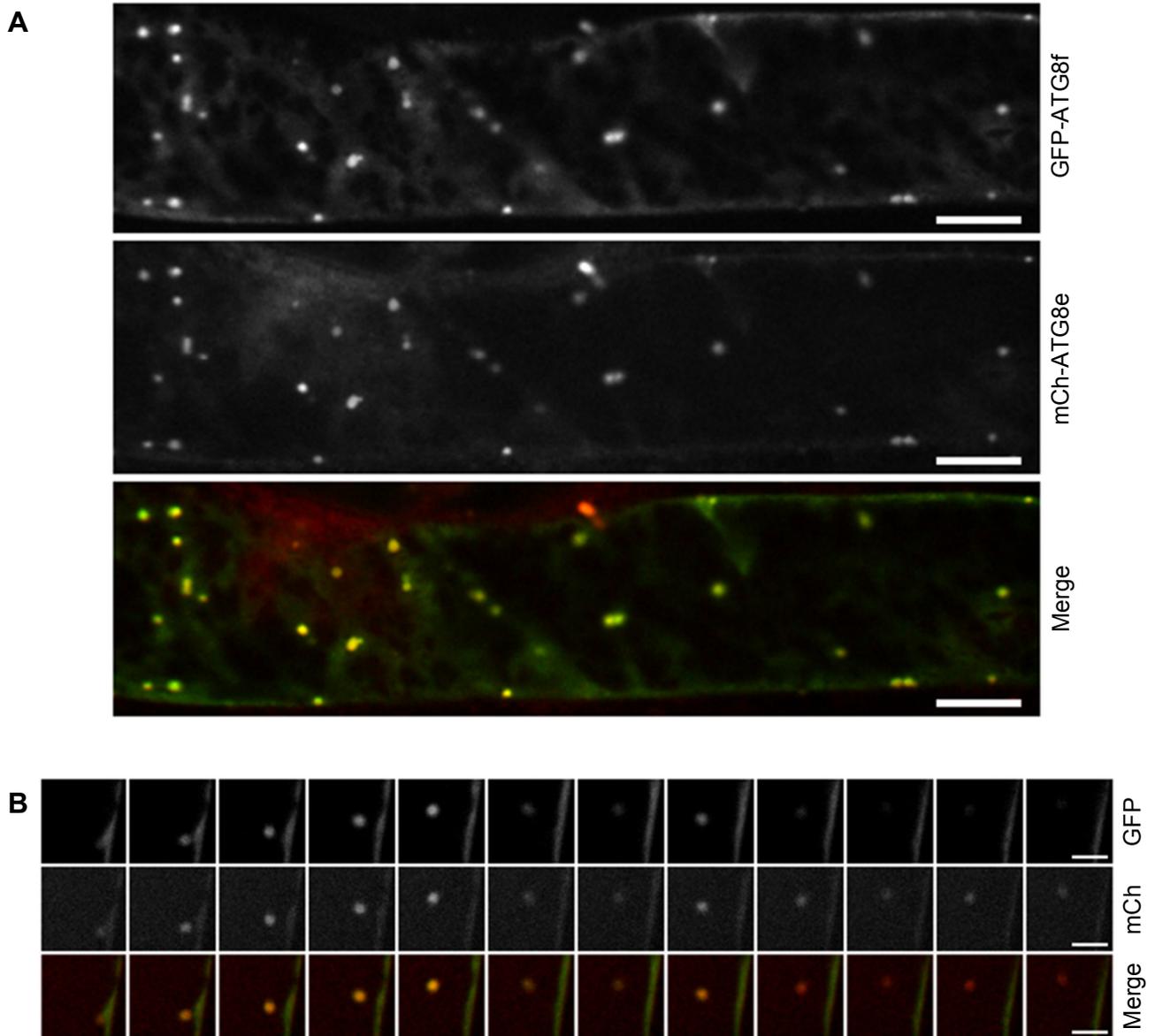


Figure 71 : Colocalisation de ATG8e et ATG8f chez Arabidopsis

(A) Observation de cellules épidermiques racinaires, différenciées, de plantules exprimant de manière constitutive GFP-ATG8f et mCh-ATG8e. Au niveau cortical on remarque que les autophagosomes sont marqués par les deux isoformes de ATG8. Echelle : 10 μ m. (B) Evènement de fusion d'un autophagosome avec la vacuole. Lors de la fusion l'autophagosome est marqué par la GFP et mCh, cependant la GFP est rapidement "quenchée" à cause du pH vacuolaire. La mCh semble plus résistante, ce qui explique le signal mCh global présent au niveau de la vacuole. 1 image / 2 sec. Echelle 5 μ m

Dual View + Spinning Disk

Ensuite nous avons effectué un immunomarquage sur des racines de plantules exprimant de manière constitutive la construction GFP-ATG8f. En observant les structures marquées par l'anticorps α -ATG8, révélées par un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome de type Alexa-568, ainsi que celles marquées par la construction GFP-ATG8f, on constate que la grande majorité de ces structures sont doublement marquées (Fig. 70B). Ce résultat suggère que ATG8f est présente sur la majorité des autophagosomes observés au niveau de la racine, validant ainsi l'utilisation de la construction GFP-ATG8f comme étant un bon marqueur des autophagosomes chez *Arabidopsis*.

➤ *Co-expression de différentes isoformes de ATG8*

Pour compléter les résultats obtenus par immunofluorescence, nous avons également, d'étudié *in vivo* le marquage des autophagosomes par différentes isoformes d'ATG8 : ATG8f et ATG8e, les deux isoformes les plus exprimées au niveau de la racine (Thompson, Doelling et al. 2005). Pour cela nous avons tout d'abord généré une lignée exprimant de manière stable la construction mCherry-ATG8e, sous le contrôle d'un promoteur 35S. Ensuite nous avons obtenu par croisement une lignée exprimant de manière stable, ATG8f et ATG8e fusionnés respectivement avec la GFP et mCherry. Il nous restait à optimiser les conditions d'observation simultanée de ces deux protéines fluorescentes.

En effet, nous avons déjà mentionné que la cadence d'acquisition du Spinning Disk se trouve particulièrement adaptée au suivi de la dynamique des autophagosomes. Cependant son mode d'acquisition des différents canaux de manière séquentielle, présente quelques désavantages, notamment pour des études de colocalisation. Afin de contourner ce problème, le Spinning Disk a été équipé d'un module permettant l'acquisition simultanée des deux longueurs d'ondes : le Dual-View. Ce dispositif permet, par un système de filtres et de miroirs dichroïques, d'acquérir simultanément deux images spatialement identiques mais spectralement différentes.

L'observation simultanée de ATG8f et ATG8e montre que les autophagosomes sont indifféremment marqués par les différentes isoformes d'ATG8. En effet, toutes les structures marquées par GFP-ATG8f, le sont aussi par mCh-ATG8e, et inversement (Fig. 71A). Ces observations permettent aussi de visualiser la fusion de l'autophagosome avec la vacuole. En

effet, lorsque l'on observe la lignée mCh-ATG8e on remarque une forte fluorescence au niveau de la vacuole, résultant de la fusion des autophagosomes avec le compartiment lytique, alors que ceci n'est pas observé pour GFP-ATG8f (Fig. 71B). Cette absence de fluorescence dans le cas de la GFP, est due à un phénomène de "quenching" dans l'environnement acide de la vacuole, et ne provient pas d'un déficit d'adressage à ce compartiment. En effet, la dégradation de GFP-ATG8 est observée en western blot, et l'accumulation de corps autophagiques fluorescents est constatée dans la vacuole lors de son alcalinisation par la concanamycine A.

Ces résultats valident l'utilisation de ATG8f et ATG8e comme de bons marqueurs de l'intégralité de la population des autophagosomes formés lors d'une carence nutritionnelle.

1.6. Identification des autophagosomes à l'échelle ultrastructurale

La définition et l'identification des autophagosomes faites par l'utilisation de marqueurs spécifiques doit s'accompagner d'une identification au niveau ultrastructural pour s'assurer d'un support morphologique et permettre d'investiguer les événements membranaires impliqués dans leur formation. Chez les plantes, c'est un point d'autant plus crucial, que la cellule végétale possède un compartiment vacuolaire complexe et extrêmement pleiomorphe.

1.6.1. Utilisation de critères morphologiques

Nous avons tout d'abord tenté d'identifier les autophagosomes en microscopie électronique en transmission, au niveau de la racine d'Arabidopsis, par des critères morphologiques. En effet les autophagosomes ont la particularité d'être délimités par une double membrane, ce qui permet de les différencier des autres vésicules participant aux différentes voies de l'endocytose ou de l'exocytose. De plus, comme nous l'avons confirmé précédemment, par microscopie photonique, les autophagosomes sont des structures dont la taille est comprise entre 500 nm et plusieurs microns. Enfin, lors de sa formation, l'autophagosome séquestre une portion de cytoplasme pour l'amener à la vacuole, donc le

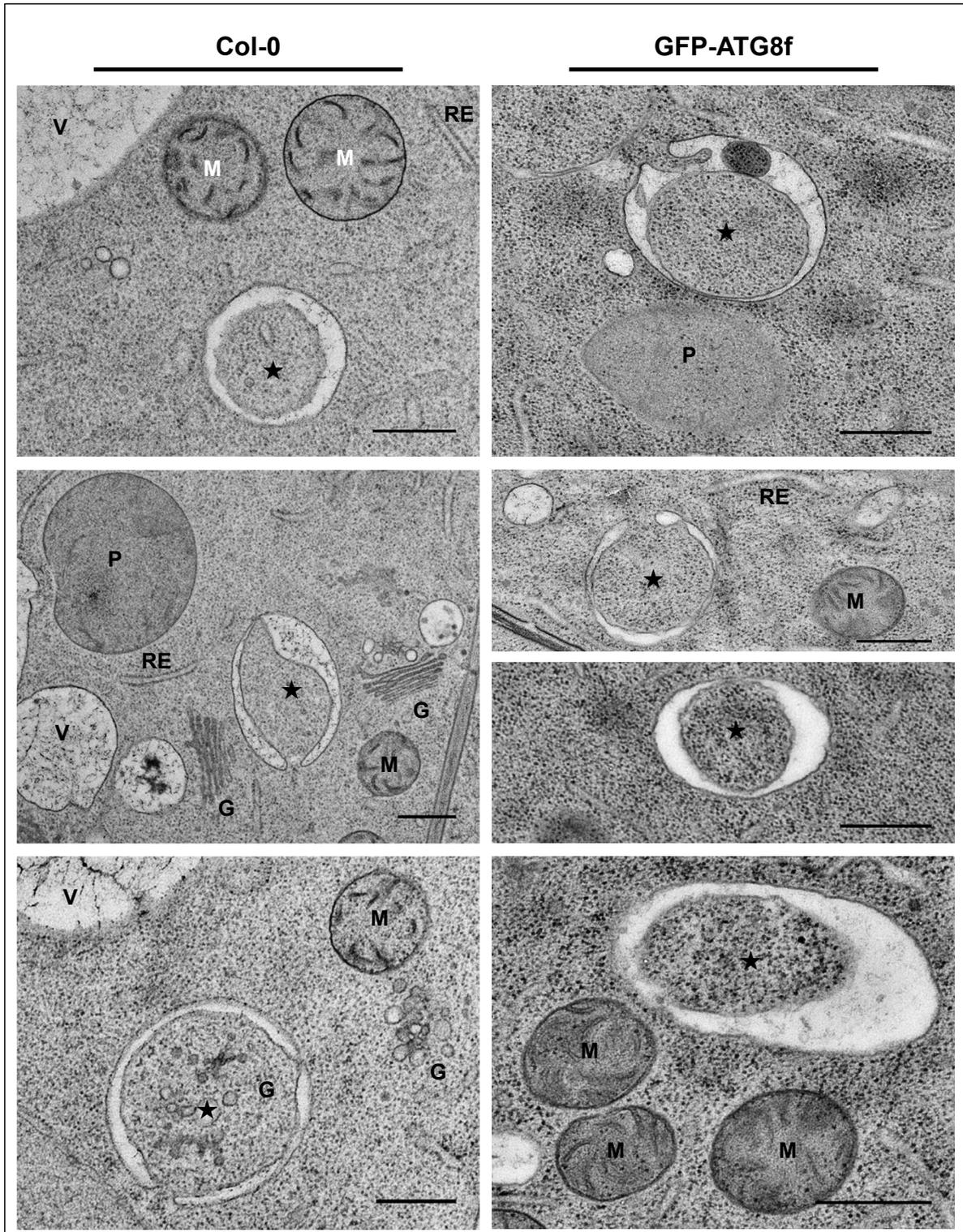


Figure 72 : Recherche d'autophagosomes sur des critères morphologiques

Observation de cellules de pointe racinaire provenant de plantules Col-0 ou GFP-ATG8f, après induction de l'autophagie par carence nutritionnelle. G : Golgi, M : Mitochondrie, P : Plaste, RE : Réticulum Endoplasmique, V : Vacuole, ★ : Possible autophagosome. Echelle : 0,5 μ m.

Cryofixation, Résine Epoxy, Microscopie électronique en transmission

contenu de l'autophagosome doit présenter un aspect proche de celui du cytosol et peut également contenir des organites.

Nous avons donc recherché des structures correspondant à ces trois critères, au niveau des cellules racinaires en différenciation, afin de pouvoir comparer avec nos données de microscopie photonique. Cependant malgré de nombreux essais et l'utilisation de plusieurs méthodes de fixation chimique ou de cryofixation à haute pression des échantillons, nous ne sommes pas parvenus à conserver la morphologie des cellules épidermiques en différenciation de racine. En effet les cellules racinaires différenciées possèdent une vacuole qui peut occuper jusqu'à 90 % du volume cellulaire, ce qui complique considérablement la bonne préservation des structures lors des protocoles de préparation des échantillons pour la microscopie électronique en transmission.

Afin de contourner cet obstacle, nous nous sommes intéressés aux cellules en division de la pointe racinaire, dans lesquelles la vacuole centrale est en cours de formation et occupe un volume cellulaire bien moins important. Que ce soit sur des plantules ayant poussé sur milieu contrôlé ou milieu carencé en nutriments, nous avons pu observer des structures répondant aux critères morphologiques cités ci-dessus (Fig. 72). Dans nos conditions d'induction, ces structures présentent un contenu majoritairement constitué de cytosol. Cependant on observe, de manière relativement rare, certains organites présents à l'intérieur de ces structures comme des Golgi ou des mitochondries. On observe également au niveau de ces structures que les deux membranes ne sont pas accolées et délimitent un espace dont la taille varie. Le contenu de cet espace inter-membranaire est non opaque aux électrons et semble dépourvu de structures protéiques et de membranes.

Pour nous assurer de l'identité de ces structures, nous avons mené le même type d'approche sur des pointes racinaires de plantules *atg5-1*, mutées pour la protéine ATG5. Chez ce mutant, déficient en autophagie, il nous est cependant arrivé d'observer des structures réunissant les critères utilisés précédemment pour décrire les autophagosomes (Fig. 73A).

Ces résultats remettent en question la fiabilité des critères morphologiques pour identifier formellement les autophagosomes. Ces observations doivent alors être complétées par la reconnaissance de marqueurs spécifiques d'autophagosomes tels que ATG8.

atg5-1

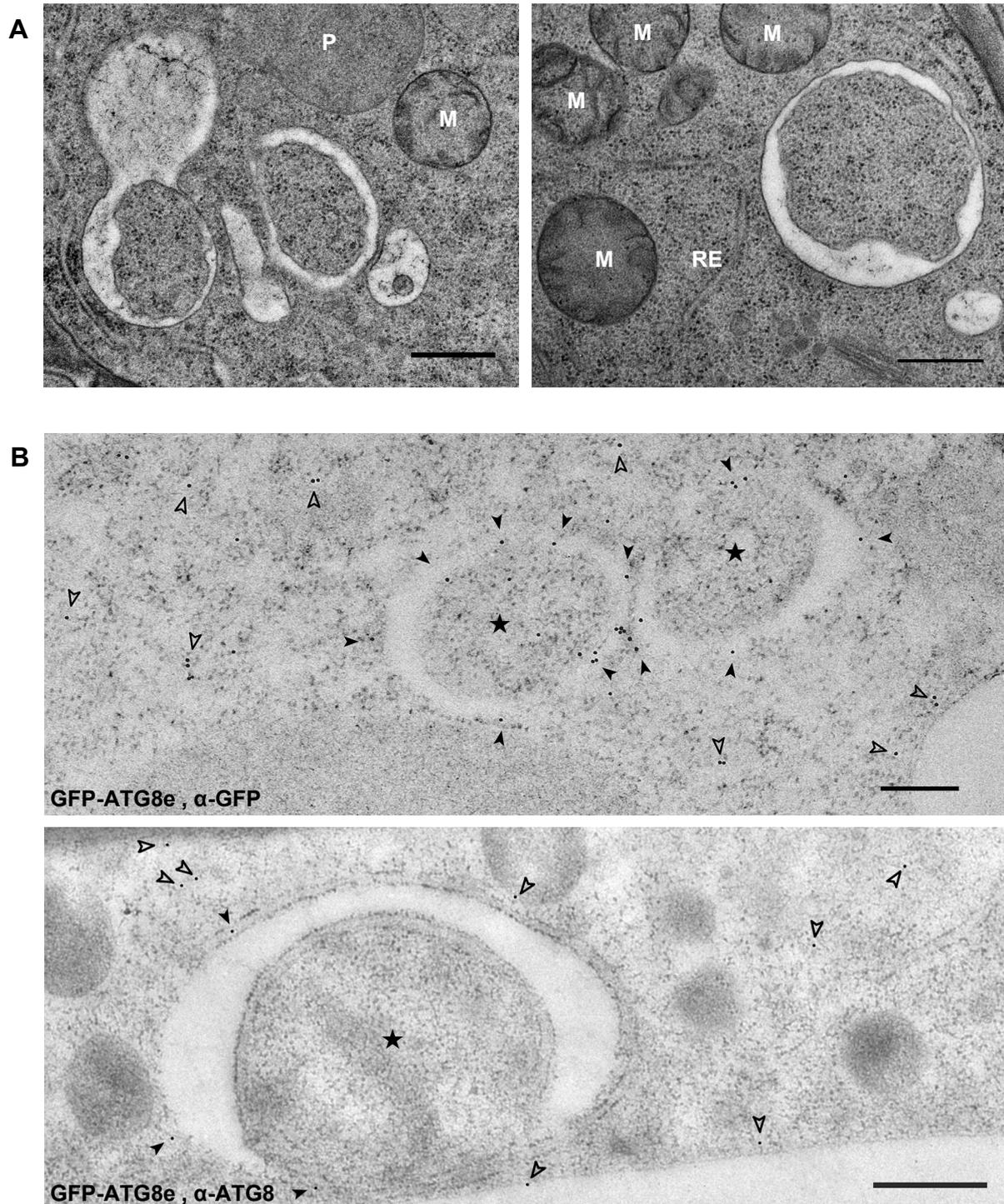


Figure 73 : Ultrastructure du mutant *atg5-1* et immunomarquage de ATG8

(A) Etude ultrastructurale des mutants *atg5-1* (cryofixation, résine Epoxy). (B) Immuno-détection d'autophagosomes dans les racines GFP-ATG8f avec un anticorps α -GFP (cryofixation, résine LR White) ou α -ATG8 (cryofixation, résine HM20). M : Mitochondrie, P : Plaste, RE : Réticulum Endoplasmique, ★ : Possible autophagosome, ▶ : Marquage membranaire, ▷ : Marquage cytosolique. Echelle : 0,5 μ m.

Microscopie électronique en transmission

1.6.2. Approche par immunomarquage

Des approches d'immunomarquage à l'or ont donc été menées. Nous avons utilisé des anticorps dirigés contre ATG8 ou contre la GFP pour détecter respectivement la protéine ATG8 (endogène ou chimérique) ou la fusion GFP-ATG8. Ces deux approches donnèrent des résultats similaires : malgré un marquage diffus au niveau du cytoplasme, les billes sont détectées plus fréquemment autour de structures à double membrane (Fig. 73B). La présence de nombreuses billes au niveau du cytoplasme, ainsi qu'au niveau de la vacuole parfois, rend délicate l'interprétation de ces résultats, ainsi que l'identification formelle de ces structures. ATG8 étant une protéine abondante dans le cytosol, liée à la membrane de l'autophagosome lors de sa formation, puis dégradée au niveau de la vacuole, il n'est pas surprenant de se trouver en présence d'un marquage distribué à la fois dans le cytoplasme la vacuole et sur les structures autophagiques.

Les approches de microscopie électronique, basées sur une reconnaissance morphologique ou par immunomarquage des autophagosome, ne nous ont pas permis d'identifier de façon certaine les autophagosomes, et la difficulté à trouver ces structures rendent ce travail très laborieux.

Afin d'étudier les autophagosomes à l'échelle ultrastructurale, nous nous sommes intéressés également à une autre approche : la microscopie corrélative.

1.6.3. Utilisation de la microscopie corrélative

La microscopie corrélative permet d'identifier le même objet sous deux systèmes optiques différents. Dans notre cas, nous avons cherché à superposer les marquages spécifiques obtenus en imagerie de fluorescence avec les structures subcellulaires observées en microscopie électronique en transmission. Pour cela, nous avons choisi de combiner les protocoles permettant à la fois de conserver la fluorescence de la GFP et de préserver la morphologie des structures cellulaires en MET. La fluorescence repérée en microscopie photonique sera alors corrélée avec les images de MET.

A la suite du test de différentes méthodes de fixation et d'inclusion, effectué au laboratoire, et les meilleurs résultats ont été obtenus grâce à la méthode de Tokuyasu

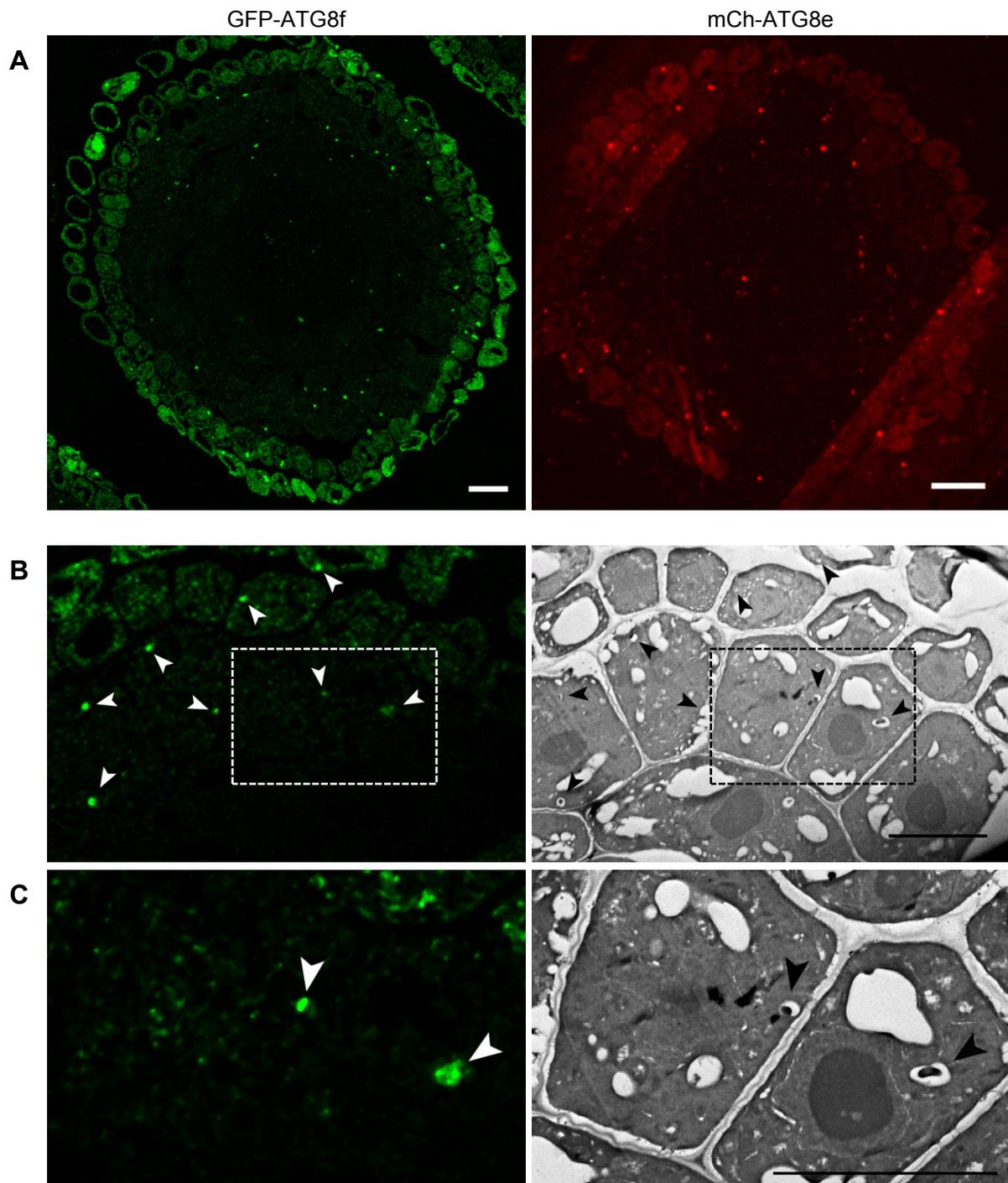


Figure 74 : Etude ultrastructurale des autophagosomes par microscopie corrélative

(A) Observation de coupes ultra-fines de racine provenant de plantules GFP-ATG8f ou mCh-ATG8e. La méthode de Tokuyasu permet de conserver la fluorescence de la GFP et de mCherry. (B) Coupe ultra-fine de racine GFP-ATG8f observée en microscopie confocale puis ensuite en microscopie électronique en transmission. (C) Grossissement de la région indiquée en (B). Echelle : 10 μ m.

Méthode de Tokuyasu, Microscopie Confocale, Microscopie électronique en transmission

(Tokuyasu 1973). Cette méthode permet la cryo-coupe d'échantillons préalablement fixés et enrobés dans la glace par plongeon dans l'azote liquide. Cette approche permet de s'affranchir des inclusions conventionnelles dans des résines, qui, dans notre cas, ne permettait pas de conserver la fluorescence de la GFP. L'imprégnation préalable de la racine dans une solution hautement concentrée en saccharose (cryoprotectant) avant cryo-enrobage permet d'améliorer la conservation des structures subcellulaires pendant la congélation. L'échantillon enrobé peut ensuite être débité en coupes ultrafines par cryoultramicrotomie, déposées sur grilles pour MET, observées en microscopie confocale, puis en MET.

Bien que l'autofluorescence caractéristique des tissus végétaux soit toujours présente sur coupes, il a été possible de conserver la fluorescence des protéines rapporteurs couplées à ATG8, que ce soit la GFP ou mCherry (Fig. 74A, 74B). Ensuite nous avons pu observer au MET que ces structures marquées par GFP-ATG8 correspondent bien à des vésicules à double membrane, similaires à celles observées précédemment (Fig. 74C). Grâce à la microscopie corrélative, nous sommes désormais en mesure d'identifier les autophagosomes, ainsi que tout autre évènement ou compartiment détectable grâce à sa fluorescence en microscopie photonique. De plus, le fait de pouvoir observer dans un premier temps les échantillons en fluorescence nous permet de "screener" un nombre important d'échantillons en un temps relativement court, à la recherche d'évènements rares.

En conclusion, les études de microscopie corrélative effectuées au laboratoire, confirment que les structures marquées par GFP-ATG8 correspondent à des autophagosomes, définis par des critères de taille, présence de double membrane, et aspect du contenu comme recommandé dans la littérature.

1.6.4. Bilan des études ultrastructurales

Dans la cellule végétale, les études sur le mutant *atg5* dépourvu d'autophagosomes, mettent en garde sur la fiabilité d'identification d'autophagosomes sur des critères morphologiques. Plusieurs hypothèses peuvent en fait expliquer cette observation, à première vue contradictoire. Dans une première hypothèse, on peut spéculer que chez le mutant *atg5*, il se forme toujours quelques autophagosomes. Cependant, l'anticorps α -ATG8 ne permet d'identifier aucune structure de type autophagosome dans les cellules de racine d'*atg5*, et le

blocage de la dégradation des autophagosomes par la concanamycine A ne provoque aucune accumulation de corps autophagiques dans la vacuole chez ce mutant. Ces résultats suggèrent que s'il subsiste des autophagosomes chez le mutant *atg5*, ceux-ci sont dépourvus d'ATG8 et ne fusionnent pas à la vacuole, ce qui semble peu probable. Dans une seconde hypothèse, on peut estimer que les structures observées chez le mutant *atg5* ne sont pas des autophagosomes. Cette seconde hypothèse, longtemps spéculative, rejoint les récents travaux sur les structures impliquées dans la formation des vacuoles chez *Arabidopsis* (Viotti, Krüger et al. 2013). En effet Viotti *et al.*, ont mis en évidence qu'au niveau des cellules méristématiques de la pointe racinaire d'*Arabidopsis*, la formation de la vacuole résulte de la fusion de compartiments intermédiaires, les provacuoles, qui ont une morphologie très proche de celle des autophagosomes. En effet les provacuoles sont des structures à double membrane, souvent semi-circulaires, cependant leur formation est indépendante de la machinerie de l'autophagie et ces structures ne sont pas marquées par ATG8.

Il est donc fort probable que dans les lignées sauvages, au niveau de la pointe racinaire, on observe des autophagosomes ainsi que des provacuoles sans pouvoir les différencier en se basant sur des critères morphologiques, cependant seules les provacuoles sont présentes chez le mutant *atg5*.

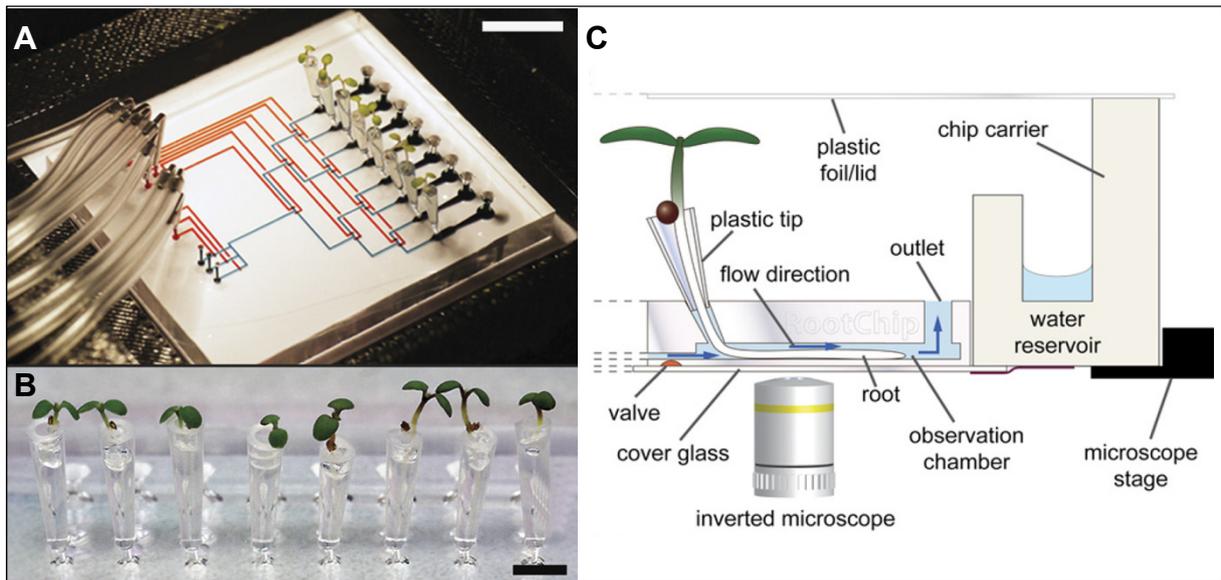


Figure 75 : La "RootChip"

(A) Vue d'ensemble de la "RootChip", où l'on peut distinguer le système de micro-fluidique, coloré en rouge et bleu ainsi que les 8 plantules d'Arabidopsis insérées *via* des cônes dans la chip (B). Echelle : 0,5 cm. (C) Schéma technique de la "RootChip" pour l'observation au microscope.

(Grossmann *et al.*, 2011)

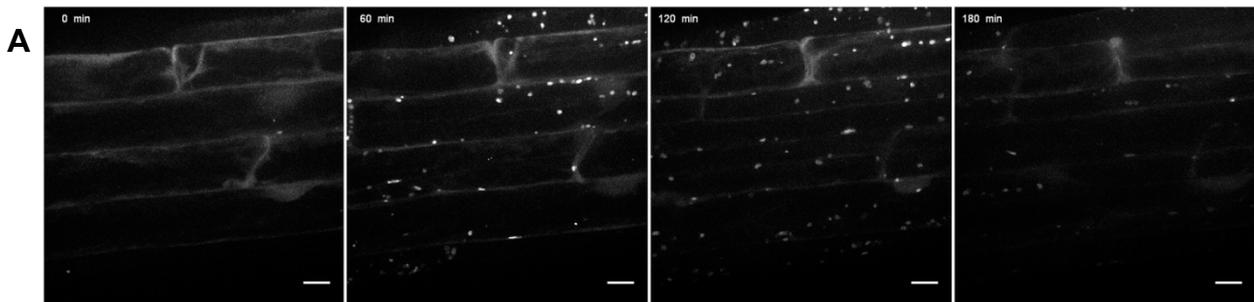
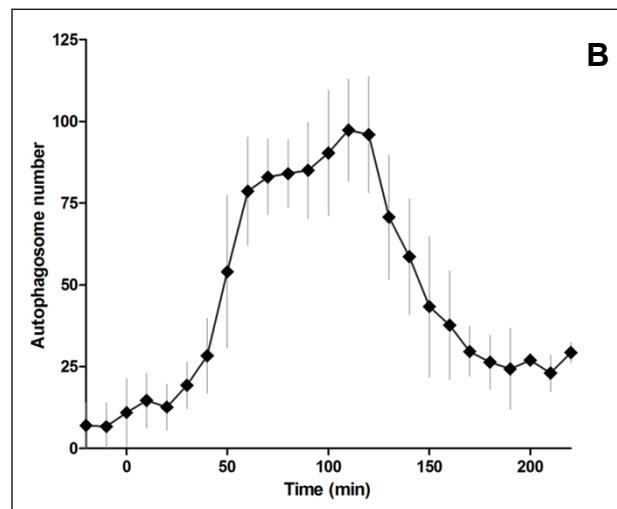


Figure 76 : Cinétique d'induction de l'autophagie *via* la RootChip

(A) Observation d'une zone fixe de racine d'Arabidopsis GFP-ATG8f, après perfusion dans la RootChip d'un milieu carencé en nutriments ($\frac{1}{2}$ MS-N-C). MIPs ($30 \mu\text{m}$), échelle $10 \mu\text{m}$. (B) Quantification de l'augmentation du nombre d'autophagosomes par champ ($114 \times 114 \times 30 \mu\text{m}$). Les valeurs représentent la moyenne de trois champs différents avec les écarts types correspondants.

RootChip + Spinning Disk



2. Caractérisation de l'induction de l'autophagie lors d'une carence nutritionnelle

Une fois établies les conditions optimales pour l'observation de l'autophagie, nous nous sommes efforcés d'affiner la caractérisation de la réponse autophagique à une carence nutritionnelle.

2.1. Etude cinétique de l'autophagie

2.1.1. Cinétique de l'induction par carence nutritionnelle

Afin de mieux comprendre la dynamique d'induction de l'autophagie dans nos conditions de carence nutritionnelle, nous nous sommes intéressés à la cinétique d'apparition des autophagosomes. Pour rendre possible l'observation et d'étude de la variation du nombre d'autophagosomes présents au sein d'une même racine au cours de la carence nutritionnelle, tout en limitant au maximum les effets parasites de stress mécaniques et des stress liés à l'hypoxie, nous nous sommes impliqués dans l'adaptation d'un dispositif de microfluidique : la "RootChip". Ce dispositif, développé à l'université de Stanford, Californie (Grossmann, Guo et al. 2011), permet la culture de plantules d'*Arabidopsis* sur un support, adapté à l'observation directe par microscopie inversée. Cette "RootChip" est également reliée à un système de microfluidique, permettant de perfuser et de changer très rapidement le milieu de culture (Fig. 75). Ce système intégré, rends possible non seulement l'observation des plantules sans avoir à les changer d'environnement, mais également la modification des conditions de culture sans perturber l'observation de l'échantillon.

La mise au point de ce système n'est, au jour d'aujourd'hui, pas encore totalement terminée et il reste quelques ajustements à apporter, cependant nous avons obtenu quelques résultats préliminaires qui semblent prometteurs.

En effet les premières observations montrent que les plantules cultivées sur la "RootChip" présentent des niveaux d'autophagie basale similaires à ceux observés chez les plantules cultivées en milieu riche ($\frac{1}{2}$ MS) avec les précautions évoquées précédemment. Ce

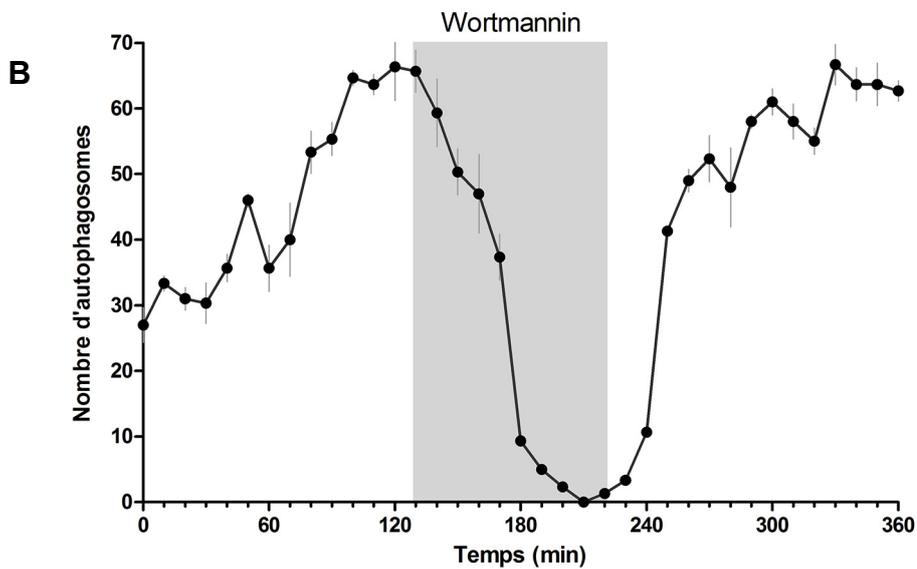
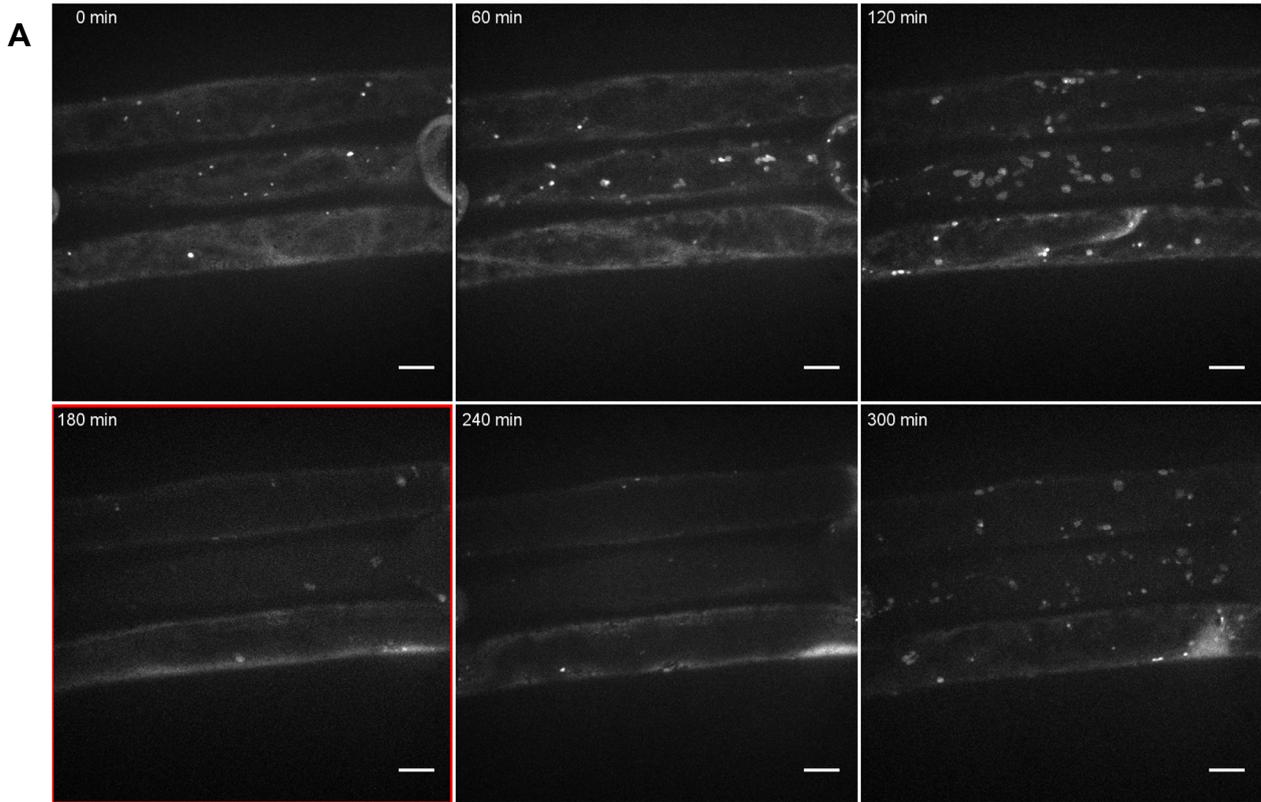


Figure 77 : Cinétique d'inhibition de l'autophagie par la wortmannine

(A) Observation de cellules épidermiques racinaires, différenciées, de plantules GFP-ATG8f.

A t:0, on perfuse dans la "RootChip" un milieu carencé pour induire l'autophagie. Après 120 min on ajoute de la wortmannine, pendant 90 minutes (encart rouge), puis on perfuse de nouveau avec du milieu carencé pour laver la drogue. MIPs (20 μ m), échelle : 10 μ m. (B) Quantification de l'effet de la wortmannine sur le nombre d'autophagosomes par champ (114 x 114 x 20 μ m). Les valeurs représentent la moyenne de trois comptages sur le même champ avec les écarts types correspondants.

RootChip + Spinning Disk

premier résultat confirme que la "RootChip" est un dispositif adaptée à l'étude d'un processus aussi sensible que l'autophagie.

Lorsque les plantes sont soumises à une carence nutritionnelle ($\frac{1}{2}$ MS-N-C), on observe environ 20 min après le changement de milieu perfusé, une augmentation du nombre d'autophagosome (Fig. 76). Cette augmentation du nombre d'autophagosome se poursuit pendant les deux heures qui suivent la carence puis atteint son maximum. Ensuite, après ce pic d'induction de l'autophagie on assiste à une diminution du nombre d'autophagosomes, cependant, on peut remarquer que le niveau d'autophagie observé après le pic reste supérieur au niveau basal initial.

Ces derniers résultats montrent que l'induction de l'autophagie est un processus très réactif et dont le niveau est finement régulé. Ces résultats sont concordants avec ceux précédemment obtenus classiquement entre lame et lamelle, où l'induction de l'autophagie était déjà observée dès 1 h de carence et le nombre de structures observées semblait diminuer progressivement au cours des longues périodes de carence (au-delà de 4 h).

2.1.2. Cinétique de l'inhibition par la wortmannine

Nous avons ensuite cherché à mesurer la cinétique de réaction des flux autophagiques à un inhibiteur de la formation des autophagosomes. Chez les animaux, différents inhibiteurs de l'autophagie sont couramment utilisés, comme la wortmannine (Blommaart, Krause et al. 1997), et le 3-méthyladénine (Wu, Tan et al. 2010). Bien que non spécifiques pour l'autophagie, ces deux inhibiteurs des PI3-Kinases, bloquent la formation des autophagosomes, en inhibant le fonctionnement du complexe contenant Vps34.

Nous nous sommes principalement intéressés à l'effet de la wortmannine sur l'autophagie chez *Arabidopsis*. Le système de la "RootChip", nous a permis de suivre l'impact de la drogue sur la formation des autophagosomes.

L'exemple présenté Fig. 77, détaille une cinétique de réponse. La carence nutritionnelle ($\frac{1}{2}$ MS-N-C) infligée au début de l'observation provoque une induction de l'autophagie dont le maximum se situe autour de 120 min. A ce moment précis, on change le milieu perfusé par un milieu identique contenant de la wortmannine (30 μ M). Très rapidement

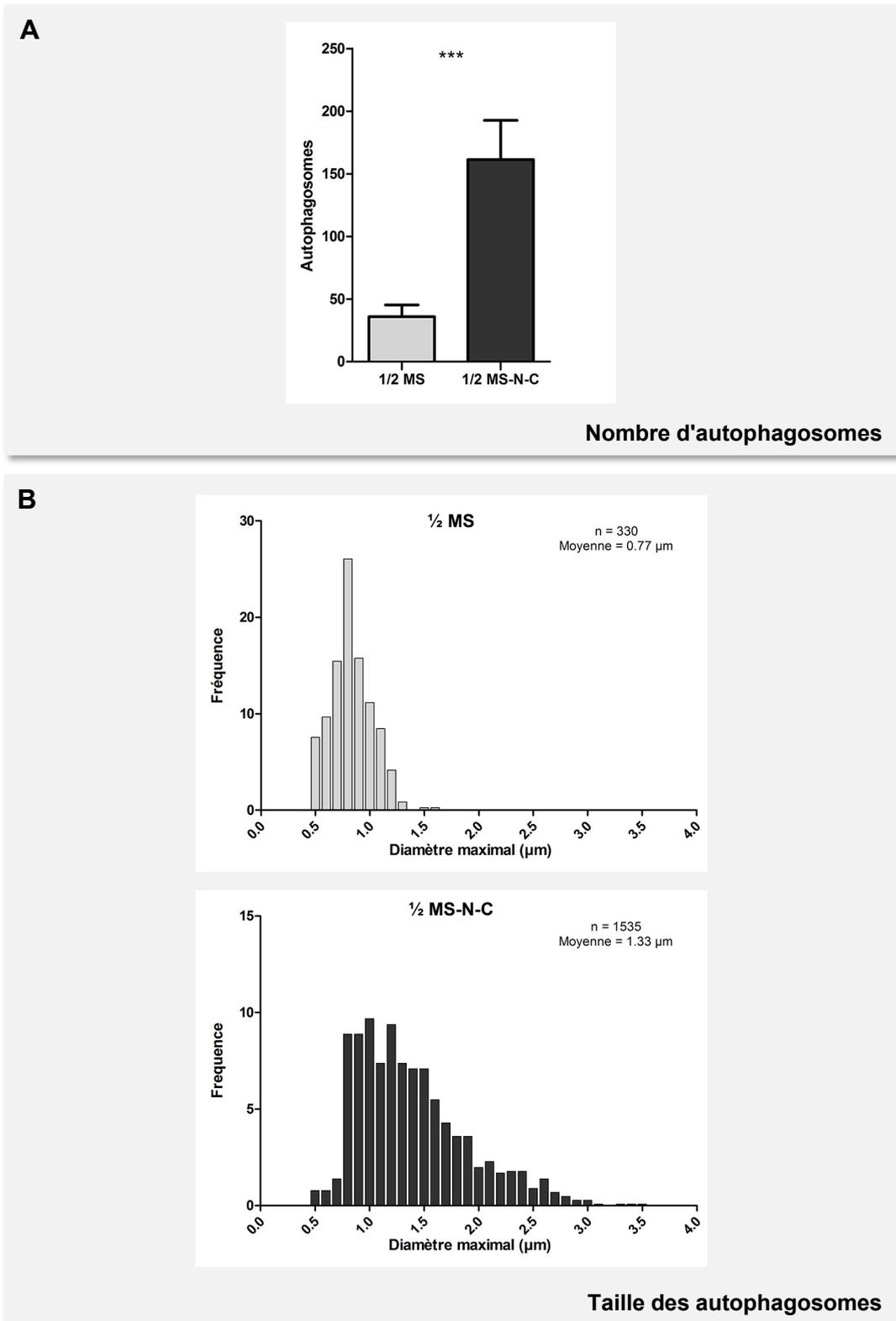


Figure 78 : Impact de l'induction de l'autophagie par carence nutritionnelle sur le nombre et la taille des autophagosomes

(A) Quantification du nombre d'autophagosomes par champ d'observation (114 x 114 x 50 μm). Test statistique : Mann Whitney; *** = P<0.0001, écarts-types. (B) Distribution des fréquences des autophagosomes en fonction de leur diamètre maximum. Carence nutritionnelle : 1h en milieu 1/2 MS-N-C et à l'obscurité.

on observe une diminution du nombre d'autophagosomes, et au bout de 50 min très peu d'autophagosomes sont observables, malgré les conditions de carence. Enfin, alors que tous les autophagosomes ont disparu, le milieu carencé est de nouveau perfusé afin d'évaluer la réversibilité de l'inhibition. Très rapidement après le lavage de la wortmannine la formation des autophagosomes reprend, et au bout de 1 h 30, on retrouve le niveau maximal du nombre d'autophagosomes présent avant l'ajout de l'inhibiteur.

Ce résultat suggère qu'en combinant la "RootChip" et la wortmannine, on dispose d'un système permettant de synchroniser et de déclencher la formation d'autophagosomes, ce qui dans un futur proche pourrait s'avérer très utile pour l'étude de la formation de ces structures.

2.2. Caractérisation des autophagosomes induits par une carence nutritionnelle

Afin d'identifier et de mieux comprendre les processus mis en place lors de l'induction de l'autophagie par une carence nutritionnelle, nous nous sommes intéressés à caractériser l'évolution de leur nombre, taille et dynamique.

2.2.1. Augmentation du nombre et de la taille des autophagosomes

Le paramètre le plus visiblement affecté au cours de cette induction est sans aucun doute l'augmentation du nombre d'autophagosomes (environ d'un facteur 5) après 1 h de croissance en milieu carencé (Fig. 78A).

Cette augmentation du nombre d'autophagosomes s'accompagne également d'un changement de taille de ces structures (Fig. 78B). Dans des conditions non induites, les rares autophagosomes observés sont de petites structures d'apparence sphérique, dont le diamètre maximal est strictement inférieur à 1,5 μm et pour 75 % d'entre eux inférieur à 1 μm . En condition de carence nutritionnelle on observe une augmentation de la taille moyenne de ces structures : 80 % des structures observées ont désormais un diamètre maximal supérieur à 1 μm et certaines peuvent atteindre un diamètre de 3,5 μm .

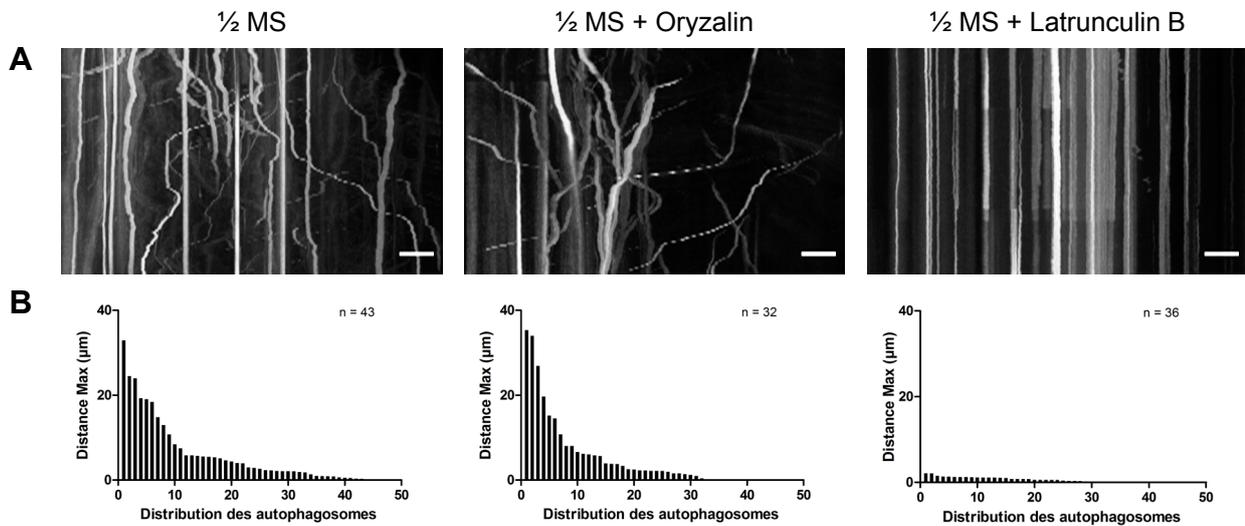


Figure 79 : Implication du cytosquelette dans la dynamique des autophagosomes

(A) Kymographes mettant en évidence la dynamique des autophagosomes en conditions contrôles ($\frac{1}{2}$ MS), après traitement par l'oryzalin (1h; 20 μM) ou la latrunculine B (1h; 10 μM). Echelle : 10 μm . (B) Distribution des autophagosomes en fonction de la distance maximale parcourue en 2 min, dans les différentes conditions.

Spinning Disk

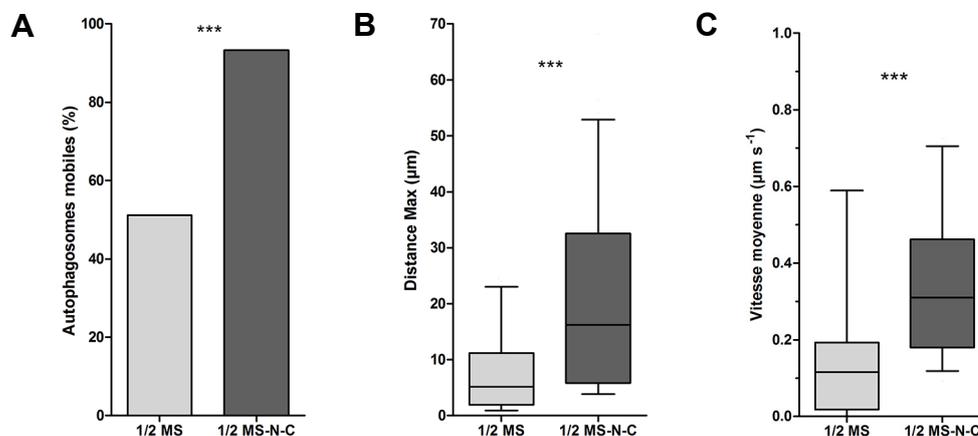


Figure 80 : Evolution de la dynamique des autophagosomes lors de l'induction de l'autophagie

Comparaison de la dynamique des autophagosomes dans des conditions contrôles ($\frac{1}{2}$ MS, 1h, n = 43) et en condition de carence nutritionnelle ($\frac{1}{2}$ MS-N-C, 1h, n = 45) (A) Etude de la fraction des autophagosomes mobiles (distance max > 1,5 $\mu\text{m min}^{-1}$). Test statistique : χ^2 . (B) Représentation des distances maximales parcourues par les autophagosomes de la fraction mobile en 2 min. Test statistique : Mann Whitney. (C) Représentation des vitesses moyennes des autophagosomes de la fraction mobile. Test statistique : Mann Whitney. Box plot : le rectangle représente la dispersion de 50% des valeurs autour de la moyenne et les barres représentent la distribution de 80% des données. *** = $P < 0.0001$.

Ces résultats montrent que lors de l'induction de l'autophagie la formation des autophagosomes est fortement modifiée, que ce soit d'un point de vue quantitatif mais également d'un point de vue qualitatif, avec la formation d'autophagosomes plus volumineux.

2.2.2. Modification de la dynamique des autophagosomes

Les autophagosomes observés en conditions basales ou en condition d'induction de l'autophagie, sont des structures très mobiles, cependant, au jour d'aujourd'hui, il n'existe aucune donnée concernant la dynamique des autophagosomes chez les plantes. Alors que chez les mammifères, les microtubules facilitent le trafic des autophagosomes, afin de rendre plus efficace leur fusion avec les lysosomes (Köchler, Hu et al. 2006), chez la levure, les microtubules ne semblent pas impliqués dans l'autophagie (Kirisako, Baba et al. 1999). Bien que le rôle de l'actine ait été mis en évidence dans les étapes de formation de l'autophagosome chez les mammifères (Aguilera, Berón et al. 2012) ainsi que dans certains types d'autophagie sélective chez la levure (Reggiori, Monastyrska et al. 2005), son implication dans la dynamique des autophagosomes, n'a pour le moment pas été mise en évidence.

Afin de déterminer l'implication des différents éléments du cytosquelette dans la dynamique des autophagosomes chez les plantes, nous avons étudié l'effet de différents inhibiteurs du cytosquelette sur la dynamique des autophagosomes.

De précédents travaux montrent que *in vitro* ATG8 a la capacité de se lier aux microtubules de la cellule végétale (Ketelaar, Voss et al. 2004), Nous avons donc tout d'abord testé l'effet de l'oryzaline, qui en piégeant les monomères de tubuline, provoque la disparition des microtubules. 1 h de traitement par l'oryzaline (20 μ M), est suffisant pour provoquer la disparition totale du réseau de microtubules, cependant, la dynamique des autophagosomes ne semble pas affectée (Fig. 79A). En effet, lorsque l'on compare les distances maximales parcourues par les autophagosomes, aucune différence significative n'est observée avec les conditions contrôles (Fig. 79B). Ce résultat montre que les microtubules ne jouent pas un rôle essentiel dans la dynamique des autophagosomes chez *Arabidopsis*.

Dans la cellule végétale, la dynamique des compartiments membranaires est majoritairement associée à l'actine. Nous avons donc testé l'effet de la Latrunculine B, inhibiteur de la formation de filaments d'actine. Après 1 h de traitement par la Latrunculine B (10 μM), on observe une disparition totale de la dynamique des autophagosomes. Cette disparition s'accompagne également par la disparition du courant cytoplasmique, caractéristique des cellules végétales, figeant ainsi l'intégralité de la cellule (Fig. 79). Le fait que la disparition des filaments d'actine perturbe la dynamique des autophagosomes, est un résultat attendu, tant l'actine joue un rôle prépondérant dans une grande majorité des événements dynamique de la cellule. L'actine est donc essentielle à la dynamique des autophagosomes, cependant nous ne sommes pas en mesure de dire si les autophagosomes interagissent, directement ou indirectement, avec l'actine, ou bien si la dynamique des autophagosomes résulte du courant cytoplasmique généré par le déplacement d'organites le long des filaments d'actine (Shimmen 2007).

Afin de déterminer si l'induction de l'autophagie provoque une modification de la dynamique des autophagosomes, nous avons étudié différents paramètres, dans des conditions riches et dans des conditions de carence nutritionnelle. Nous avons observé que la proportion d'autophagosomes immobiles était réduite en cas de carence nutritionnelle. Pour quantifier cela, nous avons fixé un seuil afin de discriminer les autophagosomes mobiles et immobiles. La valeur de ce seuil a été fixée à la plus haute valeur de distance maximale mesurée en présence de latrunculine B, afin de s'affranchir des éventuels mouvements résultant de la vibration des autophagosomes. Nous avons donc quantifié la proportion d'autophagosomes ayant un déplacement maximal supérieur à $1,5 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$, et alors que dans des conditions riches, 51 % des autophagosomes sont mobiles, dans des conditions où il y a induction de l'autophagie, cette population passe à 93 % (Fig. 80A). Cette forte augmentation de la proportion d'autophagosomes mobiles, s'accompagne également d'une augmentation de la vitesse ainsi que de la distance maximale parcourue par ces structures en conditions d'induction de l'autophagie (Fig. 80B, 80C). Comme précédemment, on ne peut affirmer si ces changements de dynamique, traduisent un effet direct ou indirect du cytosquelette sur les autophagosomes ou si les autophagosomes subissent des modulations éventuelles du courant cytoplasmique.

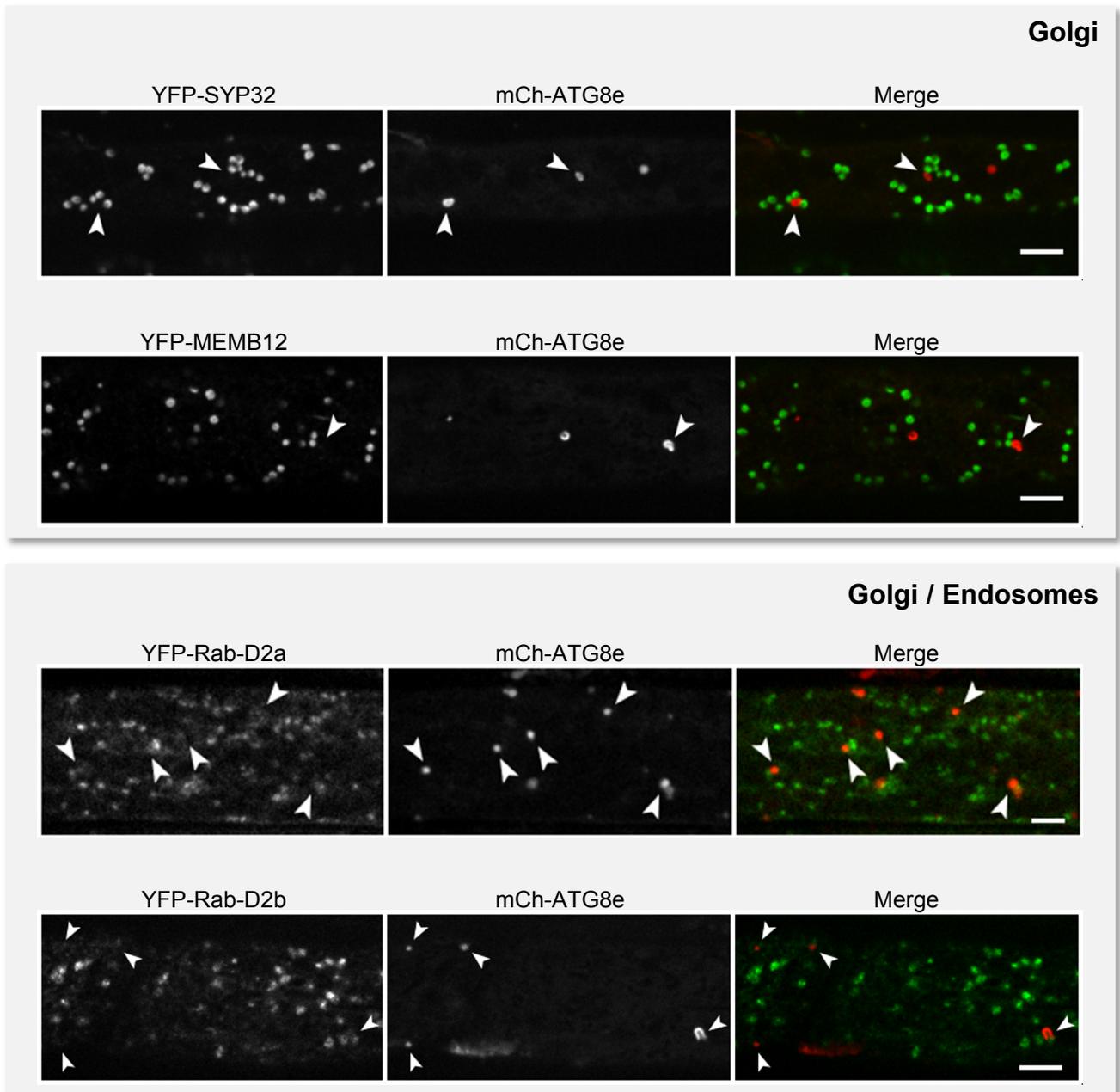


Figure 81 : Recherche d'évènements de colocalisation entre les autophagosomes et différents marqueurs du système endomembranaire

Observation de lignées exprimant de manière stable mCh-ATG8e et différents marqueurs des compartiments du système endomembranaire. Racines observées après une carence nutritionnelle. Seul quelques interactions sont observées. Autophagosomes (▶). Echelle : 5 μ m.

Spinning Disk

La mobilité des autophagosomes, comme celle de tous les compartiments endomembranaires chez les plantes, est liée au cytosquelette d'actine. En conditions d'induction de l'autophagie, leur mobilité se retrouve fortement accrue.

3. Recherche d'interactions avec le système endomembranaire

Chez les mammifères, il a été démontré que les autophagosomes ont la possibilité d'interagir avec différents acteurs du système endomembranaire, soit en fusionnant avec des endosomes pour former des amphisomes, soit avec des lysosomes pour former des autolysosomes (Fader and Colombo 2008). Chez les plantes, on connaît très peu de choses sur les interactions entre système endomembranaire et formation des autophagosomes, c'est pourquoi, nous avons tenté d'identifier des connections entre la machinerie moléculaire associée aux endomembranes et ATG8.

Pour cela, nous avons effectué des croisements afin de générer des plantes exprimant de manière stable mCherry-ATG8e et différents marqueurs, couplés à la YFP, provenant des lignées Wave (Geldner, Dénervaud-Tendon et al. 2009), qui constituent un outil permettant d'identifier de nombreux compartiments cellulaires.

Nous avons tout d'abord étudié les interactions entre le Golgi et les autophagosomes. Pour cela nous avons utilisé deux marqueurs différents : SYP32 et MEMB12, appartenant à la famille des SNARES et localisées toutes les deux au niveau de l'appareil de Golgi (Uemura, Ueda et al. 2004). L'observation des plantes co-exprimant ATG8 et l'un ou l'autre de ces marqueurs du Golgi, a permis de mettre en évidence qu'il n'y a aucune colocalisation entre ces différents compartiments (Fig. 81). Cependant on observe parfois des contacts entre les autophagosomes et les Golgi.

Ensuite nous nous sommes intéressés à deux marqueurs permettant de visualiser les événements précoces de la voie de sécrétion : Rab-D2a et Rab-D2b. Ces protéines Rab, qui sont de petites GTPases présentes au niveau des membranes des compartiments endomembranaires, vont jouer un rôle important dans l'acquisition d'une identité membranaire et vont également permettre de réguler le trafic vésiculaire. Rab-D2a et Rab-D2b

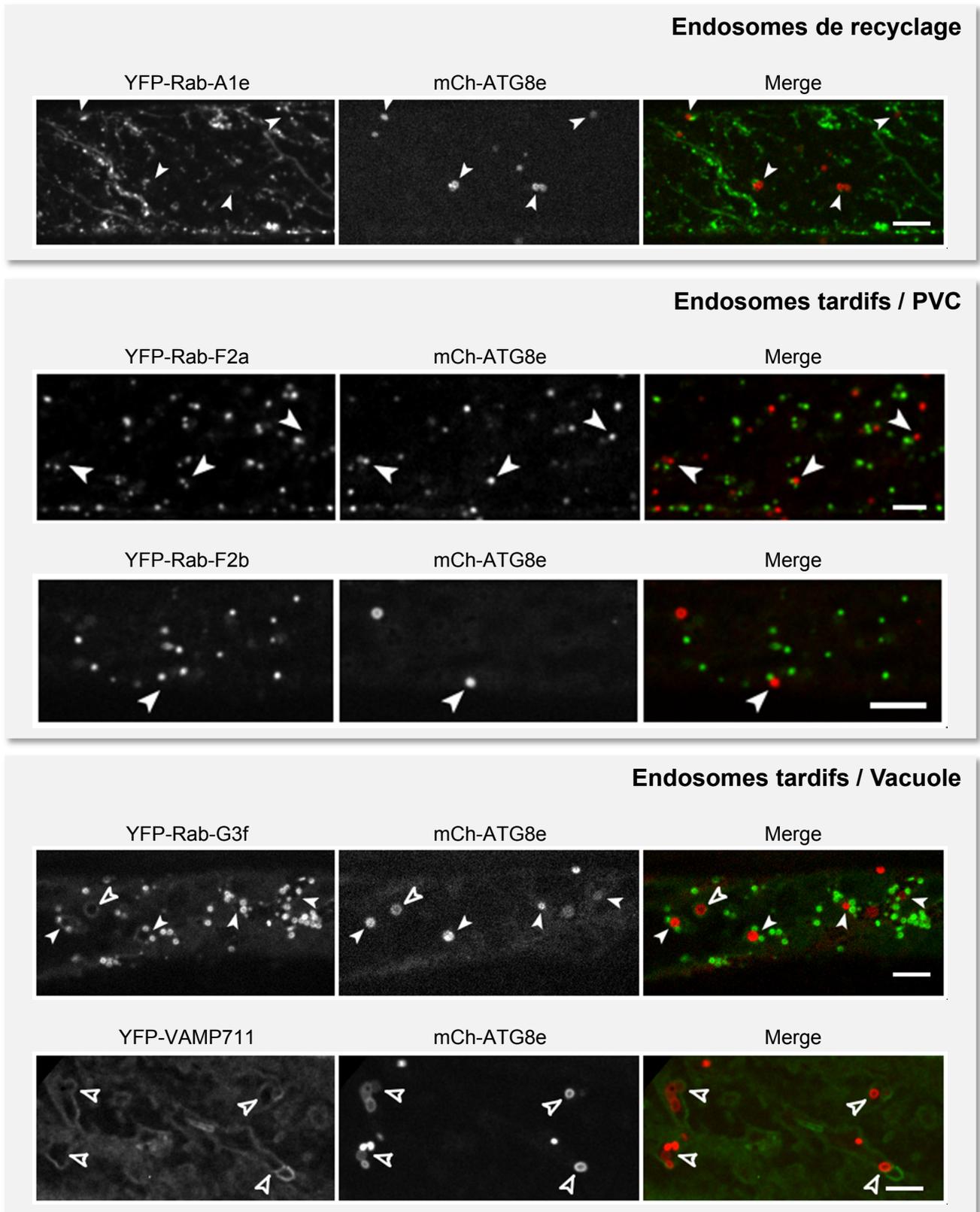


Figure 82 : Recherche d'évènements de colocalisation entre les autophagosomes et différents marqueurs du système endomembranaire

Observation de lignées exprimant de manière stable mCh-ATG8e et différents marqueurs des compartiments du système endomembranaire. Racines observées après une carence nutritionnelle. Autophagosomes (▶). Certaines déformations de la membrane vacuolaire, provoquées par la présence des autophagosomes sont observées (▷). Echelle : 5 µm.

(homologues de Rab1 chez les mammifères), jouent un rôle important dans le transport entre le RE et le Golgi, et sont localisées majoritairement au niveau du Golgi mais également au niveau du trans-Golgi network, parfois assimilé aux endosomes précoces (Pinheiro, Samalova et al. 2009). Les observations de plantes co-exprimant ATG8 et l'un ou l'autre de ces marqueurs précoce de la voie de sécrétion, n'ont pas mis en évidence d'évènements de colocalisation (Fig. 81). On observe cependant souvent des agrégats de structures marquées par Rab-D2a ou Rab-D2b en contact avec des autophagosomes.

Ces premiers résultats montrent que ni les structures précoces impliquées dans la voie de sécrétion ni les Golgi ne colocalisent avec les autophagosomes. Cependant, ces deux types de structures sont parfois observées en contact avec les autophagosomes, sans que l'on puisse dire si ces contacts traduisent une interaction spécifique entre ces structures.

Nous nous sommes ensuite également intéressés à une autre population d'endosomes, grâce au marqueur Rab-A1e. Cette Rab est présente au niveau d'une catégorie d'endosomes qui est partiellement marqué par le FM4-64 et qui s'agrège complètement lors d'un traitement avec la Bréfeldine A, ce qui laisse penser que ce sont des endosomes de recyclage (Geldner, Dénervaud-Tendon et al. 2009). Ces endosomes sont des structures extrêmement mobiles, et ici, aucun évènement de colocalisation avec des autophagosomes n'a pu être mis en évidence lors de leur croisement avec ATG8 (Fig. 82).

Enfin nous avons décidé de nous intéresser à des structures plus tardives de la voie d'endocytose, les compartiments pré-vacuolaires (PVC). Les PVC chez les plantes correspondent aux MVB ou aux endosomes tardifs, et jouent un rôle important dans le trafic vers la vacuole. Rha1/Rab-F2a et ARA7/Rab-F2b sont des homologues de Rab5 chez les mammifères, et chez *Arabidopsis* on les retrouve au niveau des PVC (Lee, Sohn et al. 2004). L'observation des lignées co-exprimant ATG8 et ces marqueurs des PVC, ne permet pas de d'identifier de colocalisation de ces marqueurs sur une même structure (Fig. 82). Cependant, on observe de nouveau un nombre très élevé d'évènements de contact entre les autophagosomes et ces structures tardives de la voie d'endocytose.

Pour terminer nous avons également étudié la localisation cellulaire de VAMP711 et RabG3f qui sont localisés au niveau de la membrane de la vacuole ainsi que sur des structures de type endosomes tardifs pour RabG3f (Geldner, Dénervaud-Tendon et al. 2009).

L'observation des lignées co-exprimant ATG8 et ces marqueurs montrent clairement qu'il n'y a pas de colocalisation entre ces compartiments (Fig. 82). On remarque qu'au niveau des cellules en différenciation les autophagosomes sont en permanence en contact avec la membrane vacuolaire, car cette dernière occupe la quasi-totalité du volume cellulaire et plaque les autres structures cellulaires contre la membrane plasmique.

Pour conclure, cette étude menée avec de nombreux marqueurs de différents acteurs du système endomembranaire, n'a pas permis de mettre en évidence des évènements de colocalisation avec les autophagosomes. En effet aucun de ces marqueurs n'a été observé au niveau de la membrane de l'autophagosome, ce qui confirme que la formation de l'autophagosome est un mécanisme spécifique et que la voie autophagique est une voie à part au sein du trafic intracellulaire. Cependant de nombreux évènements de contacts ont été observés avec plusieurs de ces marqueurs; une étude plus approfondie de ces interactions pourrait cependant révéler certaines connexions entre la voie autophagique et les autres voies du trafic intracellulaire.

4. Bilan

Lors de cette première partie du travail, nous avons apporté un soin tout particulier à définir les modèles, les marqueurs, les conditions de cultures et les méthodes d'observations les plus adaptées à l'étude de l'autophagie chez les plantes.

Nos premières observations et notre recherche du niveau basal de l'autophagie dans la racine d'*Arabidopsis thaliana*, nous ont permis de prendre conscience que ce processus était présent à un niveau basal très faible, lorsque les conditions sont optimales, mais que de nombreux paramètres environnementaux pouvaient induire son induction de manière importante. La racine d'*Arabidopsis* étant un organe extrêmement sensible aux variations environnementales, et aux stress mécaniques, la culture et la manipulation des plantules se sont avérées un élément clé nécessaire de contrôler pour disposer d'une base solide pour la suite de ce travail.

De nombreuses études concernant les différentes isoformes de ATG8 chez *Arabidopsis* ont permis de montrer que celles-ci sont présentes de manière variable en fonction des tissus, suggérant qu'elles puissent jouer des rôles différents. Lors de ce travail, nous avons montré que ATG8e et ATG8f, qui sont les isoformes les plus présentes au sein de la racine, étaient présentes sur les mêmes autophagosomes. Les approches par immunodétection de ATG8 ont montré que GFP-ATG8f était présent sur les structures marquées par cet anticorps. Même si on ne peut affirmer que ATG8f est présent sur tous les autophagosomes présents au niveau de la racine, nous avons de bonnes raisons de penser, grâce à la combinaison de ces deux approches, qu'il en marque une très grande majorité.

Ensuite, l'étude de l'induction de l'autophagie par une carence nutritionnelle, nous a permis de mettre en évidence que dans de telles conditions le processus de formation des autophagosomes est modifié, car on observe une augmentation du nombre d'autophagosomes formés, ainsi que de leur taille. Ces modifications vont permettre une plus grande efficacité du processus et conduit à une augmentation du flux autophagique.

Ces études ont également montré que l'induction de l'autophagie, dans la racine d'*Arabidopsis*, était un phénomène extrêmement réactif. En effet, dès 20 min après l'application de la carence on peut remarquer une augmentation du nombre d'autophagosomes.

De plus nous avons également observé que cette augmentation, au moins d'un facteur 5, du nombre d'autophagosomes, atteignait son maximum environ 2 h après l'application de la carence, suivie une diminution du nombre de ces structures pour atteindre un niveau stable, deux à trois fois supérieur au niveau basal. Ces informations suggèrent la présence de deux phases dans cette induction de l'autophagie : suite à la carence, une phase de "burst" est observée, où l'autophagie atteint un niveau très élevé, puis ensuite ce niveau est régulé à la baisse pour atteindre un plateau. Cette observation met en évidence le fait que bien que l'autophagie permette de générer un pool d'acides aminés disponible, c'est également un mécanisme qui est énergiquement coûteux pour la cellule. L'autophagie à un niveau très élevé n'est donc pas une solution durable en cas de carence nutritionnelle, ce qui expliquerait la présence de ces deux phases : un niveau d'autophagie à court terme, permettant de tolérer efficacement un stress ponctuel, puis la mise en place d'un niveau d'autophagie à long terme, compatible avec le métabolisme cellulaire, si le stress persiste.

Pour finir, nous avons, tenté de mettre en évidence des connexions entre la voie autophagique et d'autres éléments du système endomembranaire. Les résultats obtenus confirment le fait que la voie autophagique est une voie indépendante au sein du système endomembranaire. Bien qu'aucun co-marquage n'ait été observé entre les autophagosomes et les différents marqueurs étudiés, nous ne pouvons pas affirmer qu'il n'existe aucune connexion entre la voie autophagique et d'autres voies du système endomembranaire.

**Chapitre II. EXPLORATION DE LA FORMATION DE
L'AUTOPHAGOSOME AVEC ATG5**

Rappel du contexte de l'étude

Les résultats obtenus lors du précédent chapitre de ce travail nous ont permis de mettre en place et de valider les conditions d'utilisation d'ATG8 comme un excellent marqueur de la voie autophagique, et plus particulièrement des autophagosomes. La prochaine étape pour mener à bien notre investigation des mécanismes de formation de l'autophagosome dans la cellule végétale est de mieux cerner les étapes précoces de ce processus. Il nous faut alors identifier un marqueur permettant de visualiser ces stades précoces. En effet ATG8 est présent, depuis les étapes d'élongation de la membrane d'isolement jusqu'à la dégradation du corps autophagique dans la vacuole, ce qui en fait un marqueur trop peu spécifique pour notre problématique. Nous nous sommes donc intéressés à ATG5, présent au sein du complexe ATG12-ATG5-ATG16 identifié chez la levure et les mammifères, et impliqué dans les étapes de lipitation d'ATG8 sur la membrane d'isolement. Chez les mammifères, ATG5 est couramment utilisé comme marqueur du phagophore du fait de sa présence au niveau de cette membrane uniquement lors des étapes de formation de l'autophagosome.

Stratégie employée

Premièrement, nous avons entrepris la génération de différentes lignées exprimant ATG5 couplé à différentes protéines fluorescentes. Afin de vérifier la fonctionnalité de nos constructions nous avons ensuite entrepris de compléter le mutant *atg5-1*. Une fois validées, ces lignées nous permettront la caractérisation cellulaire de ATG5 chez Arabidopsis.

Par la suite il a fallu valider l'utilisation d'ATG5 comme marqueur des étapes de formation des autophagosomes chez Arabidopsis. Pour cette étape nous avons généré une lignée exprimant de manière constitutive ATG5-GFP et mCh-ATG8.

Enfin après avoir validé l'utilisation de ATG5 comme marqueur des autophagosomes en formation, ces lignées nous permettront d'étudier précisément la cinétique de formation des autophagosomes mais également d'investiguer de possibles connections avec le système endomembranaire de la cellule.

1. ATG5 définit un domaine du phagophore connecté à la face corticale du réticulum endoplasmique lors de la formation de l'autophagosome

Les résultats de cette étude font l'objet d'un manuscrit soumis pour publication, retranscrit ci-après.

ATG5 defines a domain of the phagophore dynamically connected to the cortical face of the endoplasmic reticulum during autophagosome formation in plants.

Romain Le Bars¹, Jessica Marion¹, Rémi Leborgne^{1, 2}, Béatrice Satiat-Jeunemaitre^{1,2}, and Michele Wolfe Bianchi^{1,3}

Manuscrit soumis pour publication

Addresses:

1 : Laboratoire Dynamique de la Compartimentation Cellulaire, CNRS UPR2355/IFR87, Institut des Sciences du Végétal, Centre de Recherche de Gif (FRC3115), 91198, Gif-sur-Yvette Cedex, France

2 : Pôle de Biologie Cellulaire, Imagif, Centre de Recherche de Gif, (FRC3115), Saclay Plant Sciences, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

3 : UFR Sciences et Technologie, Université Paris-Est Créteil Val de Marne (UPEC), 61 av. Général de Gaulle, 94010 Créteil Cedex, France.

Correspondence should be addressed to M.W.B. or B.S.J. (e-mail: bianchi@isv.cnrs-gif.fr or bsj@ isv.cnrs-gif.fr)

Abstract

Understanding compartment formation represents a fundamental challenge in cell biology. Autophagosomes are responsible, amongst other functions, for non-selective macroautophagy (autophagy hereafter), and arise, in yeast and animals, from the sealing of a cup-shaped double-membrane precursor, the phagophore (Hamasaki et al., 2013b; Rubinsztein et al., 2012). Elements of the associated protein machinery, first identified with the yeast Atg genes, are well conserved in eucaryotes. How the phagophore is generated and grows into a sealed autophagosome is still not clear in detail, and completely unknown in plants, due in part to the scarcity of structurally informative, real-time imaging data of ATG proteins at the phagophore site. The ATG5 complex directs anchoring to the phagophore of ATG8 (Hanada et al., 2007; Mizushima et al., 1998; Romanov et al., 2012; Walczak and Martens, 2013), in turn required for membrane expansion (Nakatogawa et al., 2007; Weidberg et al., 2010; Xie et al., 2008; Yoshimoto et al., 2004). We find that, in intact living *Arabidopsis* tissue, ATG5 is present at the phagophore site from early sub-resolution stages, and defines a torus-shaped domain in a flat cisternal early phagophore apparently anchored to the underlying ER membrane. Detailed real-time and 3D imaging of the growing phagophore are leveraged upon to propose a model for autophagosome formation in plants.

Introduction

Autophagy is the delivery of cytosolic cargo entrapped by double-membrane bound particles, the autophagosomes, to the lytic compartment(s) of the cell for bulk degradation. Present at all times at low levels, autophagosome formation is highly stimulated, amongst other instances, in the acute response to nutrient starvation, to allow reattribution of cellular resources (Onodera and Ohsumi, 2005). Other important roles for autophagy have been recently reviewed (Li and Vierstra, 2012; Weidberg et al., 2011).

Several homologs of the about 20 genes required for autophagy in *S.cerevisiae* - the Atg genes - are present in animals and plants. The recognition of the functional interactions amongst ATG proteins, and of the genetic requirements for their correct localization, has led to the proposal of a hierarchical order of action for the ATG proteins in yeast (Suzuki et al., 2007) and mammals (Itakura and Mizushima, 2010). In parallel, significant advance has also been made on the imaging of structures associated with autophagosome formation. Present challenges include full integration of molecular scaffolding data with *in vivo* localisation, and morphologically informative visualisation of early autophagosomal structures in real-time and 3D (Hamasaki et al., 2013b; Rubinsztein et al., 2012).

Three major phases in the genesis of the autophagosome can be distinguished: nucleation, expansion and closure of the double membrane of the phagophore. In the nucleation step, activity of the ATG1 protein kinase complex at the site of the future autophagosome allows for the enrichment of local membranes in phosphatidylinositol 3-phosphate (PtdIns(3)P) by PI(3) kinase. These membranes, named omegasomes in mammalian cells, are thought to represent either the precursor, or an assembly platform for the phagophore (Axe et al., 2008). PtdIns3P-enriched membranes are required for the recruitment, amongst others, of an ATG5-ATG12-ATG16 complex. This complex, intervening in the last step of a series of ubiquitin-like reactions, allows anchoring of ATG8 to the membrane of the phagophore via conjugation to phosphatidylethanolamine (PE). Coherently, *atg5* loss-of-function mutants are unable to form autophagosomes (Mizushima et al., 2011; Thompson et al., 2005). While lipidated ATG8 is found on the autophagosome from formation to lytic destruction, the ATG5 complex has been shown to transiently label autophagosomal structures in yeast (Suzuki et al., 2013; Suzuki et al., 2001) and mammals

(Koyama-Honda et al., 2013; Mizushima et al., 2001), leaving the site of autophagosome formation before its fusion with the lytic compartment.

Since the ATG5 complex should define the exact site of ATG8 insertion in the membrane of the forming autophagosome (Fujita et al., 2008), imaging at high resolution and in real time of ATG5 can be expected to shed light on the spatial organization of early structures, and on the cellular site of autophagosome formation. In yeast, autophagosomes are formed in close proximity of the vacuolar membrane, while in mammals early autophagosomal structures are connected with the endoplasmic reticulum (Hayashi-Nishino et al., 2009; Yla-Anttila et al., 2009), and with ER-mitochondria contact sites in particular (Hailey et al., 2010; Hamasaki et al., 2013a). However, interactions with the plasma membrane have also been reported (Ravikumar et al., 2010). Sites of autophagosome formation, and possibly membrane sources, could therefore vary in different physiological conditions and cell types (Rubinsztein et al., 2012).

In plants, autophagy has important roles in stress tolerance, senescence and grain filling (Yoshimoto, 2012). The induction and conjugation machinery leading to ATG8 lipidation have been characterized (Avin-Wittenberg et al., 2012; Li and Vierstra, 2012) and remarkable other advances in the understanding of plant autophagy at the cell biology level have been made (Svenning et al., 2011) (Katsiarimpa et al.; Liu et al., 2012) (Honig et al., 2012). However, no information is presently available on the morphology of early autophagosomal structures, the subcellular distribution of the ATG5 complex, or the site of autophagosome formation.

Results

Autophagic regulation of the ATG5-FP pattern

To investigate the subcellular localization of ATG5 in plant cells, Arabidopsis plants were stably transformed with translational fusions of ATG5 with GFP (ATG5-GFP) or mCherry (ATG5-mCh), and examined focusing on differentiated epidermal cells of the root. These cells are characterized by a large central vacuole delimiting the cytosol to a 1-2 μm

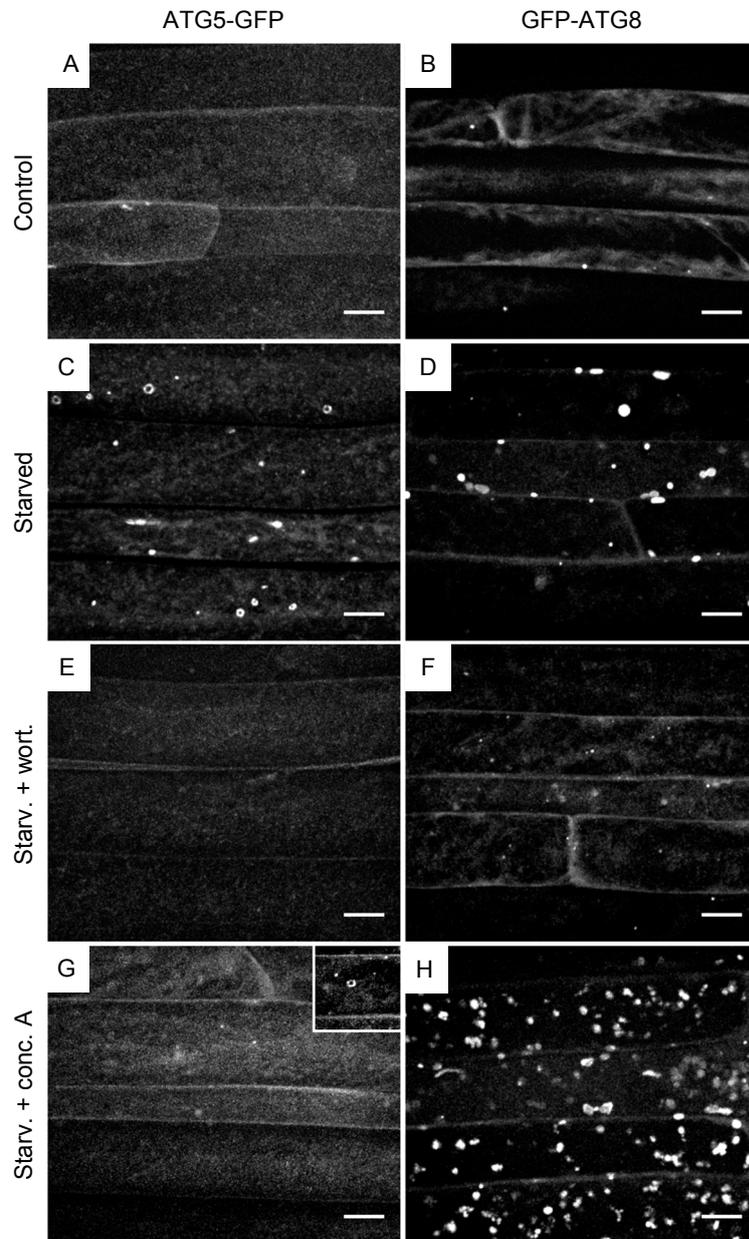


Figure 1 : Autophagic induction of a structured ATG5-GFP subcellular pattern.

Confocal images of the GFP fluorescent patterns in seedlings expressing ATG5-GFP or GFP-ATG8. In control conditions (**A,B**), only sporadic signals are detected, while numerous structures appear after 2 h of nutrient starvation (**C,D**). Note a ring-like ATG5 structures in (**C**). (**E,F**) Wortmannin treatment severely hindered the appearance of fluorescent ATG5 or ATG8 structures. (**G,H**) Visualisation of autophagic bodies in the vacuole after 4 h of nutrient starvation in the presence of concanamycin A. ATG5-GFP fluorescence is not detected (**G**), while GFP-ATG8 signals are abundant (**H**). An inset in (**G**) shows that formation of cytosolic ATG5 structures in is not inhibited by concanamycin A treatment. Maximum intensity projections of 10 μm - deep deconvolved stacks, at a cortical (**A-F**, and inset in **G**) or at a vacuolar focal plane (**G,H**). Scale bar, 10 μm .

thick cortical region below the plasma membrane, show in our hands a robust autophagic response, and can be readily subjected to live imaging and pharmacological treatments in the intact organ.

When seedlings were grown on rich media, a barely detectable ATG5-FP signal was present diffusely in the cytosol, and in rare 0.2 – 0.5 μm wide mobile puncta. After 2 h of nutrient starvation (see Materials and Methods), the number of fluorescent puncta clearly increased, and larger structures also occurred, including ring-like structures (0.5 to 2 μm wide; Figure 1 A, C).

The subcellular pattern of ATG5 is therefore reorganized from a mainly diffused cytosolic pattern to a highly structured one, in response to conditions known to induce autophagy, as seen through the parallel increase in ATG8-labelled particles (Figure 1 B, D).

To further probe the connection between the observed ATG5 patterns and the autophagic pathway, two pharmacological experiments were performed. First, we asked whether the accumulation of ATG5 signals, in response to nutrient starvation, was sensitive to the PI3K inhibitor wortmannin, which blocks the formation of autophagosomes. Second, we tested whether the ATG5-FP reporters were transported to the vacuole with the autophagosome, by applying the vacuolar ATPase inhibitor Concanamycin A, which impedes vacuolar proteases by raising the pH of this compartment, and therefore allows the accumulation of undegraded autophagic structures (autophagic bodies). In these experiments, ATG5 reporters were compared to ATG8 fusions involving the same fluorescent protein: i.e. GFP as shown in Figure 1, or mCherry (Supplementary Figure S1), to rule out any possible bias due to the reporter protein. Accumulation of ATG5 signals under nutrient starvation was clearly abolished by wortmannin, similarly to what observed for the ATG8 labeled autophagosomes (Figure 1 E, F). These results therefore suggest that, as for autophagosome formation, the generation by a wortmannin-sensitive PI3K of PtdIns(3)P-enriched membranes is required for the formation of ATG5 structures. However, in contrast with the accumulation of ATG8-labelled autophagic bodies in the vacuole, no ATG5 signal could be detected in this compartment (Figure 1 G, H). It can be deduced that ATG5 structures, should they be physically connected to the autophagosome, do not follow it until the vacuole.

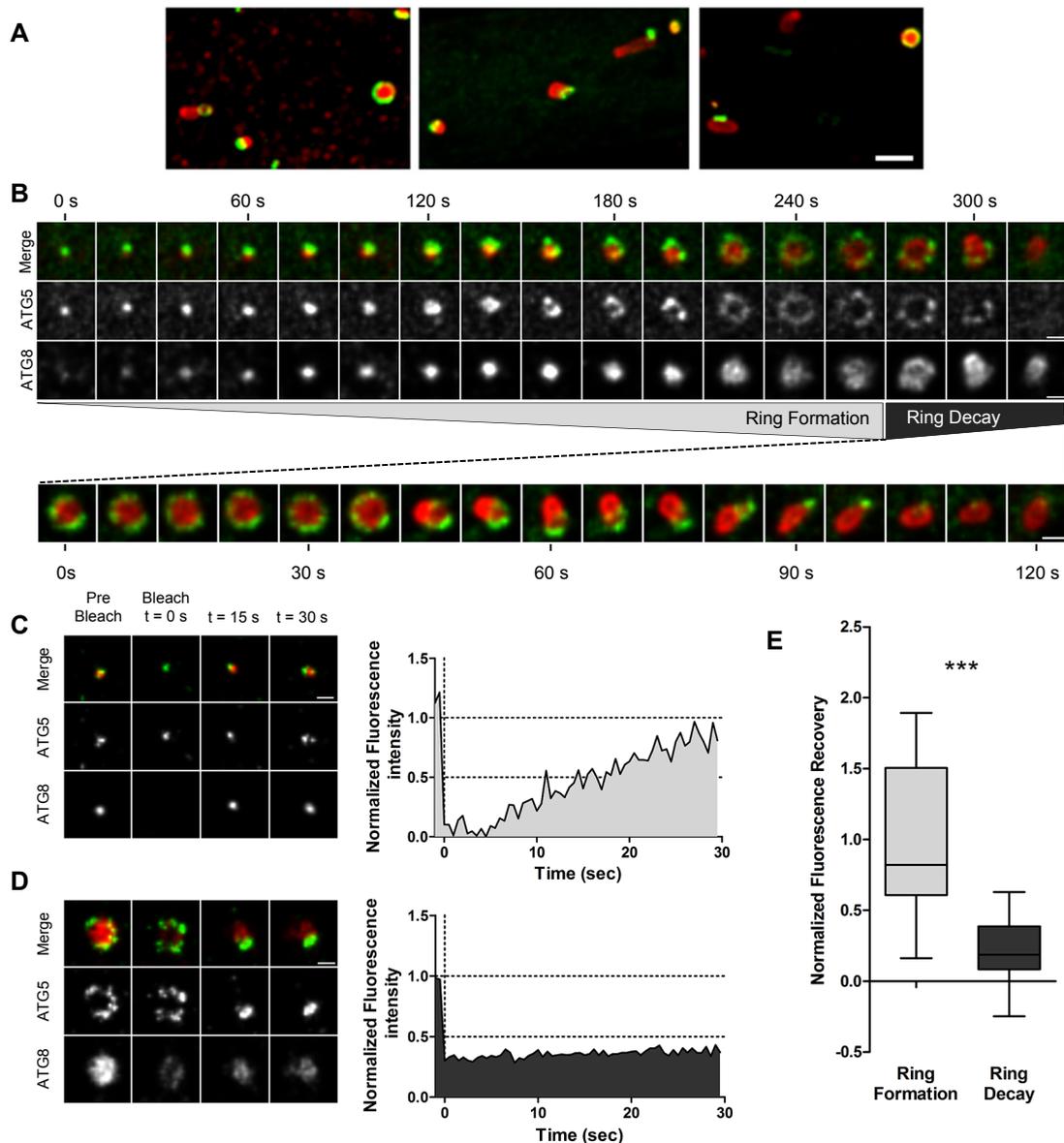


Figure 2 An ATG5 labelled sub-domain defines the growing phase of autophagosomal particles.

(A) Examples of ATG5-GFP and mCherry-ATG8e co-labelled patterns simultaneously detected by confocal microscopy under nutrient starvation. Merge of the GFP (green) and ATG8 (red) channels of maximum intensity projections of 20 μm -deep deconvolved stacks. Scale bar, 3 μm . (B) Real-time imaging of an individual autophagosomal particle, showing one deconvolved image per 20 sec. The ATG5 ring formation phase is defined as the steps up to establishment of the maximum diameter of the ring structure. The following steps, defined as the decay phase, being more dynamic, are also depicted at higher time resolution (1 image per 7.5 sec). Single plane merged images of ATG5-GFP (green) and mCherry-ATG8 (red) channels, deconvolved. Scale bar, 1 μm . (C) Representative FRAP experiment on mCherry-ATG8 during the ring formation phase. Deconvolved images. Scale bar = 1 μm . The corresponding fluorescence recovery kinetic, acquired on non deconvolved images, is shown at the right. (D) Representative FRAP experiment of mCherry-ATG8 during the ring decay phase, presented as in (C). (E) Box and whiskers representations of fluorescence recoveries during ATG5 ring formation (n=11) and decay (n=17). Whiskers comprise the 10-90 percentile, the box the two central quartiles. The mean recovery values are indicated by an horizontal line. Recoveries during ATG5 ring formation and ring decay were significantly different according to the Mann-Whitney statistical test.

It must be noted that the observed ATG5 patterns are functionally relevant, as expression of the ATG5-GFP fusion protein was able to restore autophagosome formation in the *atg5* mutant (Supplementary Figure S2).

ATG5 and ATG8 signals are tightly associated but label distinct domains of the autophagosomal particle

The next question was to establish if, as expected from data obtained in other organisms, and to what extent, ATG5 co-localised with ATG8-labelled autophagosomes. Arabidopsis lines stably expressing both ATG5-GFP and mCh-ATG8e were therefore generated by crossing, and analysed by simultaneous and selective acquisition of images in the GFP and mCherry channels. Under nutrient starvation, 79 % of ATG8-labelled structures were associated with an ATG5 signal, and, reciprocally, 95% of ATG5 signals overlapped ATG8 fluorescence (n=2126; additional quantifications are presented in Supplementary Figure S3).

Interestingly, exception made for the smaller structures, which were however close in size to the optical resolution limit, ATG5-GFP appeared to label a subdomain of the ATG8 particle (Figure 2 A). When ATG5 ring-like signals were observed, ATG8 fluorescence was always detected inside the ring. The proximity/partial overlap between ATG5 and ATG8 signals was perfectly maintained in a very dynamic context (see Supplementary Video 1 online), suggesting that, in these structures, the two proteins label the same membrane, or distinct but tightly connected membranes.

To establish whether the ATG5 and ATG8 co-labelled particles correspond to early stages of autophagosome formation, it was important to monitor both signals in individual growing structures, in real time and, because of their mobility, simultaneously.

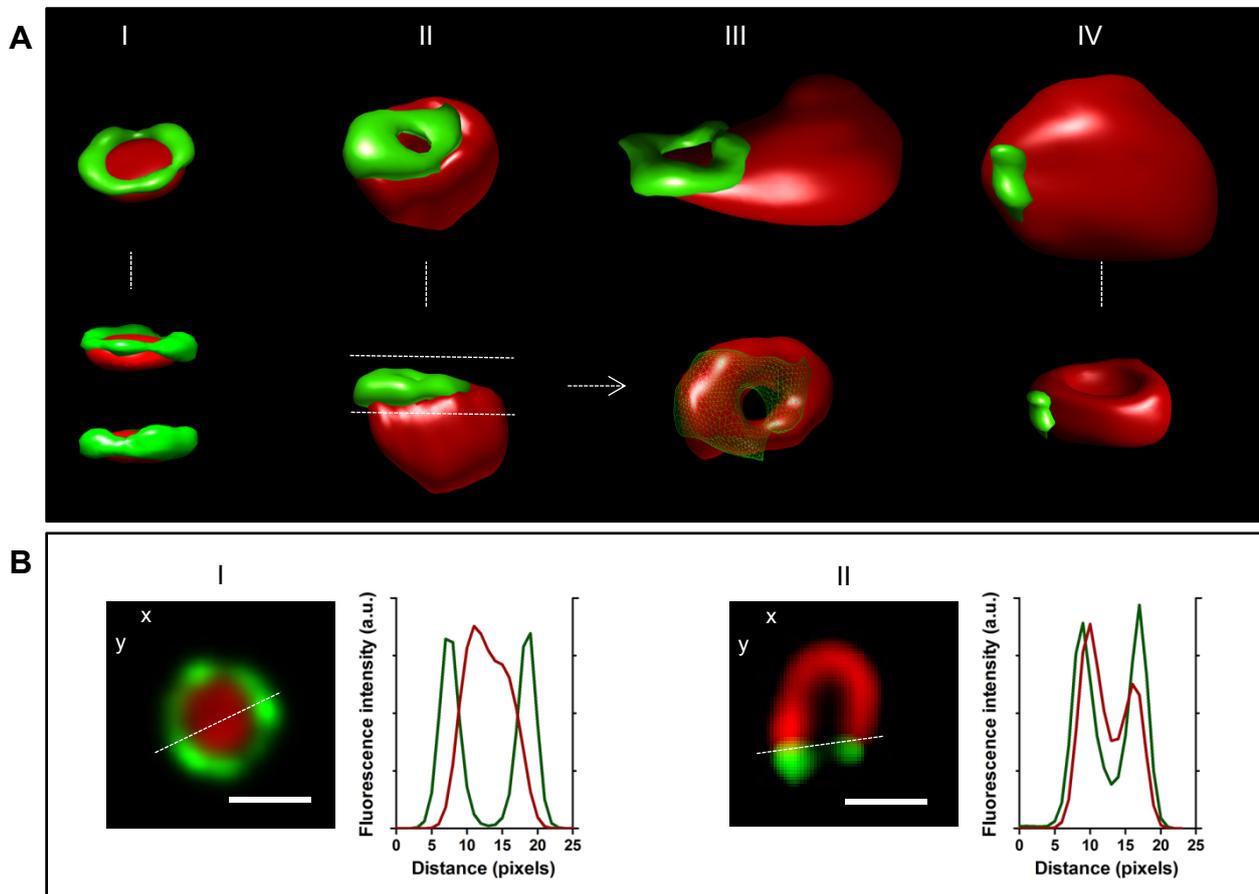


Figure 3 : 3D reconstructions of the growing phagophore.

(A) 3D surface rendering of deconvolved stacks of ATG5 (green) and ATG8 (red) domains on the forming autophagosome. Four representative objects are shown, disposed left to right according to a temporal sequence deduced by comparison with the real time data on individual particles, as that shown in Fig. 2B. Additional views are presented below structures I, II and IV. Note the planarity of structure I, the first morphologically informative object in the ATG5 ring formation phase. In structure II, the ATG5 torus is disposed around the aperture of the phagophore, as better seen with an horizontal view of the reconstruction of the upper third of the object (arrow, green mesh for the ATG5 surface). In structure IV, corresponding to a late step in the ATG5 ring decay phase, the cavity of the neo-formed autophagosome is detectable. (B) 2D horizontal views of representative structures of type I and II, corresponding to the planes of maximum ATG5 intensity of the z stacks. Fluorescence intensity profiles along a line shown in the confocal image are shown at the right. Note how the fluorescence intensity profiles confirm the disposition of the ATG5-GFP and mCherry-ATG8 visible in the 3D surface reconstructions. Scale bar, 1 μ m.

A growing ATG5 ring-like structure marks the ATG8 recruitment phase of the nascent autophagosome

Time-lapse acquisitions of individual growing autophagosomal structures (n=70) were performed with plants expressing both ATG5-GFP and mCh-ATG8. A similar sequence of events was observed, as illustrated by one of the longest sequence obtained, presented in Figure 2 B. Isolated ATG5 puncta (< 0.3 μm) rapidly recruited an ATG8 signal and increased in size, evolving distinct patterns for the two proteins. The ATG5 signal systematically formed a growing ring surrounding an ATG8-labelled region, finally reaching a diameter of up to 2 μm . We refer to these different steps of autophagosome formation, as "the ring formation phase". Strikingly, ATG5 ring-like structures appeared systematically in a plane parallel to the cell surface (either the apical or the lateral one), and were rather static within the cell, notably on the vertical axis, suggesting the existence of physical constraints for their positioning.

Once the ATG5 ring stabilized for about 1 min at its maximum diameter, it quickly collapsed, as the whole structure tended to become more mobile, and often disappeared from the focal plane, as if detached from an anchor. During this phase, the ATG8-labeled objects became less regular in shape as the ATG5 signal progressively left the autophagosomal particle. We refer to these later steps of autophagosome formation, as the "ring decay phase" (Figure 2). Supplementary Videos 2-4 depict three examples of the time-lapse sequences acquired.

To directly visualize the recruitment of ATG8 suggested by the observed increase in size of the ATG8-labeled surfaces, FRAP experiments on mCh-ATG8 were performed either during the ring formation phase (Figure 2 C), or the ring decay phase (Figure 2 D). The data showed a net recruitment of mCh-ATG8 during the ring formation phase, with a mean recovery of about 80 % after 30 sec. The slow recovery kinetics clearly indicates that, as expected, the process does not occur through simple diffusion from the cytosol. At this time point, in several cases recovery exceeded 100 %, reflecting the growth phase of the structure. In contrast, recovery was clearly weaker during the ring decay phase, or even negative in some cases, suggesting net loss of ATG8 molecules from the surface of the autophagosome as ATG5 departed the structure. (Figure 2 E).

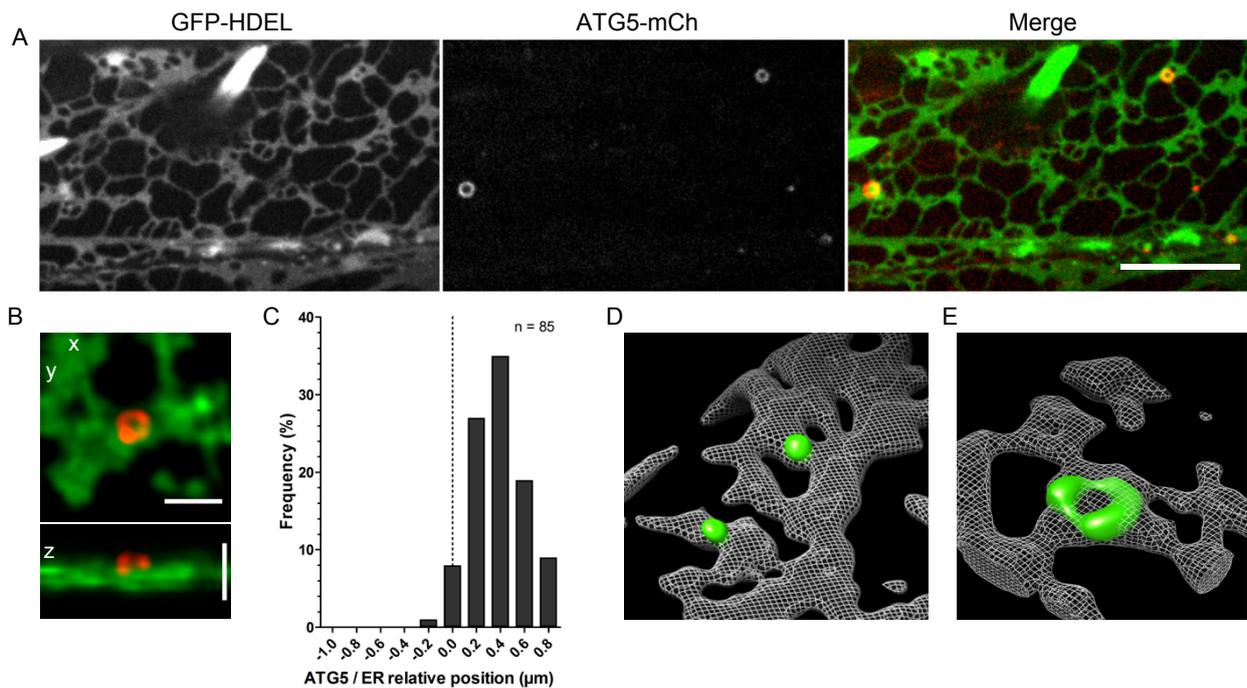


Figure 4 : Close association of the phagophore with the external face of peripheral ER.

(A) Single plane images captured on a cortical plane in a GFP-HDEL / ATG5-mCherry stably transformed plant. ATG5 structures are systematically superposed with the ER luminal marker GFP-HDEL. Bright fusiform structures visible with this marker are ER-bodies, typical of Brassicaceae plants. See Supplementary Video 5 online for a time-lapse of a forming ATG5 torus. 60x objective ; scale bar, 10 μm . (B) Maximum intensity projections of a 5 μm -deep deconvolved z-stack, on the x,y and x,z planes, showing a typical ATG5 torus. Note how the ATG5 torus is placed on the upper/outer face of the ER with respect to the GFP-HDEL signal. Scale bar, 2 μm . (C) Frequency distribution of the difference in microscope stage z positions of the maxima of fluorescence intensities for ATG5-mCherry, and of GFP-HDEL. Note how the maximum intensity z position of virtually all the 70 ATG5 structures analysed lies above the maximum or the ER marker. (D) 3D surface rendering of ATG5-mCherry early, dot-like, structures (green) disposed on the ER cortical network (grey meshes). (E) An ATG5-GFP torus placed on the outer, upper face surface of the ER.

Identifying steps in autophagosome formation by 3D reconstruction of ATG5-ATG8 interactions

In order to obtain a 3D representation of the evolution of ATG5 and ATG8 labeled structures in the course of autophagosome formation, it was necessary to adopt an acquisition strategy compatible with both the dynamic nature of the autophagosome and the relatively weak signal of the ATG5 reporter. We acquired z-stacks of about 90 independent ATG5 and ATG8 co-labelled structures at a single time point, in the intact, living tissue. Objects generated by three-dimensional surface rendering were then classed in clearly definable distinct groups, and disposed along a temporal sequence based on our real-time observations (Figure 3 A).

The first objects labelled by both ATG5 and ATG8 are close in size to the resolution limit of the system, and therefore logically the question of the presence of distinct ATG5 and ATG8 domains is not applicable. Subsequently, the structure grows in size and develops, invariably, as a distinctly planar circular structure, where the ATG8 signal is always surrounded by an expanding ATG5 torus (structure I in Figure 3 A). This clearly shows that the ATG5 ring observed in 2D images represents indeed a torus-like domain, as opposed to the optical section, or a z-projection, of a hollow spherical object. Further growth expands the object in the 3 dimensions, with the ATG5 torus remaining relatively stable, in its position within the cell and in dimensions (structure II in Figure 3 A). Importantly, the ATG5 reporter surrounds at this stage a circular region lacking ATG8 signal, suggesting that it is positioned at the aperture of the growing structure, which is therefore still an open phagophore at this stage. Finally, objects in late step of the ATG5 ring decay phase reveal a higher mobility and deformation of the structure (Structures III and IV in Figure 3 A). In the larger objects, the resolution is sufficient to clearly visualize the peripheral localization of the mCherry signal, consistent with anchoring of ATG8 to the membrane of the autophagosome.

The relative stability of the phagophore during the ring formation phase, and the planar disposition of the ATG5 torus, suggest anchoring to a subcellular structure, before release of the autophagosome to the cytosol as ATG5 leaves the particle. The next obvious step was therefore to try and identify such subcellular anchoring structure.

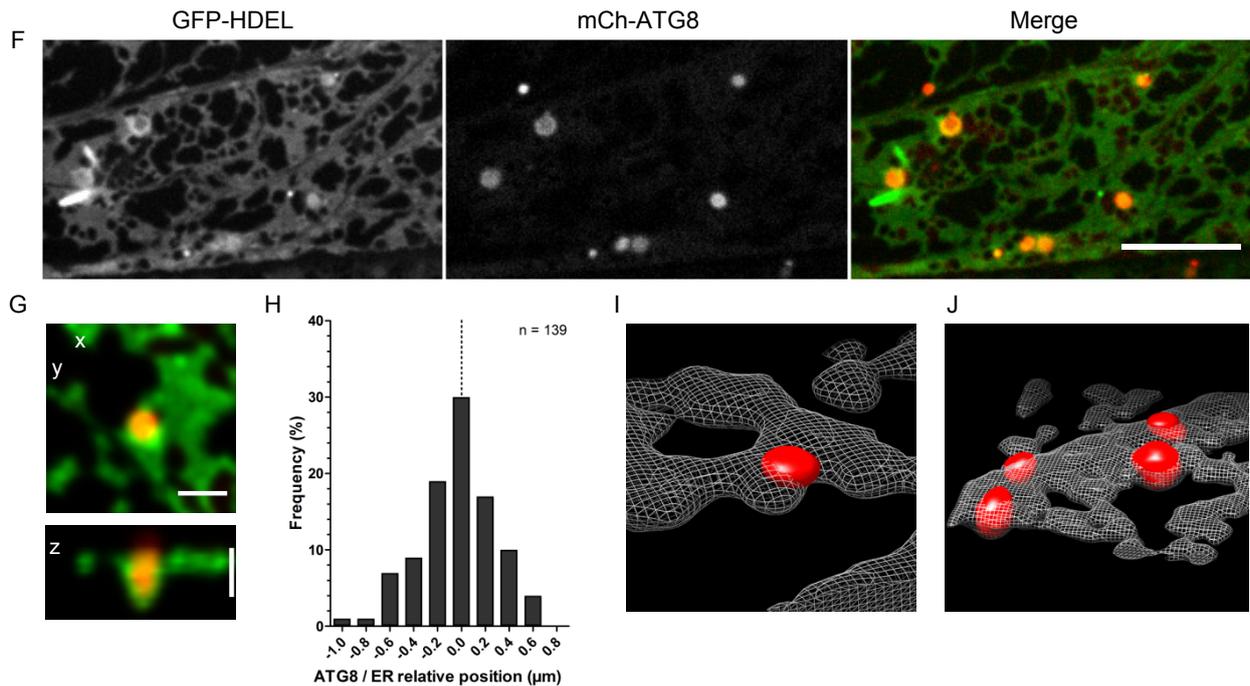


Figure 4 (suite) : Close association of the phagophore with the external face of peripheral ER.

(F) mCherry-ATG8 signals are superposed with GFP-HDEL. Note how the ER luminal marker reveal structured ER domains in correspondence of autophagosomal structures labeled by mCherry-ATG8. See also Supplementary Video 6 online. **(G)** Maximum intensity projections of a 5 μm -deep deconvolved z-stack, on the x,y and x,z planes, showing a typical ATG8-labelled autophagosomal particle embedded in an ER cradle-like structure. Scale bar, 2 μm . **(H)** Frequency distribution of the difference in microscope stage z positions of the maxima of fluorescence intensities for mCherry-ATG8, and of GFP-HDEL. ATG8 structures appear more embedded in the ER than ATG5. **(I)** 3D surface rendering of mCherry-ATG8 early, dot-like, structures (red) disposed on the outer, upper face ER cortical network (grey meshes) **(J)** The larger, and more frequent ATG8-labelled structures appear as deeply embedded in the ER.

Growth of the phagophore takes place on the external face of the endoplasmic reticulum.

To investigate whether the ER cortical network might interact with the growing autophagosomal particle, Arabidopsis lines stably expressing the luminal ER marker GFP-HDEL together with either ATG5-mCh or mCh-ATG8e were generated, and analysed by live imaging. ATG5 or ATG8 signals and GFP-HDEL signals were systematically superposed. This association was maintained even in the highly dynamic context of the cortical ER, which appears as a fluid network of tubular and cisternal domains underlying the plasma membrane (Figure 4 A, F and Supplementary Video 5-6 online).

Remarkably, virtually all ATG5-mCh signals, i.e. smaller dot-like structures corresponding to either early formation stages or to late ring decay structures (as seen in Figure 2 B), and the larger tori, were preferentially located on the outer face of the ER, in the proximity of cisternal domains (Figure 4 B-E). In figure 4 C, the polar disposition of ATG5 structures was quantified by measuring fluorescence intensities along the z-axis of the stacks: peak intensities of the ATG5 signal occurred systematically more cortically, i.e. closer to the plasma membrane, than the maximum of the HDEL-ER reporter. This specific localization of ATG5 structures also explains why most of the ATG5 tori observed were positioned on a very cortical plane, parallel to the cell surface. Coherently, smaller ATG8-labeled particles, globally representing the earlier stages of autophagosome formation, were also positioned on the outer face of the ER as for ATG5 (Figure 4 I). However, in contrast with ATG5, most ATG8-labelled structures appeared as embedded in the ER network (Figure 4 G, H, I, J), which appears in these cases to form a cradle, partially engulfing the ATG8-labeled autophagosomal particle. Such deformations of ER sheets accompanying growth of the larger autophagosomal structures were already evident as high intensity GFP-HDEL ring-like sectional signals in 2D acquisitions (Figure 4a).

The optical resolution of the system does not allow here to establish whether GFP-HDEL and mCh-ATG8 signals reside on the same external membrane(s) of the autophagosome or are juxtaposed. However, resolution is sufficient to exclude the presence of HDEL signal in the core of the autophagosome. The presence of an HDEL signal within the

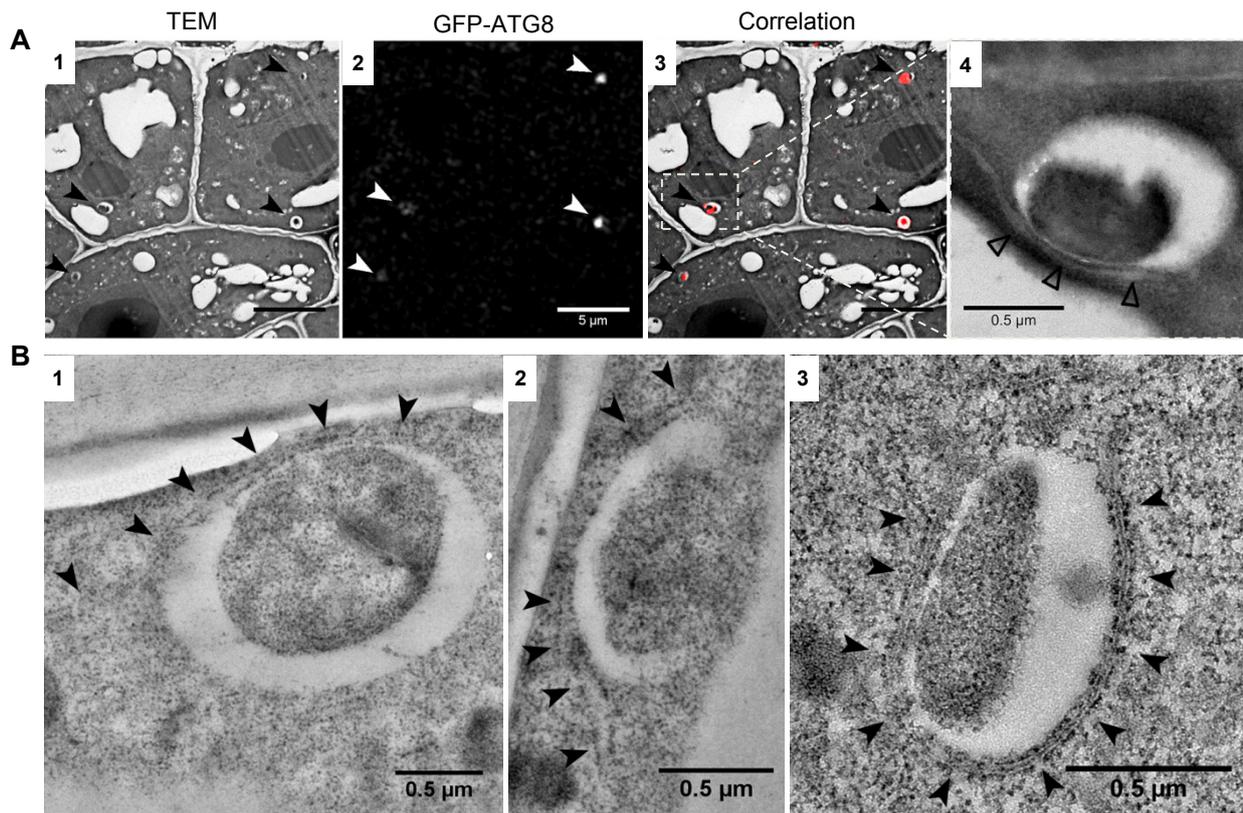


Figure 5 : Close contacts between autophagosomes and ER membranes.

(A) Visualisation of GFP-ATG8 labelled autophagosomal structures, indicated by arrow heads, by correlative light-electron microscopy. TEM micrograph of a radial section of a root of a GFP-ATG8 plant is shown (1), accompanied by fluorescent imaging of GFP-ATG8 (2), and correlation of the two images (3). A closer view of an autophagosomal particle showing close contacts with ER-like membranes is shown (open triangles) (4). (B) Similar interactions between ER membranes (arrowheads) and autophagosomal structures can be detected on cryofixed samples (1,2) or after chemical fixation (3).

autophagosome was observed only very rarely in these conditions. It must be noted that, in these experimental conditions, ER-targeted autophagy (Liu et al., 2012) does not occur, and that a GFP-HDEL signal in autophagic bodies was detectable only after induction of ER-stress with tunicamycin (Supplementary Figure S4). Therefore, the strong association observed between ATG5 or ATG8 and the ER is not a consequence of specific targeting of the ER, but appears to be linked to the autophagosome formation process itself.

Close interactions of the phagophore with ER membranes as visualized by electron microscopy.

Correlative light-electron microscopy also revealed close contacts of GFP-ATG8 labelled autophagosomal structures with ER-like membranes (Fig. 5 A-D). A close proximity of sheets of rough ER to the outer face of the autophagosomal particle was present in samples prepared by different methods (Fig 5 E-G), further confirming the confocal microscopy observations.

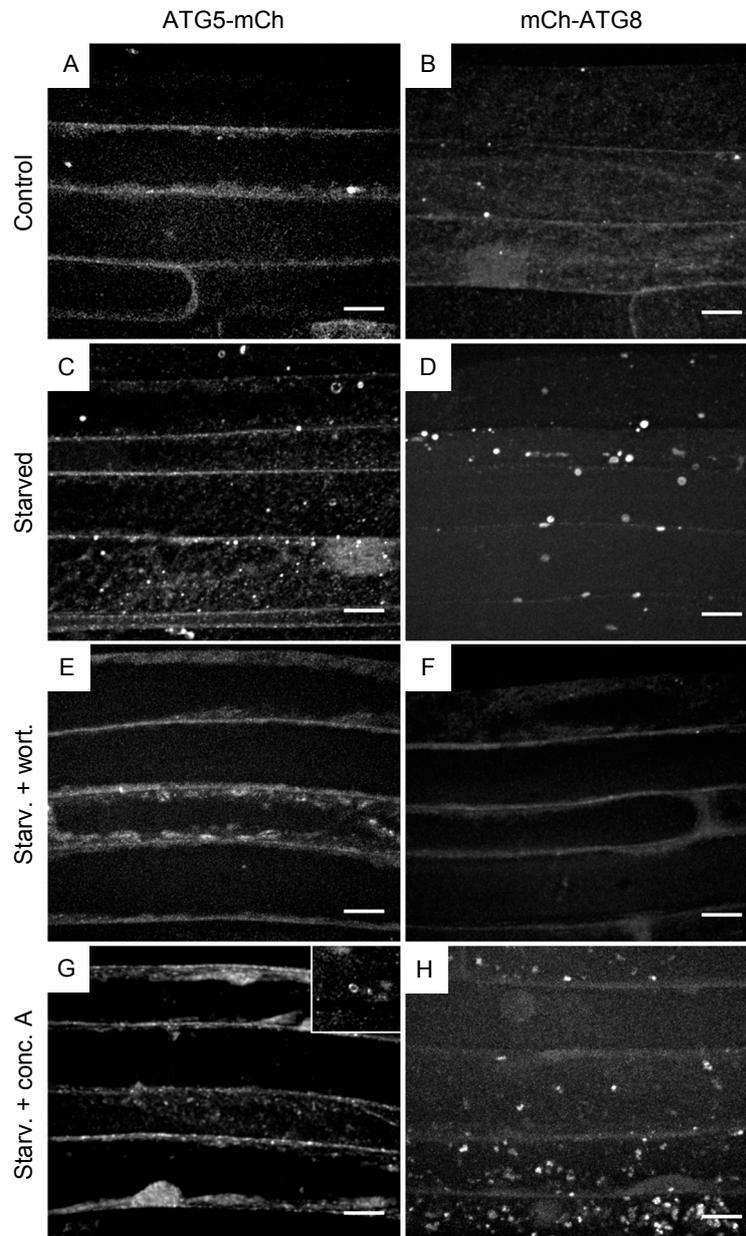


Figure S1 : Autophagic induction of a structured ATG5-mCherry subcellular pattern.

Confocal images of the mCherry fluorescent patterns in seedlings expressing ATG5-mCherry or mCherry-ATG8. In control conditions (A,B), only sporadic signals are detected, while numerous structures appear after 2 h of nutrient starvation (C,D). Note a ring-like ATG5 structures in (C). (E,F) Wortmannin treatment severely hindered the appearance of fluorescent ATG5 or ATG8 structures. (G,H) Visualisation of autophagic bodies in the vacuole after 4 h of nutrient starvation in the presence of concanamycin A. ATG5-mCherry fluorescence is not detected (G), while mCh-ATG8 signals are abundant (H). An inset in (G) shows that formation of cytosolic ATG5 structures in is not inhibited by concanamycin A treatment. Maximum intensity projections of 10 μm - deep deconvolved stacks, at a cortical (A-F, and inset in G) or at a vacuolar focal plane (G,H). Scale bar, 10 μm .

Discussion

Previous identification of autophagosomal structures in plants relied on the employ of fluorescent-tagged ATG8 (Yoshimoto, 2012; Yoshimoto et al., 2004), ATG1 and ATG13 (Suttangkakul et al., 2011), or the selective adaptor NBR1 (Svenning et al., 2011), but without the possibility to resolve different steps of autophagosome formation.

The toroidal disposition of ATG5 on the phagophore has not been previously described in other organisms. In mammalian cells and yeast, ATG5 was found homogenously distributed onto early phagophores, shifting to a preferential localisation on the whole outer surface of maturing phagophores (Graef et al., 2013; Itakura and Mizushima, 2010; Koyama-Honda et al., 2013; Mizushima et al., 2001). Our observations could reflect plant-specific aspect of phagophore formation, e.g. the absence of a clear homologue of ATG16, or larger autophagosome size, although the possibility that such pattern has not been detected yet in other models for technical reasons cannot be formally excluded.

In addition, the appearance of the ATG5 torus as the enlargement of sub-resolution puncta points to an early recruitment of ATG5 at a very early stage of the plant autophagic pathway, as also indicated by recent temporal analysis in mammalian cells, showing co-recruitment of ATG5 with ATG1/ULK1 at the phagophore initiation site (Koyama-Honda et al., 2013).

Interestingly, the mammalian PtdIns3P-enriched omegasome membranes were also visualized as ring-like structures employing the PtdIns3P-binding protein DFCP1, and were positioned close to, but not overlapping with, ATG5 signals. Data allowing the positioning of the DFCP1 ring relative to phagophore aperture were not obtained (Axe et al., 2008).

Time-lapse observations strongly indicate a tight physical connection of the ATG5 torus to peripheral ER. The polarity of this interaction, with systematic positioning of the ATG5 torus on the external face of the ER was unexpected, and might reflect either intrinsic polarity of ER domains involved, and/or further interactions with other cell components, e.g. the cortical microtubule network or the cell membrane. Our experiments did not directly address the question of whether the observed ATG5 torus is positioned directly on peripheral ER or on a neighboring membrane. Intriguingly, the geometric regularity of the expanding

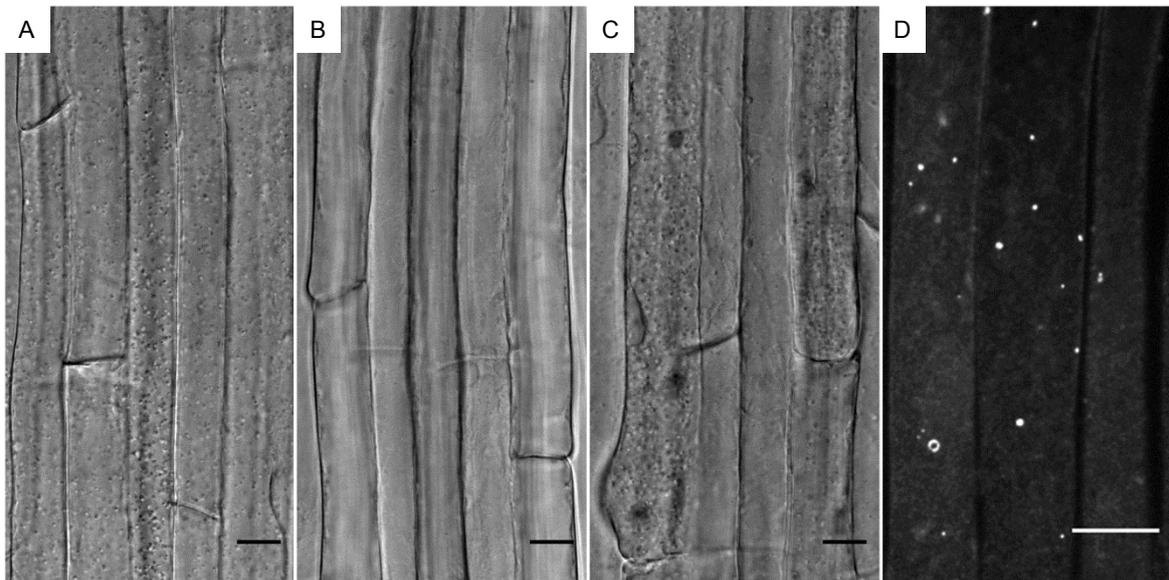


Figure S2 : Expression of ATG5-GFP restores accumulation of autophagic bodies in *atg5-1* plants.

(A-C) D.I.C. micrographs of root epidermal cells incubated for 8 h with concanamycin A, in nutrient starvation conditions. Autophagic bodies accumulation in the vacuole is clearly visible in wild-type seedlings (A), absent in the *atg5-1* mutant (B), and restored in *atg5-1* seedlings expressing ATG5-GFP (C). (D) Confocal microscopy. The ATG5-GFP fluorescence pattern in the *atg5-1* background is indistinguishable from that observed in wild type seedling (as in Fig.1).

Scale bar, 15 μ m.

ATG5 torus could reflect the minimal energy configuration of the highly curved edge of a flat membranous cisterna, expanding under the driving force of lipid deposition or synthesis. The maintenance of a flat early phagophore structure could be imposed by anchoring to underlying ER, which could possibly also act as a lipid provider. The observed cup-like deformation of the ER cisternae underlying, at later stages, the expanding phagophore, are consistent with this view. Indeed, such structures imply physical connection resisting the forces exerted by the growing phagophore. Finally, we observed that shrinkage and collapse of the ATG5 domain appear to be concomitant with sealing of the autophagosome and its departure from the ER. The yeast ATG5 complex is known to possess a membrane tethering capability (Romanov et al., 2012): it is tempting to speculate that such complex could also be involved in tethering the phagophore membrane to the underlying ER membrane, and controlling the sealing of the phagophore aperture.

Interactions between omegasomes and isolation membranes with the ER are well documented in mammalian cells (Axe et al., 2008; Hayashi-Nishino et al., 2009; Hayashi-Nishino et al., 2010; Yla-Anttila et al., 2009). Notably, the continuity of the isolation membrane with the ER led to a model implying direct differentiation of the phagophore from this compartment, and the systematic inclusion in the autophagosomal cargo of ER fragments, captured by folding and invagination of the isolation membrane between cradle-shaped ER sheets (Hayashi-Nishino et al., 2009). Under the physiological conditions we employed for autophagy induction, however, the ER luminal marker GFP-HDEL was not detected in autophagic bodies, and systematic inclusion of ER fragments was not observed. The mammalian isolation membrane-ER cradle model for autophagosome formation may, therefore, not be perfectly transposable to plants.

We propose that, during macroautophagy in plants, the ATG5 complex decorates the high curvature edge of a cisternal-like early phagophore anchored to the ER. The asymmetrical disposition of the two faces of this precursor would in turn provide the initial polarity required for establishment of the required membrane curvature of the growing phagophore, e.g. by favoring preferential anchoring of ATG8 to what will become the internal surface of the phagophore. How the initial planar, cisternal-like phagophore is established, folds into a cup-like structure, and how ATG5 is removed from the phagophore at the end of its expansion, are additional open questions deserving further investigation.

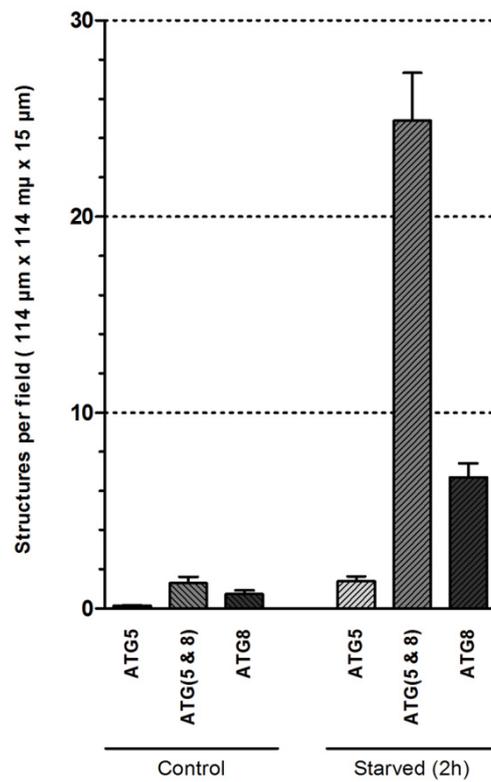


Figure S3 : Quantification of starvation-induced ATG5-GFP and mCherry-ATG8 labelled particles.

The number of structures labeled by ATG5-GFP, mCherry-ATG8, or both is expressed relative to the cellular volume imaged. Only cells in which both reporters could be detected were taken into consideration. A total number of 2126 ATG8 labeled structures were counted in nutrient starvation conditions. The total number of images (fields) evaluated was 85 in control conditions, and 66 in nutrient starvation, on 7 seedlings for each condition. Error bars, SEM.

ACKNOWLEDGEMENTS

We are grateful to Dr Sylvain Merlot (ISV, CNRS Gif sur Yvette, France) for his guidance in the establishment of the ATG5 and ATG8 reporters, and to Drs. Céline Masclaux-Daubresse and Kohki Yoshimoto (IJPB, INRA Versailles, France) for providing initial plasmids and Arabidopsis genotypes.

This work has benefited from the facilities and expertise of the Imagif Cell Biology Unit of the Gif campus (www.imagif.cnrs.fr), which is supported by the Conseil Général de l'Essonne.

AUTHOR CONTRIBUTION

RLB, MWB and BSJ conceived the study. RLB and MWB planned the experiments. RLB executed most of the experiments. RLB and MWB performed image analysis. JM and MWB helped in the generation of several Arabidopsis lines, and JM and RL contributed TEM experiments of Fig. 5. MWB, RLB and BSJ wrote the paper.

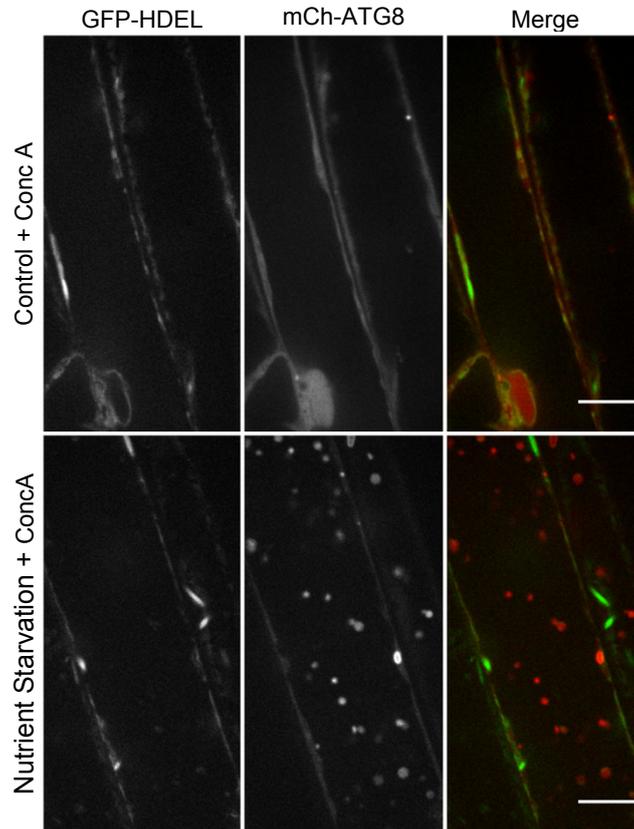


Figure S4 : Absence of GFP-HDEL in autophagic bodies induced by nutrient starvation.

Vacuolar planes of root epidermal cells of mCherry-ATG8, GFP-HDEL stably transformed plants. Autophagy was induced by nutrient starvation in the presence of concanamycin A, to allow accumulation of autophagic bodies in the alkalinised vacuole. No autophagic bodies are detected in control conditions, as the autophagic flux is null. After nutrient starvation, ATG8 labeled autophagic bodies are abundant in the vacuole, but no vacuolar signals can be detected for GFP-HDEL. Fusiform, peripheral GFP signals correspond to the cytosolic ER-bodies of Brassicaceae plants.

Methods

DNA constructs

To generate translational fusions of Arabidopsis ATG5 with GFP- and mCherry, the coding region of ATG5 (gene AT5G17290) was amplified by PCR (primers 5'-TACAAAAAGCAGGCTTCATGGCGAAGGAAGCGGTCAAG-3' and 5'-CAAGAAAGCTGGGTCCCTTTGAGGAGCTTTCACAAG-3'), from a full-length cDNA provided by Dr K.Yoshimoto (IJPB, INRA Versailles, France), and introduced in pDONOR207 by Gateway BP reaction (Invitrogen). A pDONOR207 vector carrying the complete coding sequence of Arabidopsis ATG8e (gene AT2G45170) was provided by Dr C. Masclaux-Daubresse (IJPB, INRA Versailles, France).

The ATG5 and ATG8e inserts of pDONOR207 were verified by sequencing, and transferred by LR Recombinase reactions to binary vectors pMDC83 and pMDC43 (REF CURTIS PP 2003), to generate ATG5-GFP and GFP-ATG8 fusions, transcribed by the 35S promoter. ATG5-mCh and mCh-ATG8 fusions were obtained through similar reactions with modified versions of pMDC83 and pMDC43 carrying the mCherry coding region in place of GFP, provided by Dr. Sylvain Merlot (ISV,CNRS Gif-sur-Yvette, France). All constructs were verified by sequencing.

Arabidopsis lines

To generate Arabidopsis lines stably expressing ATG5-GFP, ATG5-mCherry, GFP-ATG8 and mCh-ATG8 translational fusions, plants of the Columbia ecotype were transformed by the floral dip method (Clough and Bent, 1998) employing AGL0 *Agrobacterium tumefaciens* strains carrying the relevant plasmid. Single insertion homozygous families were selected by scoring for hygromycin resistance and fluorescence of the reporter protein.

Plants stably expressing ATG5-GFP in the *atg5-1* mutant (SAIL_129_B07; (Thompson et al., 2005)) for complementation experiments were generated by crossing and selecting the double homozygous F3 families by hygromycin resistance and PCR genotyping.

Lines stably expressing both ATG5-GFP and mCh-ATG8, were generated by crossing and selecting the double homozygous F3 families by PCR genotyping and fluorescence of the reporter.

Plants stably expressing GFP-HDEL (Arabidopsis Biological Resource Center CS16251, corresponding to ER-gk(Nelson et al., 2007)), were crossed with the ATG5-mCh or the mCh-ATG8e lines to obtain the corresponding doubly-labeled plants. F1 seedlings issuing from these crosses were directly employed.

Growth conditions, autophagy induction, and chemical treatments

Seeds were surface sterilized in 70% [v/v] ethanol, 0.05% [v/v] Tween-20 for 10 min, and stratified on growth medium for 2 days at 4°C in the dark. Growth medium : half strength Murashige and Skoog solid medium (2.15 g/L MS Basal Salt Mixture [Sigma, M5524]; 1% [w/v] sucrose; 3 mM MES, pH 5.6, and 3 g/L Gelzan [Sigma, G1910]). Seedlings were grown vertically for 5 days in plates shelled with gas-permeable medical tape (Urgo Medical), in a growth chamber at 22°C with a 16-h- light/8-h-dark photoperiod ($300 \mu\text{E}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$) and 65 % relative humidity.

To induce autophagy, five-day-old seedlings were transferred to Petri dishes containing a 2.5 mm thin layer of half strength Murashige and Skoog liquid medium, depleted for Nitrogen and Carbon (Murashige and Skoog micronutrient salts [Sigma, M0529], 3 mM CaCl_2 , 1.5 MgSO_4 , 5 mM KCl, 1.25 mM KH_2PO_4 , 0.5 % [w/v] Mannitol, 3 mM MES, pH 5.6) for 2 h in the dark (Nutrient Starvation Conditions, with gentle rotatory shaking (100 rpm). Controls were incubated in the same conditions but in normal $\frac{1}{2}$ MS liquid medium, and in the light.

For Concanamycin A (Fluka, 27689) and Wortmannin (Sigma, W1628) treatments respectively, liquid medium was supplemented with 1 μM and 30 μM of the chemical, diluted from frozen aliquoted stocks in DMSO. Concanamycin A was added for the whole duration of the starvation treatment, while Wortmannin was added only for the last 1 h. An equivalent volume of DMSO was added to the controls.

Light microscopy

All observations were done on roots epidermal cells of the early differentiation zone, employing 5 day-old-seedling mounted between in culture medium. To avoid unwanted autophagy induction, observation time under the microscope never exceeded 15 min after the plants were mounted. Confocal images were acquired with a Nipkow Spinning Disk confocal system (Yokogawa CSU-X1-A1) mounted on Nikon Eclipse Ti E inverted microscope equipped with a 60 X APO TIRF oil immersion objective (NA: 1.49) and a 100 X APO TIRF oil immersion objective (NA: 1.49). Blue (491 nm Cobolt Calypso DPSS laser, 100 mW) and Yellow (561 nm Cobolt Jive DPSS laser, 150 mW) lasers were used for excitation of GFP and mCherry, respectively. A dual band dichroic mirror 491/561 nm (Chroma) was used and band pass filters 525/45nm and 607/36 nm (Semrock) allowed the detection of GFP and mCherry, respectively. Images were recorded with a EMCCD Evolve camera (Photometrics), and the whole system was driven by MetaMorph software version 7.7 (Molecular Devices). For the simultaneous observation of GFP and mCherry, we employed a Dual View DV2 emission splitting device (Photometrics), equipped with a spectral module (Chroma) composed of a dichroic mirror 565 nm and band-pass filters for GFP (ET525/50m) and mCherry (ET630/75m). For 3D imaging, stacks were acquired with a z step of 200 nm. Differential Interferential Contrast acquisitions were collected on a Leica SP8X equipped with a HC PL APO 63 X oil immersion objective (NA: 1.40).

Image processing and analysis

Image manipulation (cropping, projections, bleaching correction in time series), intensity measurements and particles count were done with ImageJ (Wayne Rasband, National Institutes of Health). Fluorescent structures presented in Supplementary Fig. S3 were counted manually, on maximum intensity projections of 15 μm -deep stacks, acquired on 7 seedlings for each conditions. When indicated, images were deconvolved employing the Huygens Essential package (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Netherlands), with the following parameters: algorithm, CMLE; signal/noise ratio, 10; quality threshold, 0.01 %; maximum iterations, 100; background calculation, in/near objects. Three-dimensional surface rendering of deconvolved z-stacks was performed with the UCSF Chimera software (Pettersen et al.,

2004) version 1.8 (Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco supported by NIGMS P41-GM103311).

Statistical analysis was executed with Prism software version 5.0 (GraphPad). The P value is indicated as following: * means $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

FRAP analysis

Fluorescence recovery after photobleaching experiments were performed employing the "FRAP on the fly" mode of an iLAS2 module (Roper Scientifics). Only mCherry was photobleached, and structures were followed in time and space by keeping the GFP signal in focus, employing the DV2 emission splitter.

Analysis involved 5 steps. 1 : total intensity along the time series were normalized to the total intensity of the first slice to correct for long-term loss of fluorescence under normal observation. 2 : intensity of the bleached region was quantified by manually placing a round R.O.I. on the GFP signal, at each time point. 3 : background was measured in annular region surrounding the central R.O.I., and subtracted. 4 : Corrected intensity values were normalized to the pre-bleach level, estimated as the median of the 9 time points preceding the photobleaching. 5 : fluorescence recovery at 30 s was measured by linear interpolation.

Electron Microscopy

Samples corresponding to the apical 3 mm of five-day-old roots, were prepared for correlative light-electron microscopy essentially as described (Ripper et al., 2008) employing 3 % paraformaldehyde and 0.1 % glutaraldehyde in cacodylate buffer (0.1 M pH 6.8), and replacing polyvinylpyrrolidone with methylcellulose. 90 nm thin sections (Ultracut UC6, Leica), were collected on formwar and carbon coated nickel or copper grids, and GFP signals were collected by confocal microscopy after placing the grids on a microscope slide. Samples were then post-stained with aqueous 2 % uranyl acetate and lead citrate. For cryosubstituted samples, the apical 3 mm of five-day-old roots were frozen in 1-hexadecen with a high-pressure freezer apparatus (Leica EMPACT2). Freeze substitution was carried out in a Leica

freeze substitution unit (AFS2), in acetone, with a -90°C to -20°C temperature gradient. After 4 washes in 100 % v/v ethanol, root tips were embedded in LR white resin, and polymerisation was carried out at -20°C for 24 h, and then at 0°C for an additional 24 h under UV irradiation. Chemical fixation and image acquisition was as described (Markham et al., 2011).

References

- Avin-Wittenberg, T., Honig, A., and Galili, G. (2012). Variations on a theme: plant autophagy in comparison to yeast and mammals. *Protoplasma* 249, 285-299.
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, 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. *JCB* 182, 685-701.
- Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 16, 735-743.
- Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., and Yoshimori, T. (2008). The Atg16L complex specifies the site of LC3 lipidation for membrane biogenesis in autophagy. *Mol Biol Cell* 19, 2092-2100.
- Graef, M., Friedman, J.R., Graham, C., Babu, M., and Nunnari, J. (2013). ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Mol Biol Cell* 24, 2918-2931.
- 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.
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Oomori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., et al. (2013a). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature* 495, 389-393.
- Hamasaki, M., Shibutani, S.T., and Yoshimori, T. (2013b). Up-to-date membrane biogenesis in the autophagosome formation. *Curr Opin Cell Biol* 25, 455-460.
- Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., and Ohsumi, Y. (2007). The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy. *J Biol Chem* 282, 37298-37302.

Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* 11, 1433-1437.

Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A. (2010). Electron tomography reveals the endoplasmic reticulum as a membrane source for autophagosome formation. *Autophagy* 6, 301.

Honig, A., Avin-Wittenberg, T., Ufaz, S., and Galili, G. (2012). A new type of compartment, defined by plant-specific Atg8-interacting proteins, is induced upon exposure of Arabidopsis plants to carbon starvation. *Plant Cell* 24, 288-303.

Itakura, E., and Mizushima, N. (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* 6, 764-776.

Katsiarimpa, A., Kalinowska, K., Anzenberger, F., Weis, C., Ostertag, M., Tsutsumi, C., Schwechheimer, C., Brunner, F., Huckelhoven, R., and Isono, E. (2013). The deubiquitinating enzyme AMSH1 and the ESCRT-III subunit VPS2.1 are required for autophagic degradation in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 2236-2252.

Koyama-Honda, I., Itakura, E., Fujiwara, T.K., and Mizushima, N. (2013). Temporal analysis of recruitment of mammalian ATG proteins to the autophagosome formation site. *Autophagy* 9, 1-9.

Li, F., and Vierstra, R.D. (2012). Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends Plant Sci* 17, 526-537.

Liu, Y., Burgos, J.S., Deng, Y., Srivastava, R., Howell, S.H., and Bassham, D.C. (2012). Degradation of the endoplasmic reticulum by autophagy during endoplasmic reticulum stress in Arabidopsis. *Plant Cell* 24, 4635-4651.

Markham, J.E., Molino, D., Gissot, L., Bellec, Y., Hematy, K., Marion, J., Belcram, K., Palauqui, J.C., Satiat-Jeunemaitre, B., and Faure, J.D. (2011). Sphingolipids containing very-long-chain fatty acids define a secretory pathway for specific polar plasma membrane protein targeting in Arabidopsis. *Plant Cell* 23, 2362-2378.

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., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhiya, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J Cell Biol* 152, 657-668.

Mizushima, N., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y. (2011). The role of Atg proteins in autophagosome formation. *Annu Rev Cell Dev Biol* 27, 107-132.

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.

Nelson, B.K., Cai, X., and Nebenfuhr, A. (2007). A multicolored set of in vivo organelle markers for co-localization studies in Arabidopsis and other plants. *Plant J* 51, 1126-1136.

Onodera, J., and Ohsumi, Y. (2005). Autophagy is required for maintenance of amino acid levels and protein synthesis under nitrogen starvation. *J Biol Chem* 280, 31582-31586.

Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E. (2004). UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of computational chemistry* 25, 1605-1612.

Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., and Rubinsztein, D.C. (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* 12, 747-757.

Ripper, D., Schwarz, H., and Stierhof, Y.D. (2008). Cryo-section immunolabelling of difficult to preserve specimens: advantages of cryofixation, freeze-substitution and rehydration. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization* 100, 109-123.

Romanov, J., Walczak, M., Ibricu, I., Schuchner, S., Ogris, E., Kraft, C., and Martens, S. (2012). Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *EMBO J* 31, 4304-4317.

Rubinsztein, D.C., Shpilka, T., and Elazar, Z. (2012). Mechanisms of autophagosome biogenesis. *Curr Biol* 22, R29-34.

Suttangkakul, A., Li, F., Chung, T., and Vierstra, R.D. (2011). The ATG1/ATG13 protein kinase complex is both a regulator and a target of autophagic recycling in Arabidopsis. *Plant Cell* 23, 3761-3779.

Suzuki, K., Akioka, M., Kondo-Kakuta, C., Yamamoto, H., and Ohsumi, Y. (2013). Fine mapping of autophagy-related proteins during autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* 126, 2534-2544.

Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y. (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO J* 20, 5971-5981.

Suzuki, K., Kubota, Y., Sekito, T., and Ohsumi, Y. (2007). Hierarchy of Atg proteins in pre-autophagosomal structure organization. *Genes Cells* 12, 209-218.

Svenning, S., Lamark, T., Krause, K., and Johansen, T. (2011). Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1. *Autophagy* 7, 993-1010.

Thompson, A.R., Doelling, J.H., Suttangkakul, A., and Vierstra, R.D. (2005). Autophagic nutrient recycling in Arabidopsis directed by the ATG8 and ATG12 conjugation pathways. *Plant Physiol* 138, 2097-2110.

Walczak, M., and Martens, S. (2013). Dissecting the role of the Atg12-Atg5-Atg16 complex during autophagosome formation. *Autophagy* 9, 424-425.

Weidberg, H., Shvets, E., and Elazar, Z. (2011). Biogenesis and cargo selectivity of autophagosomes. *Annu Rev Biochem* 80, 125-156.

Weidberg, H., Shvets, E., and Shpilka, T. (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO j* 6, 808-809.

Xie, Z., Nair, U., and Klionsky, D.J. (2008). Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation. *Mol Biol Cell* 19, 3290-3298.

Yla-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Eskelinen, E.L. (2009). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* 5, 1180-1185.

Yoshimoto, K. (2012). Beginning to understand autophagy, an intracellular self-degradation system in plants. *Plant Cell Physiol* 53, 1355-1365.

Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., and Noda, T. (2004). Processing of ATG8s, ubiquitin-like proteins, and their deconjugation by ATG4s are essential for plant autophagy. *Plant Cell* 16, 2967-2983.

2. Bilan

Les plantes exprimant de manière constitutive la construction ATG5-GFP, nous ont permis de mettre en évidence la présence de cette protéine sur des différents types de structures punctiformes ou toroïdales dont la taille est comprise entre 0,3 et 2 μm . Ces structures, tout comme les autophagosomes, sont induites par la carence nutritionnelle et leur formation est bloquée par les inhibiteurs de PI3-Kinases.

L'observation simultanée de ATG5 et ATG8 nous a permis de démontrer que ATG5 est associée aux autophagosomes, mais cette interaction est transitoire. En effet, bien que ATG5 soit présente dès les étapes précédant le recrutement de ATG8, cette protéine n'est plus observée au niveau des corps autophagiques.

ATG5 n'est pas présent sur toute la membrane de l'autophagosome, mais uniquement au niveau de certains domaines du phagophore.

L'étude de la cinétique de formation de l'autophagosome montre que ATG5 est successivement présente sur le pourtour d'une structure plane et circulaire puis localisé au niveau de l'ouverture d'une structure creuse en forme de coupe. Les expériences de FRAP sur ces structures ont montré que la lipitation d'ATG8 avait lieu de manière importante lors de cette phase.

La fin de la cinétique de formation de l'autophagosome montre que la structure toroïdale marquée par ATG5 disparaît rapidement de manière synchrone avec la fermeture de l'autophagosome. Lors de ces dernières phases, il n'y a presque plus de lipitation de ATG8.

Enfin nous avons mis en évidence une très forte proximité, entre ce processus de formation de l'autophagosome et le réseau cortical du réticulum endoplasmique. Les structures marquées par ATG5 ont la particularité de se former exclusivement sur la partie du réseau qui fait face à la membrane plasmique. Les autophagosomes ainsi formés se retrouvent enfoncés dans ce réseau cortical du réticulum, suggérant l'implication de connections entre la formation des autophagosomes et le RE.

**Chapitre III. ETUDE DU ROLE DE ATG9 DANS LA
FORMATION DE L'AUTOPHAGOSOME**

Rappel du contexte de l'étude

L'analyse de la bibliographie montre que, parmi les nombreuses protéines impliquées dans l'autophagie, ATG9 possède une place particulière car elle est la seule protéine ATG transmembranaire. Chez la levure et les mammifères, il a été démontré qu'elle cycle entre des sites périphériques et le lieu de formation de l'autophagosome, suggérant son implication dans l'apport de membrane à partir de compartiments sources pour permettre la formation de l'autophagosome. L'étude de mutants *Atg9* confirme que la protéine est essentielle au bon déroulement de la voie autophagique.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, les souches mutées pour *Atg9*, présentent une autophagie fortement perturbée : ces cellules sont incapables d'accumuler des corps autophagiques dans leurs vacuoles en présence d'inhibiteurs de protéases et présentent un taux de survie plus faible en conditions de carence azotée (Lang, Reiche et al. 2000). Chez les mammifères, dans les cellules *mATG9^{-/-}* (MEF's issues de souris *Atg9^{-/-}*) présente pour sa part, un nombre d'autophagosomes fortement réduit (Orsi, Razi et al. 2012).

La contribution des vésicules ATG9 pour former la membrane de l'autophagosome fait cependant débat. Chez la levure, Yamamoto *et al.*, (2012) ont démontré que des vésicules ATG9 participeraient directement aux premiers évènements permettant la formation de la membrane de l'autophagosome. Par contre, chez les mammifères, *mATG9* ne semble pas strictement requise pour la formation d'autophagosomes, car, bien que plus rares, ceux-ci ont toujours la capacité de se former dans les cellules *mATg9^{-/-}* (Orsi, Razi et al. 2012). De plus, chez les mammifères, alors des interactions entre les vésicules ATG9 et l'autophagosome ont été observées, il n'y a pas d'intégration de la membrane de ces vésicules dans celle de l'autophagosome (Orsi, Razi et al. 2012).

Chez *Arabidopsis*, alors que pour de nombreuses protéines ATG on trouve plusieurs isoformes, il n'existe qu'une seule protéine ATG9, orthologue de *ScAtg9*. Les plantes mutantes *atg9*, présentent un phénotype typique des mutants autophagiques, à savoir, une sensibilité accrue face à la carence en carbone ou en azote ainsi qu'une sénescence précoce (Hanaoka, Noda et al. 2002), confirmant un rôle majeur pour ATG9 dans le fonctionnement de la voie autophagique. Cependant, des approches biochimiques montrent que la lipitation d'ATG8, essentielle à son recrutement sur la membrane de l'autogagosome en croissance a

bien lieu chez les mutants *atg9* (Yoshimoto, Hanaoka et al. 2004). La question de la participation d'ATG9 dans la formation de l'autophagosome dans la cellule végétale reste donc toujours ouverte.

Au jour d'aujourd'hui, il existe très peu de données concernant le comportement de ATG9 au niveau cellulaire. Notre objectif, dans cette partie du travail, est de mieux comprendre l'implication de ATG9 dans l'autophagie, sa contribution lors de la formation de l'autophagosome, et éventuellement identifier grâce à cette protéine membranaire, une ou plusieurs sources de membrane impliquées dans ce processus encore peu compris chez les plantes.

Stratégie employée :

Nous avons d'abord étudié le rôle que joue ATG9 dans l'autophagie chez *Arabidopsis*. Pour cela nous avons utilisé des mutants *atg9*, afin d'estimer l'impact d'une absence d'ATG9 sur le flux autophagique puis sur la formation des autophagosomes.

Ensuite, nous nous sommes intéressés à la localisation cellulaire de ATG9. Pour cela nous avons généré des lignées exprimant la protéine ATG9 fusionnée à une protéine fluorescente, afin d'identifier les structures sur lesquelles se trouve ATG9 ainsi que leur dynamique.

Enfin, nous avons tenté d'identifier des interactions entre les vésicules ATG9 et les autres marqueurs de la voie autophagique, afin de mettre en évidence une implication des vésicules ATG9 dans les étapes de formation de l'autophagosome.

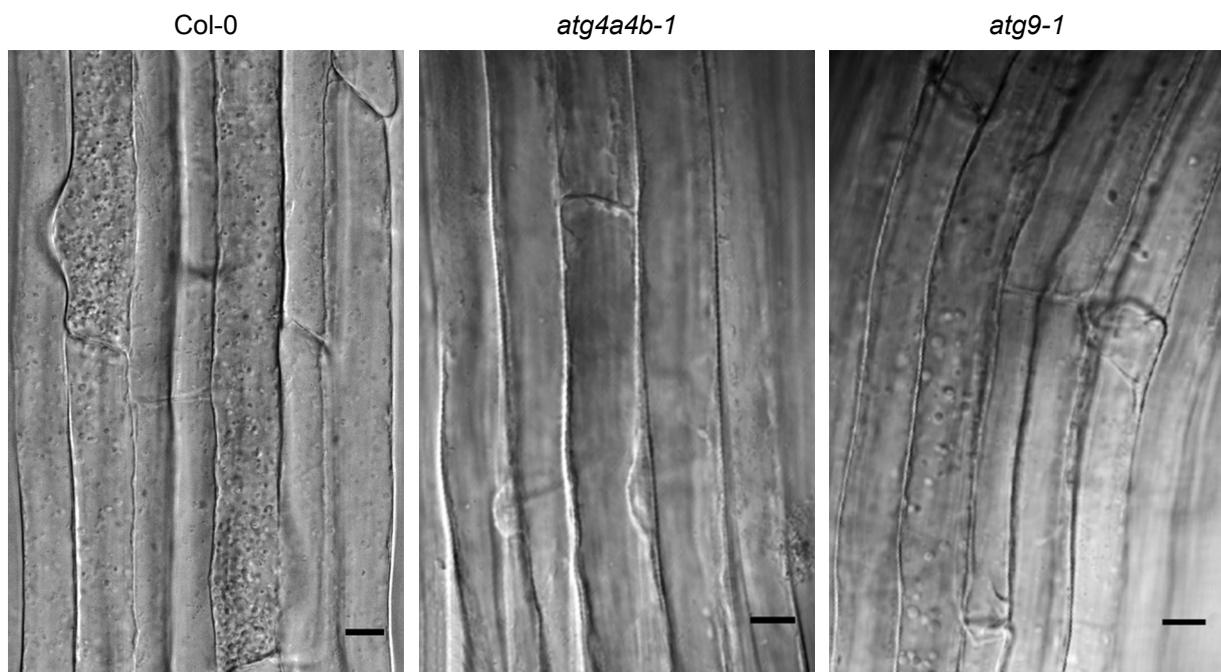


Figure 83 : Mise en évidence d'un flux autophagique chez les mutants *atg9*

Racines de plantules d'*Arabidopsis* (Col-0, *atg4a4b-1*, *atg9-1*). Après 5 jours de croissance en milieu $\frac{1}{2}$ MS, les plantules sont transférées sur un milieu $\frac{1}{2}$ MS-N-C liquide, à l'obscurité, pendant 8h en présence de $1 \mu\text{M}$ de concanamycine A. Echelle : $10 \mu\text{m}$.

Microscopie à contraste interférentiel (DIC)

1. Etude de l'autophagie chez le mutant *atg9*

1.1. Mise en évidence de l'altération du flux autophagique

Comme nous l'avons vu précédemment, il est possible de mettre en évidence la présence d'un flux autophagique au niveau des cellules de racine d'*Arabidopsis*, en observant l'accumulation des corps autophagiques dans les vacuoles lorsque les plantules sont traitées avec la concanamycine A. Ce phénomène peut être facilement observé sans utiliser de marqueur spécifique, par microscopie à contraste interférentiel (DIC).

Lorsque les plantules Col-0 sont placées pendant 8h dans un milieu carencé en azote et carbone, contenant de la concanamycine A on observe une forte accumulation de corps autophagiques dans les vacuoles (Fig. 83). Lorsque l'on place les plantules *atg4a4b-1*, dans des conditions identiques, on constate que les vacuoles sont totalement dépourvues de corps autophagiques, ce qui confirme que chez le mutant *atg4a4b-1*, la voie autophagique est totalement bloquée (Fig. 83).

Afin d'identifier le rôle de ATG9 dans l'autophagie, nous avons étudié deux lignées possédant un ADN-T inséré dans la séquence du gène ATG9 (*atg9-1* (Hanaoka, Noda et al. 2002); *atg9-2* (Inoue, Suzuki et al. 2006)), pour lesquelles, la production de l'ARNm codant pour ATG9 est abolie. Après 8 h de carence nutritionnelle, en présence de concanamycine A, les plantules *atg9-1* et *atg9-2*, présentent une accumulation de corps autophagiques au niveau de la vacuole (Fig. 83). Cette observation suggère que contrairement au mutant *atg4a4b-1*, les mutants *atg9* ont toujours la capacité de produire des autophagosomes et que ceux-ci fusionnent avec la vacuole. Cependant, lorsque l'on compare l'accumulation des corps autophagiques dans les plantules Col-0 et chez les mutants *atg9*, on remarque que le nombre de structures présentes au niveau des vacuoles, est beaucoup plus faible chez les mutants *atg9*. Ces observations rejoignent les données décrites pour les cellules animales. De plus ces corps autophagiques semblent plus volumineux et moins réguliers que ceux que l'on peut observer chez Col-0 (Fig. 83).

Ces premiers résultats suggèrent que chez les mutants *atg9*, la formation d'autophagosomes ainsi que leur fusion avec la vacuole semble toujours possible. Cependant

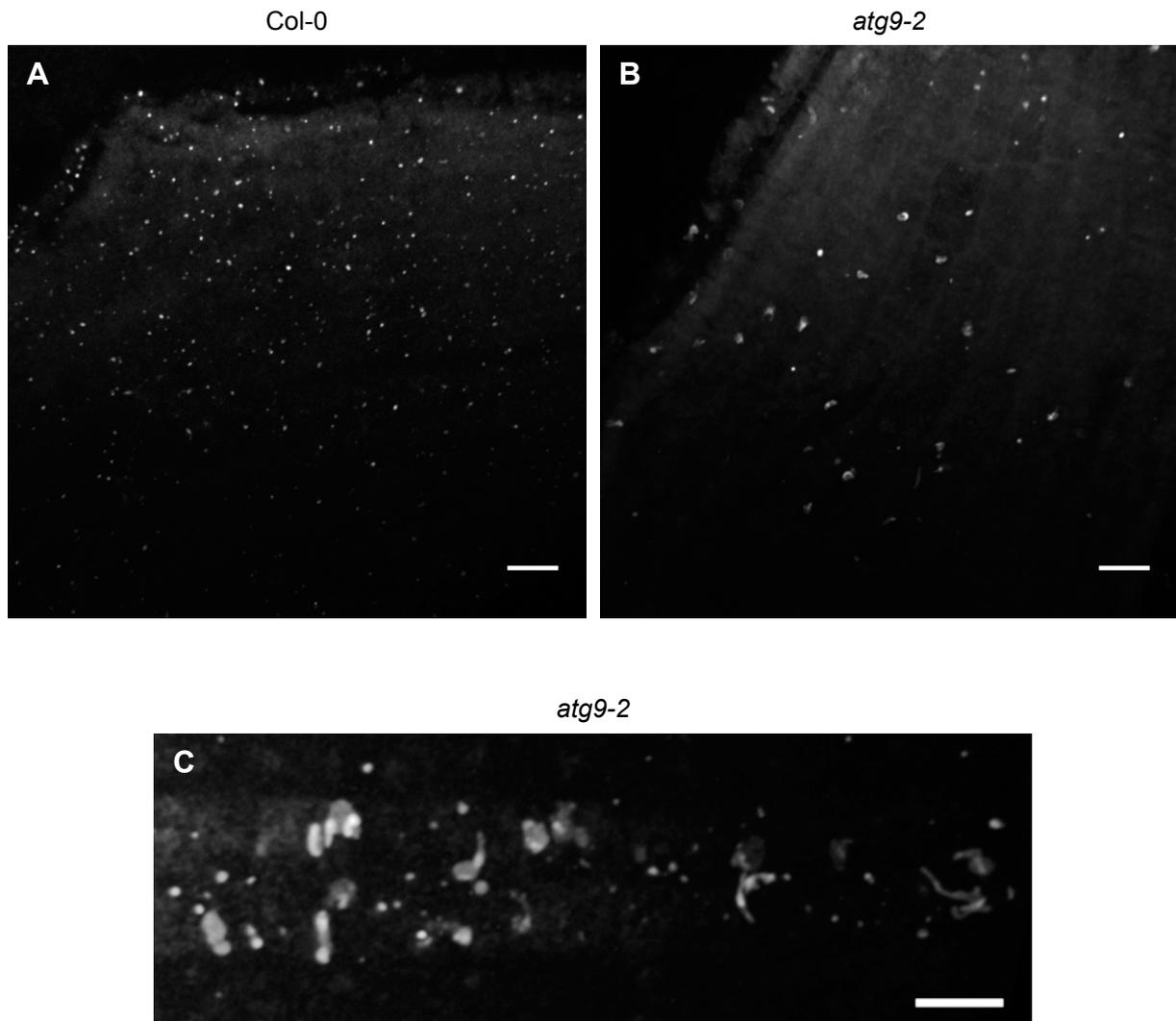


Figure 84 : Immunomarquage des autophagosomes au niveau de la racine du mutant *atg9-2*

Immunomarquage "whole mount" avec un anticorps α -ATG8 effectué sur des plantules Col-0 et *atg9-2*. Plantules de 5 jours cultivées sur milieu $\frac{1}{2}$ MS puis placées pendant 4 heures en milieu liquide $\frac{1}{2}$ MS-N-C à l'obscurité. De nombreuses structures punctiformes sont marquées chez les plantules Col-0 (A). Chez le mutant *atg9-2*, peu de structures sont observables (B) et ces structures ont une forme et une taille très différente de celles observées chez Col-0 (C). MIPs (40 μ m), échelle : 10 μ m.

Spinning Disk

le flux autophagique semble fortement réduit et il se peut également que la formation des autophagosomes soit en partie altérée, ce qui expliquerait la présence de corps autophagiques de taille beaucoup plus importante que dans des plantules sauvages.

1.2. Présence de structures autophagiques dont la morphologie est altérée

Nous avons souhaité étudier les structures mises en évidence dans les vacuoles du mutant *atg9-2*, et nous assurer qu'elles provenaient bien de la voie autophagique.

Dans un premier temps, afin d'étudier les autophagosomes formés par le mutant *atg9-2*, nous avons procédé par immunofluorescence avec un anticorps dirigé contre ATG8. L'immunomarquage révèle, chez les plantules Col-0 en conditions de carence nutritionnelle, un nombre important de structures punctiformes (Fig. 84A). Ces autophagosomes, de taille comprise entre 0,5 μm et 2 μm , possèdent une forme relativement régulière. Chez le mutant *atg9-2*, on observe beaucoup moins de structures marquées par l'anticorps α -ATG8, confirmant une réduction du nombre d'autophagosomes, suggérée précédemment. De plus, le pattern d'immunofluorescence révèle que les autophagosomes formés dans le mutant *atg9-2* sont très différents de ceux observés dans les cellules de souche sauvage. En effet, ces structures ont une taille bien supérieure à celle attendue pour un autophagosome d'*Arabidopsis* (Fig. 84B) : même si on observe certaines structures punctiformes dont la taille est comprise en 0,5 μm et 2 μm , on observe également des structures, de forme beaucoup moins régulière et dont la taille peut être supérieure à 5 μm . Parmi ces structures particulières, on distingue non seulement des vésicules de taille très importante, présentant souvent un fort degré de déformation, mais également des structures tubulaires (Fig. 84C).

Ces résultats confirment que chez le mutant *atg9-2* il y a bien formation d'autophagosomes marqués par ATG8, suggérant que la lipidation de ATG8 au niveau de la membrane de l'autophagosome n'est pas dépendante d'ATG9, ce qui est en accord avec les résultats obtenus précédemment *in vitro* par Yoshimoto *et al.*, (2004). Cependant, le processus de formation des autophagosomes semble altéré car la morphologie de ces structures, est très différente de celle observée habituellement chez *Arabidopsis*.

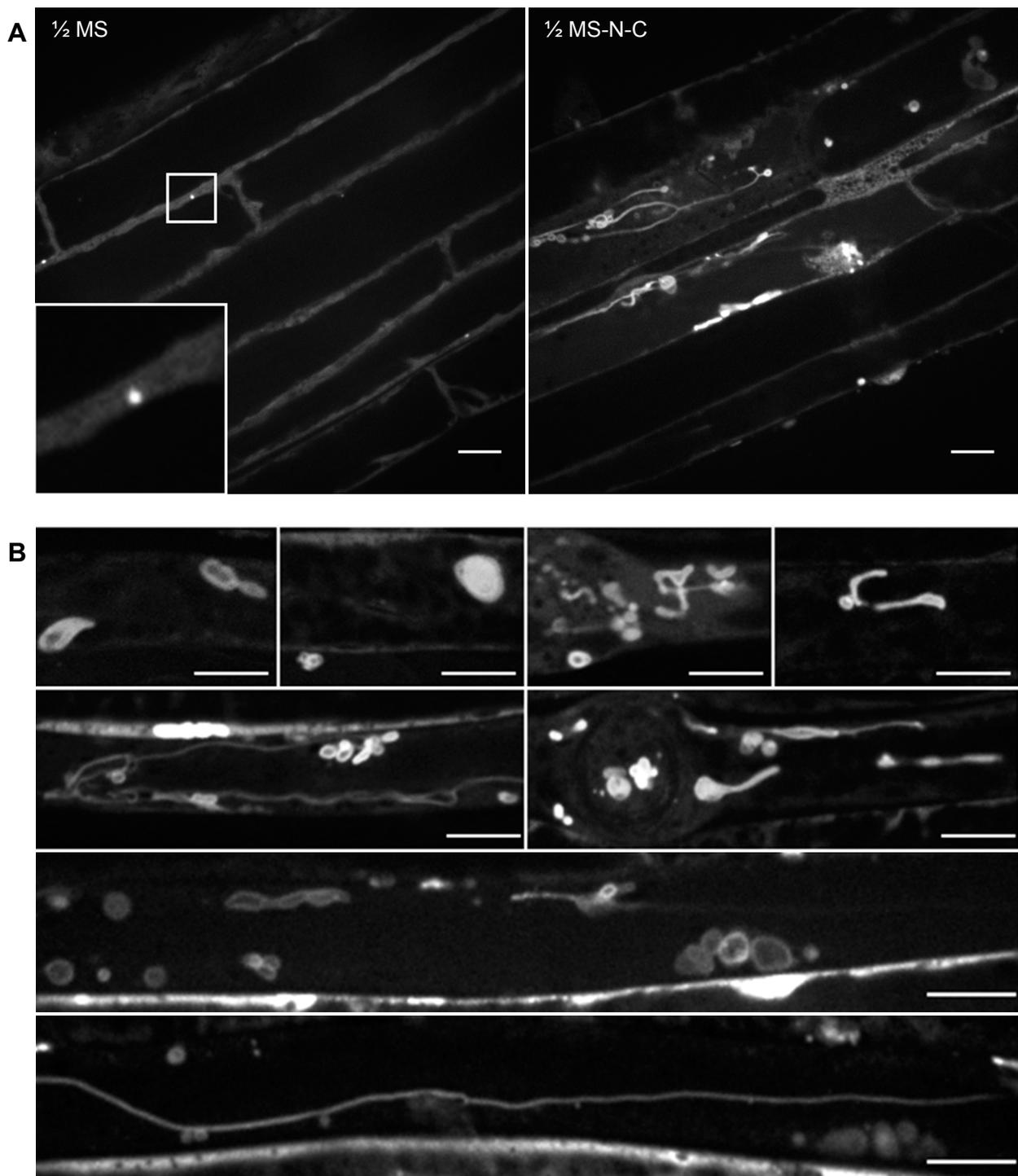


Figure 85 : Morphologie des autophagosomes chez le mutant *atg9-2*

(A) Plantules d'*Arabidopsis atg9-2*, exprimant de manière constitutive mCh-ATG8e, après 5 jours de croissance sur milieu $\frac{1}{2}$ MS, sont transférées sur milieu liquide $\frac{1}{2}$ MS ou sur $\frac{1}{2}$ MS-N-C, à l'obscurité, pendant 2h. (B) Grossissement sur les différentes structures observées chez le mutant *atg9-2* dans des conditions de carence nutritionnelle. Echelle : 10 μ m.

Spinning Disk

Pour compléter ces observations obtenues par immunofluorescence, nous avons suivi la dynamique de cette population d'autophagosomes modifiés chez le mutant *atg9-2* en utilisant ATG8 couplée à la mCherry. Nous avons donc généré par croisement, des plantules *atg9-2*, exprimant de manière stable la construction mCh-ATG8e.

L'obtention de plantules *atg9-2*, exprimant de manière constitutive mCh-ATG8e, nous permet, tout d'abord, d'étudier la formation d'autophagosomes chez ce mutant dans des conditions où l'autophagie est à un niveau basal (Fig. 85A). En effet, l'observation de plantules directement prélevées depuis leur milieu de culture, ou transférées pendant 2h sur un milieu liquide ½ MS, permet de mettre en évidence la présence d'un faible nombre d'autophagosomes, d'apparence tout à fait semblable aux autophagosomes observés chez les plantules non mutées et cultivées en conditions riches. Lorsque l'on induit l'autophagie chez ce mutant par carence nutritionnelle, on observe l'apparition de nombreuses structures, marquées par mCh-ATG8e (Fig. 85A). Cependant, comme nous l'avons observé précédemment, les structures marquées par ATG8 sont ici radicalement différentes de celles que l'on peut observer chez une plante non mutée, dans des conditions où l'autophagie est présente à un niveau élevé. Les structures, marquées par ATG8, les plus étranges que l'on peut observer chez ce mutant sont de longs tubules, pouvant atteindre plus de 100 µm de longueur. Ces tubules sont des structures dynamiques qui modifient perpétuellement leur forme et il est fréquent de les voir former des ramifications (Fig. 85B).

Ces résultats sont en accord avec les précédentes observations et confirment que chez le mutant *atg9-2*, la formation des autophagosomes n'est pas bloquée, mais l'absence de ATG9 semble provoquer la production d'autophagosomes aberrants. De plus, ces résultats indiquent que la formation des autophagosomes est d'autant plus perturbée que l'autophagie est à un niveau élevé.

2. Caractérisation des structures marquées par ATG9

ATG9 étant une protéine membranaire, l'étude de sa localisation cellulaire, pourrait permettre d'identifier des compartiments impliqués dans la formation de l'autophagosome. Pour répondre à cette question, nous avons commencé par générer les constructions, qui nous permettront de localiser cette protéine.

2.1. Construction de protéines rapporteurs pour localiser ATG9

ATG9 est une protéine de 866 acides aminés, dont une grande région centrale (Trp-206-Gly-549) possède une forte similitude de séquence avec la protéine Atg9 de *Saccharomyces cerevisiae* (Hanaoka, Noda et al. 2002). Cette région centrale, globalement hydrophobe, correspond probablement aux multiples domaines transmembranaires de ATG9, identifiés chez les mammifères (Young, Chan et al. 2006). Les domaines C-terminal et N-terminale de ATG9 sont majoritairement hydrophiles et présentent une importante divergence entre les espèces. Chez les mammifères, ces deux extrémités sont exposées du côté cytosolique des vésicules ATG9, cependant cette information n'a pas été confirmée chez les plantes.

Afin de tester la meilleure configuration possible, des fusions en N-terminale et C-terminale ont été réalisées en couplant la GFP ou mCherry à ATG9. Pour tester l'expression de ces différentes constructions, nous avons tout d'abord réalisé des transformations transitoires dans les feuilles de tabac. Le résultat de ces expériences préliminaires nous ont permis de constater que l'expression des fusions N-terminale et C-terminale, produisaient un marquage cellulaire identique, composé de nombreuses structures punctiformes de petite taille ($< 0,5 \mu\text{m}$) et très mobiles. Cependant les fusions où la protéine fluorescente était placée en N-terminale, ont systématiquement produit un marquage cellulaire plus fort, ce qui nous a conduits à utiliser ces constructions pour la suite du travail.

Nous avons donc transformé des plantes avec les constructions GFP-ATG9 et mCh-ATG9, en aval d'un promoteur 35S (fort et constitutif), puis effectué les étapes de sélection nécessaires afin d'obtenir des lignées exprimant de manière stable ces constructions.

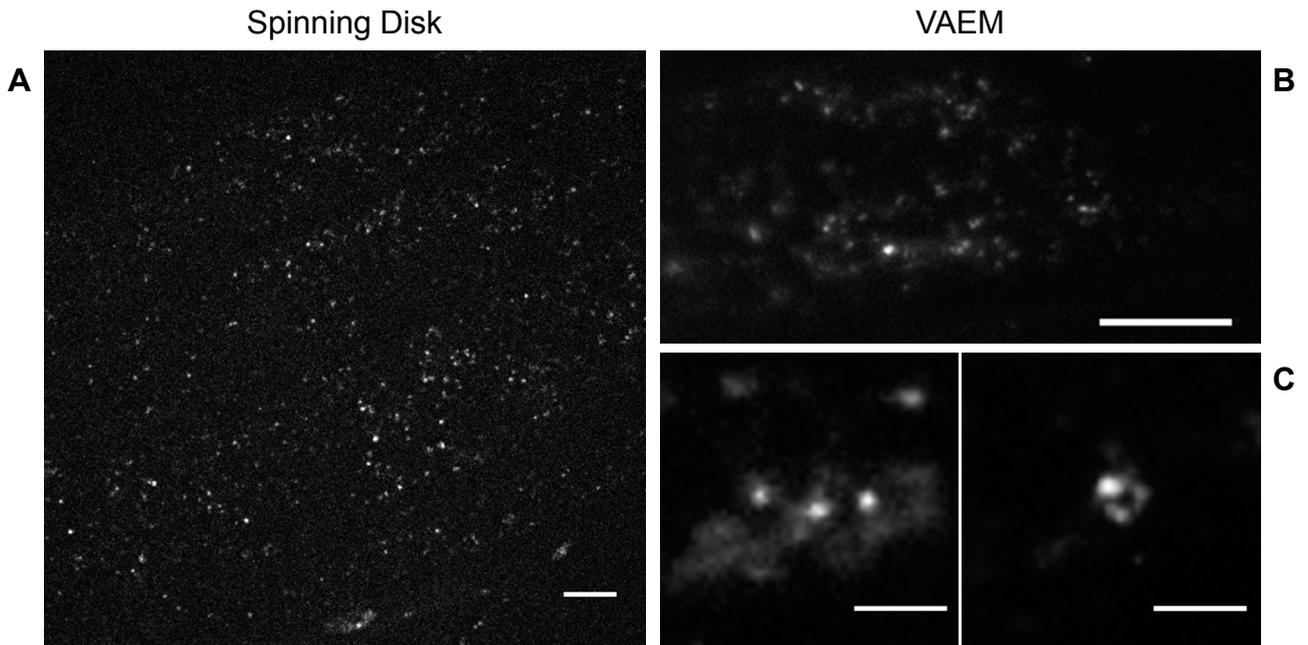


Figure 86 : Localisation cellulaire de GFP-ATG9 chez Arabidopsis

(A) Racine GFP-ATG9, observée en microscopie confocale à Spinning Disk. Echelle : 10 μm . (B) Hypocotyles de plantules GFP-ATG9 observés en microscopie à épifluorescence à angle variable (VAEM). Echelle : 10 μm . (C) Détails de structures observées dans les conditions (B). Echelle : 2 μm .

Spinning Disk / Microscopie à épifluorescence à angle variable (VAEM)

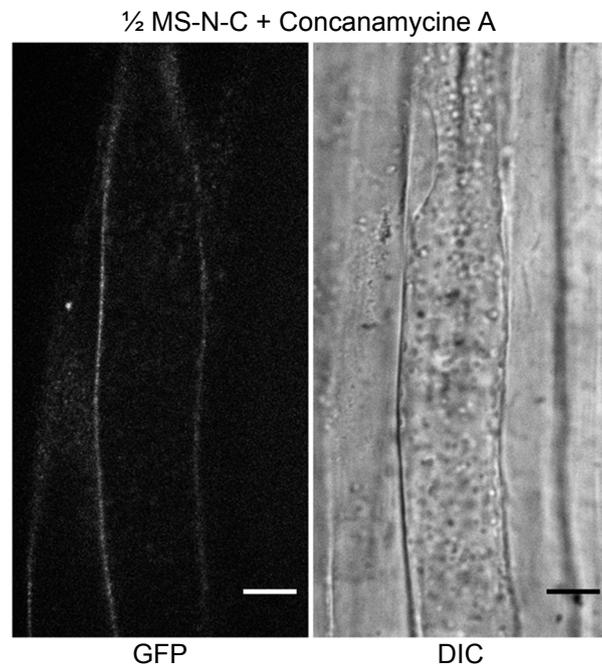


Figure 87 : Les corps autophagiques ne sont pas marqués par GFP-ATG9

Plantules GFP-ATG9, après 4h de culture en milieu liquide $\frac{1}{2}$ MS-N-C + Concanamycine A (1 μM)
Echelle : 10 μm .

Spinning Disk

2.2. Imagerie confocale des signaux ATG9

L'étude de cette protéine marquée par la GFP ou mCherry, s'est avéré une tâche très difficile, essentiellement de par la nature des structures marquées. En effet, comme lors des transformations transitoires sur feuilles de tabac, ATG9 est présente sur de petites vésicules ($< 0,5 \mu\text{m}$), (Fig. 86A) présentant une grande dynamique. La fluorescence de ces structures est très faible et dépasse légèrement le signal provenant du bruit de fond, ce qui rend leur détection très difficile. De plus, la grande mobilité de ces structures, nous contraint à utiliser des cadences d'acquisition élevées, incompatibles avec de longs temps d'exposition.

Afin d'améliorer la détection du signal provenant des constructions FP-ATG9, nous avons observé les plantules en utilisant la microscopie à épifluorescence à illumination à angle variable (VAEM, Variable-angle epifluorescence microscopy) (Konopka and Bednarek 2008). Cette technique, proche du TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) permet d'obtenir un signal fort avec peu de bruit de fond, en ne détectant que les objets très proches de la membrane plasmique. Pour cette technique, l'échantillon doit être très proche de la lamelle, c'est pourquoi, nous nous sommes focalisés sur l'hypocotyle, plus volumineux et plus souvent en contact avec la lamelle. L'observation d'hypocotyles GFP-ATG9 en VAEM a permis une meilleure détection du signal, permettant de distinguer de manière plus fine ces structures (Fig. 86B, 86C). On a pu observer que ces structures avaient tendance à interagir entre elles en formant de manière très dynamique des associations. De manière exceptionnelle, nous avons observé quelques regroupements de structures en forme d'anneaux, rappelant les structures observées avec ATG5 (Fig. 86C). Cependant, même en VAEM, l'observation des structures reste laborieuse et cette technique, particulièrement adaptée pour les événements corticaux, ne permet de détecter qu'une faible portion des vésicules ATG9 présentes au sein de la cellule.

Nous nous sommes intéressés à savoir si, tout comme les autres marqueurs de la voie autophagique (ATG5 et ATG8), une carence nutritionnelle provoquait une modification des structures marquées par ATG9. La comparaison des structures marquées par GFP-ATG9, au niveau des cellules de plantules cultivées en milieu riche et celle cultivées en milieu carencé,

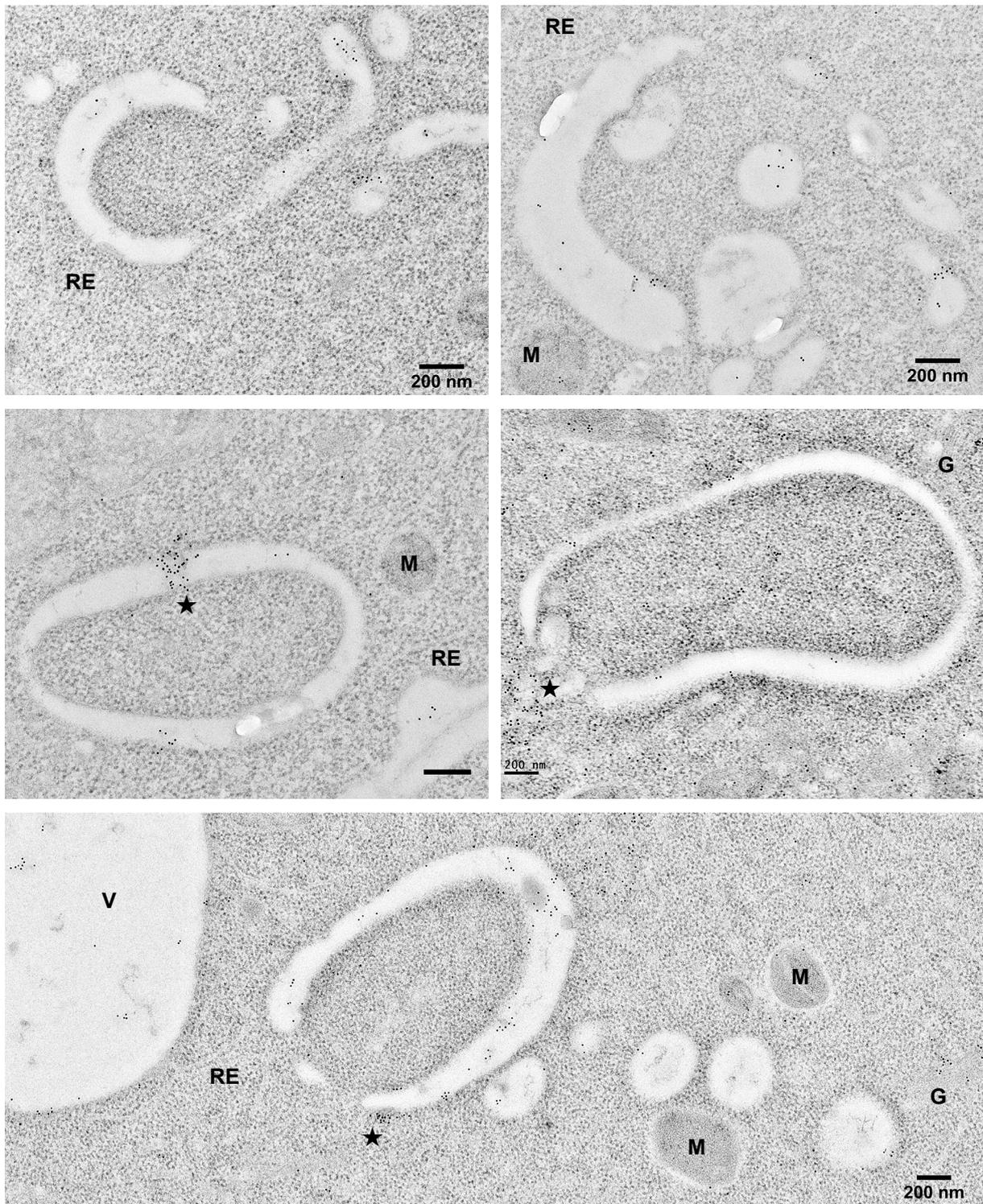


Figure 88 : Immunolocalisation de ATG9

Immunomarquage utilisant un anticorps α -GFP sur des coupes de racines d'Arabidopsis exprimant GFP-ATG9, après une carence nutritionnelle. G : Golgi, M : Mitochondrie, RE : Réticulum Endoplasmique, V : Vacuole, ★ : Accumulation du marquage α -GFP. Echelle : 200 nm.

Fixation chimique, Résine LR White, Microscopie électronique en transmission

s'est avérée une tâche délicate. En effet, les difficultés de détection du signal, associées au nombre important de structures présentes, ne nous a pas permis d'évaluer un influence de la carence sur le nombre, la taille, ou la forme de ces structures, ni de détecter un réarrangement cellulaire différent des structures marquées par ATG9.

Par la suite, nous avons utilisé la concanamycine A, pour provoquer l'accumulation de corps autophagiques dans la vacuole et mettre ainsi en évidence la présence éventuelle d'ATG9 sur ces structures. L'observation des plantules GFP-ATG9 traitées par la concanamycine A, montre que malgré la présence de nombreux corps autophagiques dans la vacuole (détectable par DIC), ces structures sont cependant dépourvues de fluorescence (Fig. 87).

ATG9-GFP marque des structures de petite taille et extrêmement dynamiques, difficilement détectables dans nos conditions. Ce marqueur n'est présent ni à l'intérieur de l'autophagosome, ni au niveau de la membrane interne de cette structure.

2.3. Etude ultrastructurale

Pour finir, afin d'identifier les structures sur lesquelles se trouve ATG9, et pour étudier à l'échelle membranaire, la participation de ATG9 à la formation de la membrane de l'autophagosome, nous avons tenté d'identifier ces structures en microscopie électronique en transmission. Pour cela nous avons effectué des immunomarquages sur des échantillons provenant de racines de plantules ayant subi une carence nutritionnelle, et exprimant de manière constitutive GFP-ATG9, en utilisant un anticorps dirigé contre la GFP (Fig. 88). Les résultats de ces immunomarquages, suggèrent que GFP-ATG9 est particulièrement présent sur de nombreuses structures tubulo-vésiculaires dont le lumen possède un aspect similaire à celui de la vacuole ou à l'espace présent entre les deux membranes d'un autophagosome. De manière intéressante ces structures tubulo-vésiculaires sont fréquemment observées au niveau de structures concaves, rappelant les membranes d'isolement. GFP-ATG9 semble également présent au niveau de différentes structures comme des Golgi, la membrane des mitochondries ainsi que les membranes de structures ressemblant à des autophagosomes. Les billes d'or indiquant la présence de GFP-ATG9 sont également présentes au niveau du cytoplasme, sans

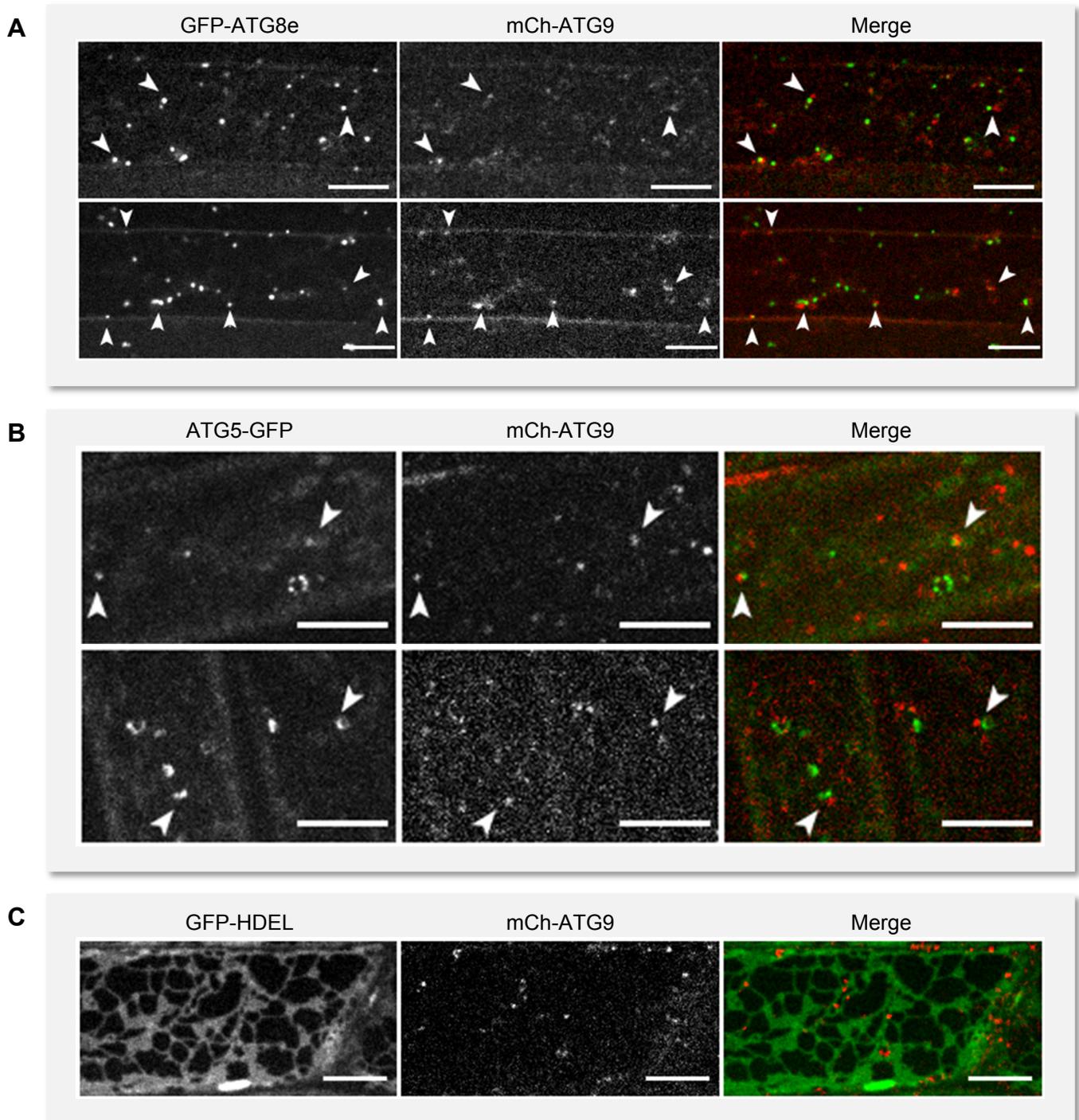


Figure 89 : Recherche d'évènements de colocalisation entre les structures ATG9 et les différents marqueurs des autophagosomes et du réticulum endoplasmique

Observation de lignées exprimant de manière stable mCh-ATG9 ainsi que GFP-ATG8e (A), ATG5-GFP (B), ou GFP-HDEL (C). Racines observées après une carence nutritionnelle. \blacktriangleright : évènement d'interactions probables entre deux structures. Echelle : 10 μm .

Spinning Disk

que l'on soit en mesure d'identifier une structure membranaire, avec ce type d'approche. Ces signaux forment fréquemment des agglomérats que l'on retrouve souvent à proximité d'un endroit précis de l'autophagosome.

2.4. Interactions des structures ATG9 avec les autophagosomes

Afin d'étudier si les structures ATG9 interagissent avec les autophagosomes ou sont impliquées lors des étapes de leur formation, nous avons entrepris de générer des plantes exprimant de manière stable mCh-ATG9 ainsi que GFP-ATG8e ou ATG5-GFP. L'obtention de lignées doublement homozygotes est en cours, cependant nous disposons des lignées F1, hétérozygotes pour chaque construction, et les premières observations effectuées sur ces plantes nous permettent déjà d'étudier d'éventuels évènements de colocalisation entre ces différents marqueurs.

Lorsque l'on observe les plantules exprimant mCh-ATG9 et GFP-ATG8e, on peut voir que les autophagosomes, marqués par ATG8, ne le sont pas par ATG9. Cependant on observe fréquemment les structures ATG9, au contact des autophagosomes (Fig. 89A). Ces interactions, impliquant de simples structures ATG9 ou des agglomérats, sont des évènements très dynamiques et au bout de quelques secondes, les deux structures se séparent.

Concernant les lignées exprimant mCh-ATG9 et ATG5-GFP, quelques interactions entre des structures ATG9 et des signaux ATG5 punctiformes sont également observées (Fig. 89B). De nouveau les contacts sont des évènements rares et éphémères (< 10 s).

A ce stade de l'étude, il est trop tôt pour établir si les quelques interactions observées entre des structures ATG9 et les autophagosomes marqués par ATG8 ou ATG5, sont le fruit d'un recrutement spécifique et traduisent la présence d'un processus précis. L'absence de marquage global des autophagosomes par ATG9, confirme que cette protéine, et les structures sur laquelle elle se trouve, ne sont pas intégrées au niveau de la membrane de l'autophagosome lors de sa formation.

2.5. Interactions entre ATG9 et le réticulum endoplasmique

Comme nous l'avons vu précédemment, la formation des autophagosomes, dans nos conditions de carence nutritionnelle, se déroule au niveau du réticulum endoplasmique. Afin d'étudier la possibilité d'interactions entre les structures ATG9 et le réticulum endoplasmique, des croisements ont été effectués entre des plantules mCh-ATG9 et des plantules GFP-HDEL. Les F1, résultant de ces croisements, ont été directement observées. Cette étude met en évidence que, malgré le nombre important de vésicules ATG9 et leur répartition cellulaire préférentiellement corticale, la grande majorité des structures ATG9 sont en contact avec le RE (Fig. 89C).

Malgré l'aspect très dynamique de ce marquage, il est fréquent d'observer plusieurs structures ATG9 s'assembler de manière transitoire au niveau du RE.

3. Bilan

Les données de la littérature indiquaient que les mutants *atg9* d'*Arabidopsis*, présentaient un phénotype de sénescence précoce ainsi qu'une sensibilité accrue à la carence nutritionnelle, suggérant une déficience de la voie autophagique. Cependant d'autres données, obtenues par des approches biochimiques ont mis en évidence que chez le mutant *atg9*, la lipudation d'ATG8 n'était pas affectée.

Les résultats de nos études sur le mutant *atg9*, nous ont permis de réconcilier ces deux observations, à première vue contradictoires. En effet, nous avons montré que chez le mutant *atg9*, la lipudation de ATG8 avait bien lieu, cependant les structures, sur lesquelles ATG8 se retrouve ancrée sont très différentes des autophagosomes que l'on peut observer chez une plantule sauvage lors d'une carence nutritionnelle. La conséquence de cette altération de forme et de structure des autophagosomes, semble être une forte diminution du flux autophagique, expliquant ainsi le phénotype du mutant en conditions de carence nutritionnelle.

Nous avons ensuite étudié la localisation cellulaire d'ATG9. La microscopie à fluorescence nous a permis de mettre en évidence la présence de ATG9 au niveau de petites structures ($< 0,5 \mu\text{m}$) punctiformes, extrêmement mobiles. Les approches de microscopie électronique en transmission, nous ont permis d'observer de manière fréquente un marquage en proximité de structures ressemblant à des autophagosomes en cours de formation.

De manière intéressante, contrairement à ATG5 et ATG8, le "pattern" du signal GFP-ATG9, n'est pas altéré par la carence nutritionnelle. Ces résultats ont également été confirmés sur des lignées cellulaires de BY-2 exprimant cette construction, où l'on observe un signal GFP-ATG9 identique à celui obtenu chez *Arabidopsis* (Annexe 1, Fig. 96bis).

Enfin, concernant l'hypothèse d'une participation directe de vésicules ATG9 dans la formation de la membrane de l'autophagosome, nous avons mis en évidence que ATG9 n'est pas intégré dans la membrane de l'autophagosome. Cependant nous avons observé de nombreux événements de contact transitoires entre les vésicules ATG9 et les structures marquées par ATG5, ATG8 et également le réseau cortical du réticulum endoplasmique.

Ces résultats suggèrent que les vésicules ATG9 ne sont pas massivement impliquées dans la genèse de la membrane de l'autophagosome, *via* des processus de fusion, mais qu'elles jouent un rôle plus précoce au niveau du RE ou transitoire au niveau de l'autophagosome en formation.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Ce travail de thèse avait pour but d'étudier, à travers la formation de l'autophagosome, un exemple des mécanismes de remodelage du système endomembranaire, et de formation de nouveaux compartiments, mis en place par la cellule lors de processus d'adaptation face à des changements dans l'environnement.

Une première partie de ce travail nous a permis de mettre en place les bonnes procédures pour contrôler l'induction de l'autophagie dans la racine d'*Arabidopsis*.

1. La racine d'*Arabidopsis*, un bon modèle pour l'étude de l'autophagie

La racine de plantes est remarquable par son écoute aux moindres variations des conditions environnementales, ce qui dans notre cas s'est traduit, lors des premières expériences, par la présence d'un niveau conséquent et très variable d'autophagie. Ces observations avaient déjà été constatées par un autre laboratoire, qui avait alors proposé l'existence d'un niveau constitutif élevé d'autophagie dans la racine, permettant l'apport de membrane pour l'expansion de la vacuole dans les cellules épidermiques en croissance (Inoue, Suzuki et al. 2006) ; (Yano, Takao et al. 2007). Or, nous montrons que la gestion des conditions de manipulation des plantules et des méthodes de visualisation des autophagosomes (méthode de montage, réduction de la phototoxicité), permet de contrôler le niveau d'autophagie présent dans les cellules épidermiques de la racine. Dans nos conditions, le niveau basal d'autophagie en milieu riche demeure faible, comparable à ceux rencontrés dans les parties aériennes des plantules.

Ces résultats montrent que les niveaux élevés d'autophagie précédemment décrits comme constitutifs découlaient, en réalité, d'une réponse aux stress de cet organe, et nous confortent dans le choix de la racine d'*Arabidopsis* comme modèle expérimental.

Le suivi de la formation des autophagosomes en condition de carence nutritionnelle nous a permis de mettre en évidence que l'induction de l'autophagie est un processus très réactif. En effet, au bout de 30 min de carence nutritionnelle, nous sommes en mesure de constater une augmentation du nombre d'autophagosomes formés. Cette induction rapide et

robuste nous a permis de travailler dans de bonnes conditions pour étudier la formation de l'autophagosome. Pour cela, nous avons évalué la possibilité d'utiliser ATG5 afin d'explorer les évènements précoces de la voie autophagique.

2. Identification des structures autophagosomales en croissance

ATG5 s'est révélé être un bon marqueur des étapes de formation des autophagosomes chez les plantes. La génération de plantes exprimant ATG5 et ATG8 couplées à des protéines fluorescentes, nous a permis de mettre en évidence que, tout comme chez les mammifères, ATG5 est recrutée au niveau de la membrane d'isolement ou phagophore (Mizushima, Yamamoto et al. 2001). Ce recrutement d'ATG5 est rapidement suivi de celui d'ATG8 lors des étapes d'élongation de la membrane d'isolement. Enfin, en étant absent de l'autophagosome une fois celui-ci formé, ATG5 permet d'identifier les autophagosomes en cours de formation.

En conditions de carence nutritionnelle, 80 % des autophagosomes étaient marqués par ATG5, ce qui indique que la grande majorité des structures observées grâce à GFP-ATG8 sont des autophagosomes en cours de formation, et non des autophagosomes formés en transit. Ce résultat indique également que suite à leur formation, les autophagosomes sont rapidement dégradés, en atteignant rapidement la vacuole. Dans la cellule végétale, on notera que, contrairement aux mammifères, où l'autophagosome doit parfois traverser la cellule pour atteindre un lysosome afin d'être dégradé (Nixon 2013), la présence d'un compartiment lytique occupant 90 % du volume cellulaire accélère probablement ce processus de transport.

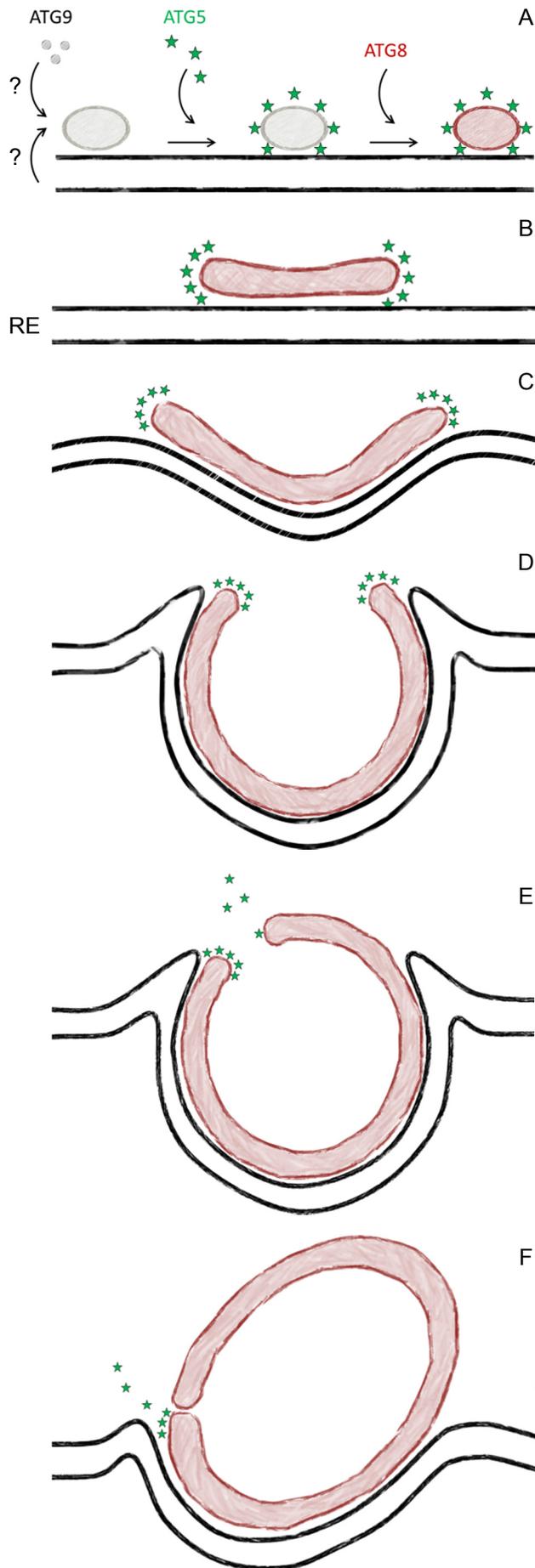


Figure 90 : Modèle de formation de l'autophagosome

Schéma représentant les différentes étapes de la formation de l'autophagosome lors d'une carence nutritionnelle. **(A)** Nucléation du phagophore impliquant hypothétiquement les vésicules ATG9 ou la membrane du réticulum endoplasmique (RE). Sur la membrane du phagophore sont ensuite recrutées ATG5 (★) puis ATG8 (rouge). **(B-D)** Elongation du phagophore et apparition de la courbure au sein d'une structure particulière du RE. **(E-G)** La fermeture du phagophore pour former l'autophagosome correspond au départ de ATG5 de la membrane, et coïncide avec le décrochage de l'autophagosome de la surface du RE.

3. Vers un modèle de formation de l'autophagosome

Pour les aspects jusqu'ici discutés, ATG5 semble donc se comporter chez *Arabidopsis* comme son homologue chez les mammifères : que ce soit du point de vue de son rôle dans la lipidation de ATG8 à la membrane de l'autophagosome (Thompson, Doelling et al. 2005), mais également concernant son recrutement transitoire au niveau du phagophore (ce travail). Cependant, nos résultats montrent que la localisation de cette protéine sur le phagophore présente d'importantes différences. En effet, alors que chez les mammifères, ATG5 est présent de manière homogène sur la membrane du phagophore, avec une préférence pour la face externe de la membrane d'isolement (Mizushima, Yamamoto et al. 2001) (Mizushima, Kuma et al. 2003), nous avons mis en évidence une disposition d'ATG5 sur une structure, qui au cours de sa croissance, prend la forme d'un tore. La corrélation de cette information avec la localisation de ATG8 au sein du phagophore, montre que ATG5 est disposée soit au pourtour de structures discoïdales, soit elle délimite l'ouverture de structures creuses, en forme de coupe.

Nous avons également mis en évidence la localisation des structures ATG5 au niveau de la face externe du réseau cortical du réticulum endoplasmique, ainsi que l'enfouissement de la majeure partie des particules marquées par ATG8 dans le réticulum.

L'ensemble de ces résultats, intégré du suivi individuel et en temps réel des autophagosomes en formation, nous a conduit à réfléchir à un modèle décrivant la formation de l'autophagosome chez les plantes, présenté en [Figure 90](#).

Tout d'abord, avant de discuter plus en détail les différentes étapes schématisées, il est intéressant de remarquer que les régions du phagophore décorées par ATG5 correspondent aux domaines membranaires présentant la plus forte courbure. Cette localisation rappelle celle par exemple des protéines réticulons, présentes au niveau des tubules du réticulum endoplasmique, mais également sur le pourtour des citernes, là où la courbure est maximale (Zurek, Sparks et al. 2011). La localisation du complexe ATG5 au niveau de ces domaines présentant une forte courbure pourrait résulter d'une affinité particulière de ce complexe pour ce type de topologie membranaire, ou traduire indirectement la localisation préalable au niveau de ce domaine, d'autres partenaires tel le complexe PI(3)K (Fan, Nassiri et al. 2011).

Il serait intéressant d'explorer chez les plantes la localisation de rapporteurs spécifiques pour les formes phosphorylées du PtdIns telles les protéines à domaine FYVE.

Chez les mammifères, la présence du complexe ATG5-ATG12-ATG16 sur la membrane du phagophore est dépendante de l'affinité d'ATG16 pour les membranes (Fujita, Itoh et al. 2008). Par contre, aucune donnée ne permet pour l'instant d'attribuer à ce complexe une affinité préférentielle pour une courbure membranaire particulière.

De manière surprenante, pour l'instant, aucun homologue de ATG16 n'a été identifié chez les plantes. Si ATG16 n'est pas présente chez les plantes, il est possible que le complexe ATG5-ATG12 interagisse avec une autre protéine afin d'assurer son recrutement à la membrane du phagophore, ce qui expliquerait la localisation particulière de ATG5 chez *Arabidopsis*. La recherche de protéines interagissant avec le complexe ATG5-ATG12 et ayant une affinité pour les membranes et plus particulièrement leur courbure (réticulons, protéines à domaine BAR), devrait permettre d'identifier des partenaires impliqués dans les étapes précoces de la formation de l'autophagosome chez les plantes.

3.1. La nucléation du phagophore

Les premières étapes de ce modèle illustrent les événements les plus précoces qu'il nous est arrivé d'observer lors de cette étude. Ces étapes représentent également les événements les moins bien compris de ce processus.

Nos résultats ont permis de montrer que les signaux ATG5 apparaissaient toujours comme de petites structures ponctiformes présentes à la surface du réticulum. L'étude de ces structures est limitée par leur petite taille, inférieure aux limites de la résolution de la microscopie confocale classique. Ces structures pourraient résulter d'une différenciation de la membrane du RE, ou d'une formation *de novo*, comme chez la levure, où la fusion de vésicules ATG9 permet la naissance du phagophore (Yamamoto, Kakuta et al. 2012). Notre étude du mutant *atg9* montre que ATG8 se retrouve, sans doute en conséquence de sa lipidation par ATG5, sur des structures tubulo-vésiculaires. Des plus, la formation des autophagosomes est fortement perturbée. Cela pourrait suggérer que comme chez les

mammifères, en absence d'ATG9, la lipidation d'ATG8 se produit sur d'autres membranes (Kageyama, Omori et al. 2011). La genèse d'un phagophore initial pourrait donc être dépendante de ATG9 aussi dans notre modèle (Fig. 90). Afin de tester cette hypothèse, la lipidation d'ATG8 et la localisation d'ATG5 dans le fond génétique *atg9* pourront être étudiées. Il sera aussi intéressant d'établir si les structures punctiformes marquées par ATG9, observées lors de notre étude à la surface du RE, interagissent avec ATG5, ou avec un autre acteur précoce de la machinerie de autophagie, comme ATG1.

3.2. L'élongation et l'établissement d'une courbure

Une fois présente au niveau du phagophore, ATG5 devrait logiquement provoquer le recrutement de ATG8, en déclenchant ainsi la phase d'expansion de la structure. Cette expansion s'effectue dans un premier temps à la surface du RE puis, lorsque la structure toroïdale ATG5 a atteint un diamètre maximal, la membrane d'isolement adopte une courbure, qui est également visible au niveau du RE (Fig. 90B-D). Cette phase de croissance pose de nombreuses questions :

Quelle est la provenance des lipides permettant l'expansion du phagophore ? En effet cette phase d'expansion nécessite un important apport de membrane. Plusieurs hypothèses sont envisageables : une synthèse *in situ* des lipides, une provenance du RE *via* une continuité ou contact membranaire, un apport de membrane par trafic vésiculaire. La continuité avec le RE, si elle existe, n'a pas pu être démontrée pour l'instant dans notre travail, que ce soit par microscopie électronique ou microscopie photonique. Elle s'accompagnerait probablement d'une différenciation membranaire, semblable à celle rencontrée dans le continuum réticulum/membrane nucléaire par exemple. Il serait intéressant de poursuivre les analyses de microscopie électronique par tomographie ultrastructurale, ou de suivre en microscopie confocale des marqueurs membranaires du RE pour conforter ou non cette hypothèse. Nous pourrions également tenter d'isoler les autophagosomes, par cytométrie en flux, afin de déterminer leur composition lipidique, ce qui nous permettrait d'identifier des donneurs potentiels de membrane en se basant sur leur signature lipidique.

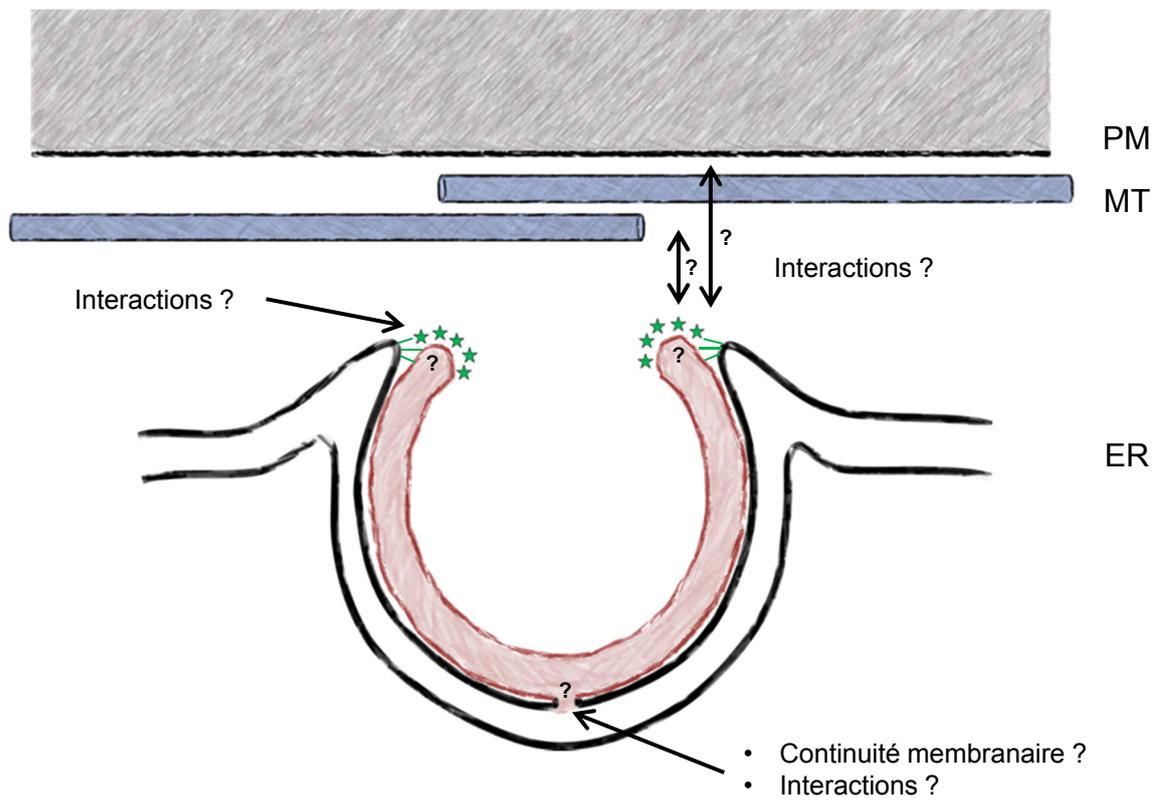


Figure 91 : Interactions entre le phagosome et différents constituants cellulaires
 Schéma représentant la membrane du phagosome (rouge) aux extrémités de laquelle se trouve ATG5 (★). Une hypothétique continuité membranaire entre cette structure et le réticulum endoplasmique (ER) est suggérée, de même que différents points d'interactions. Sont mentionnées également des connexions possibles avec le réseau cortical de microtubules (MT) ou la membrane plasmique (PM).

Dans le cas d'un apport de membranes par fusion vésiculaire, on s'attendra à identifier une machinerie moléculaire associée de type RAB et SNARE.

Quels sont les phénomènes qui permettent la formation de la structure membranaire plane délimitée par le tore ATG5 ? Nous observons à ce stade une forte augmentation de surface s'accompagnant d'une faible augmentation de volume. La contrainte d'un faible rapport volume/surface pourrait contribuer à maintenir la structure initiale dans une configuration planaire. Ces constatations sont non seulement compatibles avec l'hypothèse d'un apport de membrane par continuité membranaire avec un compartiment donneur mais également avec l'hypothèse de la fusion vésiculaire seulement si celle-ci fait intervenir de petites vésicules. En effet, plus la vésicule sera petite plus le rapport surface/volume sera important.

Quels sont les mécanismes régulant l'expansion du tore ATG5 et provoquant la courbure du phagophore ? La croissance et la remarquable stabilité de la structure toroïdale décorée par ATG5 pourraient être la résultante de forces d'expansion dues à l'apport de membrane, sous la contrainte de connections avec d'autres composantes, telles le RE, des éléments du cytosquelette, ou la membrane plasmique (Fig. 91). Ensuite, deux autres aspects mériteraient d'être approfondis: la régulation de la taille du phagophore et la genèse de la courbure. Est-ce que la taille finale de l'autophagosome est déterminée, en présence d'un apport continu de membrane, par la taille du torus ATG5 et sa demi-vie ? Dans le cas d'une autophagie sélective, la construction du phagophore pourrait se faire autour du cargo, en faisant intervenir des interactions entre protéines adaptatrices, ATG8 et le complexe ATG5. Ces interactions pourraient diriger la courbure du phagophore et réguler la stabilité du complexe ATG5 pour adapter la taille de l'autophagosome au cargo. Par contre, dans nos conditions de macroautophagie en principe non sélective, des interactions moléculaires avec le cargo ne sont pas encore décrites. La direction de la courbure du phagophore pourrait alors être dictée par une polarité des membranes engendrée par l'interaction avec le réticulum, ou par une résistance différentielle aux forces d'expansion engendrées par l'apport de lipides. Il est intéressant aussi de remarquer que la taille des autophagosomes, au moins chez les plantes, semble bien être soumise à une régulation lors de la carence nutritionnelle, leur taille étant nettement plus importante qu'en conditions normales. Comme il a été montré chez

S.cerevisiae, la taille moyenne de l'autophagosome pourrait être dictée par les concentrations de protéines ATG clefs, telles ATG8. Dans tous les cas de figure, les mécanismes déterminant l'arrêt de la croissance du phagophore demeurent un point important à étudier.

3.3. La fermeture du phagophore et la libération de l'autophagosome

Nos observations ont montré que la disparition de la structure toroïdale marquée par ATG5 semble coïncider dans le temps avec la fermeture du phagophore et le départ de l'autophagosome du RE, sans pour autant savoir si la dissociation d'ATG5 était la cause ou la conséquence de ses événements (Fig. 90E-G). Or, des études *in vitro* ont mis en évidence que le complexe ATG5 avait la capacité de joindre deux structures membranaires (Romanov, Walczak et al. 2012). On pourrait imaginer par conséquent un rôle pour le complexe visualisé à travers ATG5 qui dépasserait la facilitation de l'ancrage par lipitation d'ATG8. En effet, ce complexe pourrait aussi interagir avec le RE, et dans le même temps intervenir dans la régulation des événements de fusion membranaire nécessaires à la fermeture du phagophore.

4. Interaction du phagophore avec le réticulum

Il est possible que la formation des autophagosomes nécessite d'une part la présence du réticulum endoplasmique, et d'autre part l'interaction avec la membrane plasmique, ou le réseau cortical de microtubules caractéristique de la cellule végétale (Fig. 91). Afin de déterminer le rôle des microtubules présents au niveau de la face externe du réticulum, l'effet de leur dépolymérisation pourrait être étudié, ainsi que les possibles interactions des marqueurs ATG avec les microtubules.

D'autre part, la coopération de différents compartiments pour la formation de l'autophagosome, a été démontrée chez la levure, où les autophagosomes se forment en contact avec le RE et la vacuole (Graef, Friedman et al. 2013), mais également chez les mammifères, où ce processus a lieu au niveau des sites de contact entre le RE et les mitochondries (Hamasaki, Furuta et al. 2013). De plus, plusieurs études chez les mammifères

ont aussi déjà mis en évidence une implication de la membrane plasmique dans la formation des autophagosomes (Ravikumar, Moreau et al. 2010). L'étude de l'implication d'éventuels sites de contact entre le RE et la membrane plasmique dans la formation des autophagosomes chez les plantes, pourrait par conséquent être une piste intéressante à explorer.

MATERIEL ET METHODES

Nom de la lignée	Provenance
Col-0	
GFP-ATG8e	Lignée générée
mCh-ATG8e	Lignée générée
ATG5-GFP	Lignée générée
ATG5-mCh	Lignée générée
GFP-ATG9	Lignée générée
mCh-ATG9	Lignée générée
GFP-ATG8f	Sláviková et al., 2005
<i>atg4a4b-1</i>	Yoshimoto et al., 2004
<i>atg 9-1</i>	Hanaoka et al., 2002
<i>atg 9-2</i>	Inoue et al., 2006
<i>atg 5-1</i>	Thompson et al., 2005
GFP-HDEL	Nelson et al., 2007
GFP-TUA6	Ueda et al., 1999
GFP-eIF4A-III	Koroleva et al., 2009
WAVE _2 Y	Geldner et al., 2009
WAVE _5 Y	Geldner et al., 2009
WAVE _7 Y	Geldner et al., 2009
WAVE _9 Y	Geldner et al., 2009
WAVE _13 Y	Geldner et al., 2009
WAVE _22 Y	Geldner et al., 2009
WAVE _29 Y	Geldner et al., 2009
WAVE _33 Y	Geldner et al., 2009
WAVE _34 Y	Geldner et al., 2009
WAVE _127 Y	Geldner et al., 2009

Tableau 1 : Lignées utilisées

1. Arabidopsis thaliana

Pour ce travail sur *Arabidopsis thaliana*, le fond génétique utilisé a été l'écotype Columbia (Col-0). Cette accession a été utilisée pour effectuer tous les contrôles ainsi que pour générer nos lignées stables exprimant nos différentes constructions. Les différentes lignées utilisées au cours de ce travail sont présentées dans le [Tableau 1](#).

1.1. Stérilisation de surface et stockage des graines d'*Arabidopsis*

Les graines sont tout d'abord placées dans une solution composée d'éthanol à 70 % (v/v) et de 0,05 % (v/v) de Tween-20 (Sigma, réf. 274348) pendant dix minutes afin de les stériliser en surface. Les graines sont ensuite rincées par un lavage à l'éthanol à 95 % (v/v), puis mises à sécher sous une hotte stérile. Pour leur stockage, les graines sont conservées à 10°C et à l'obscurité.

1.2. Conditions de culture d'*Arabidopsis thaliana*

Pour la culture *in-vitro*, les graines stérilisées, sont semées sur une boîte de Petri contenant un milieu de culture solide, scellées avec du ruban adhésif microporeux Urgopore (Laboratoires Urgo), puis placées pendant 48 h à 4°C et à l'obscurité, pour stratification. Ensuite les boîtes de Petri sont placées verticalement en chambre de culture, avec un éclairage alterné de type "jours longs" (16 h jour / 8 h nuit) de 300 $\mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$, avec une température constante de 24°C, et 65 % d'humidité relative, pendant cinq jours.

Pour la culture en serre, les plantules sont cultivées au préalable *in-vitro* pendant 7 à 10 jours, comme expliqué précédemment. Ensuite les plantules sont repiquées en terre, et placées en serre, dans des conditions de "jours longs" (16 h jour / 8 h nuit) de 140 $\mu\text{E.m}^2.\text{s}^{-1}$, et avec une température constante de 24°C.

Nom	Référence	Concentration finale	Solvant
Concanamycine A	Fluka, réf. 27689	1 μ M	DMSO
Latrunculine B	Sigma, réf. L5288	10 μ M	DMSO
Oryzaline	Sigma, réf. PS410	20 μ M	DMSO
Wortmannine	Sigma, réf. W1628	30 μ M	DMSO

Tableau 2 : Traitements utilisés sur les plantules d'Arabidopsis

1.3. Milieux de culture pour Arabidopsis

Différents milieux de culture solides ont été testés lors de ce travail :

Milieu MS Agar: Murashige and Skoog Basal Salt Mixture 4,3 g/L (Sigma, réf. M5524), MES 10 mM, Saccharose 1 % (w/v), pH ajusté à 5.6 avec du KOH, Phyto agar 6 g/L (Duchefa, réf. P1003).

Milieu MS Gelrite: Milieu identique au milieu MS Agar, sauf que l'agar est remplacé par de la Gelzan 3 g/L (Sigma, réf. G1910).

Milieu ½ MS Agar: Milieu identique au milieu MS Agar, sauf que la quantité de Murashige and Skoog Basal Salt Mixture est divisé par deux, soit 2,15 g/L.

Milieu ½ MS Gelrite: Milieu identique au milieu ½ MS Agar, sauf que l'agar est remplacé par de la Gelzan 3 g/L.

Sauf lorsqu'il en est mentionné autrement, pour ce travail, les plantes ont été cultivées 5 jours sur un milieu ½ MS Gelrite.

1.4. Traitements pharmacologiques des plantules d'Arabidopsis

Les différents composés sont dilués à la concentration finale dans 1 ml de milieu de culture liquide (Tableau 2). Le milieu est ensuite vortexé afin de l'homogénéiser, puis versé dans une boîte de Petri ($\varnothing = 35$ mm). Les plantules de 5 jours y sont déposées puis placées sur un agitateur orbital à 100 rpm, placé en chambre de culture. Pour les traitements se déroulant à l'obscurité, les boîtes de Petri sont recouvertes d'aluminium.

1.5. Induction de l'autophagie par carence nutritionnelle

Afin d'induire l'autophagie, les plantules de 5 jours sont prélevées et disposées dans une boîte de Petri ($\varnothing = 50$ mm) contenant 5 ml de milieu de culture liquide ½ MS-N-C,

composé de Murashige and Skoog Basal Salt Micronutrient 10 x Solution (Sigma. réf. M0529 concentration finale 1 x), CaCl₂ 3 mM, MgSO₄ 1,5 mM, KCl 5 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, Mannitol 30 mM, MES 10 mM, et le pH ajusté à 5.6 avec du KOH. Pour d'éviter un stress hypoxique, 5 ml de milieu sont utilisés, afin de permettre de recouvrir le fond de la boîte de Petri avec une couche de seulement 2 mm environ, et les plantules sont placées sur un agitateur orbital à 100 rpm. Enfin afin de bloquer l'apport de carbone et énergie par la photosynthèse, les plantules sont placées en chambre de culture tout comme les plantules contrôles mais à l'obscurité. Les plantules contrôles sont traitées de manière identique, excepté qu'elles ne sont pas placées à l'obscurité et que leur milieu de culture est un milieu ½ MS liquide.

1.6. Croisements

On utilise pour les croisements, des plantes ayant atteint le stade floral, mais dont les fleurs sont en majorité toujours fermées. On commence par choisir une hampe florale possédant les critères requis, puis on retire les fleurs déjà ouvertes ainsi que les fleurs trop jeunes afin de ne laisser que 3 fleurs non-ouvertes par hampe. A l'aide de pinces fines, on retire tous les éléments de la fleur à part le pistil. Après avoir vérifié qu'aucun grain de pollen n'est présent à la surface du pistil, on prélève chez la plante donneuse des étamines matures et on applique les anthères au sommet du pistil de la plante receveuse. On marque les fleurs où un croisement a été effectué et au bout de quelques jours des siliques se forment. Ces siliques, sont récoltées à maturité pour obtenir les graines F1.

1.7. Sélection des transformants

Les graines T1 transformées avec le vecteur d'expression pour les fusons traductionnelles ATG5 ATG8 et ATG9 ont été sélectionnées *in vitro* sur milieu ½ MS solide, en présence de 50 µg/ml d'hygromycine. Dans leur descendance, des lignées portant une seule copie du transgène et homozygotes ont été identifiées, en deux étapes : une ségrégation

N°	Génotypes générés		Etat
1	GFP-ATG8e		Homozygote
2	mCh-ATG8e		Homozygote
3	ATG5-GFP		Homozygote
4	ATG5-mCh		Homozygote
5	GFP-ATG9		Homozygote
6	mCh-ATG9		Homozygote
7	mCh-ATG8e	_ GFP-ATG8f	Double homozygote
8	ATG5-GFP	_ mCh-ATG8e	Double homozygote
9	mCh-ATG9	_ ATG5-GFP	Hétérozygote
10	mCh-ATG9	_ GFP-ATG8e	Hétérozygote
11	atg 9-2	_ mCh-ATG8e	Double homozygote
12	atg 9-2	_ ATG5-GFP	Homozygote (<i>atg9-2</i>) / hétérozygote ATG5-GFP
13	atg 5-1	_ ATG5-GFP	Double homozygote
14	atg9-2 - mCh-ATG8e - ATG5-GFP		Homozygote (<i>atg9-2</i>) / hétérozygote mCh-ATG8e / hétérozygote ATG5-GFP
15	<i>atg5-1</i>	<i>atg9-2</i>	Homozygote (<i>atg5-1</i>) / hétérozygote (<i>atg9-2</i>)
16	GFP-HDEL	_ mCh-ATG9	Hétérozygote
17	GFP-HDEL	_ mCh-ATG8e	Hétérozygote
18	GFP-HDEL	_ ATG5-mCh	Hétérozygote
19	WAVE_2 Y	_ mCh-ATG8e	Hétérozygote
20	WAVE_5 Y	_ mCh-ATG8e	Hétérozygote
21	WAVE_7 Y	_ mCh-ATG8e	Hétérozygote
22	WAVE_9 Y	_ mCh-ATG8e	Hétérozygote
23	WAVE_13 Y	_ mCh-ATG8e	Hétérozygote
24	WAVE_22 Y	_ mCh-ATG8e	Hétérozygote
25	WAVE_29 Y	_ mCh-ATG8e	Hétérozygote
26	WAVE_33 Y	_ mCh-ATG8e	Hétérozygote
27	WAVE_34 Y	_ mCh-ATG8e	Hétérozygote
28	WAVE_127 Y	_ mCh-ATG8e	Hétérozygote
29	mCh-ATG8e	_ GFP-TUA6	Hétérozygote
30	mCh-ATG9	_ GFP-TUA6	Hétérozygote
31	GFP-TUA6	_ ATG5-mCh	Hétérozygote

Tableau 3 : Génotypes générés

100 % de résistants à l'hygromycine (homozygoté) a été recherchée dans les familles T3 issues de T2 ayant, au préalable, montré une ségrégation 3 :1 (1 locus mendelien).

1.8. Sélection des génotypes issus des croisements

Les génotypes générés dans cette étude sont présentés en [Tableau 3](#).

Les lignées F3 doublement homozygotes pour la mutation (insertion d'ADN-T) *atg5-1*((SAIL_129_B07; (Thompson, Doelling et al. 2005) et le transgène *GFP-ATG5*, ou la mutation *atg9-2* (SALK_130796; (Inoue, Suzuki et al. 2006) et le transgène *mCherry-ATG8e* ou *ATG5-GFP*, ont été sélectionnés par génotypage PCR. Les paires d'amorces étaient placées d'un côté et l'autre du site d'insertion de l'ADN-T, sur la bordure gauche de l'ADN-T et sur le locus receveur, comme décrit dans les références bibliographiques respectives, ainsi que dans la région codante de la GFP. Les lignées simple copie et doublement homozygotes pour les fusions traductionnelles *ATG5*, *ATG8* et *ATG9*, tous résistants à l'hygromycine (lignes 7-10 dans le [Tableau 3](#)) ont été sélectionnées en suivant la ségrégation du rapporteur fluorescent, et l'amplification par PCR des régions codantes respectives.

2. Cultures cellulaires BY2 de Tabac

2.1. Culture des cellules BY2

Les cellules BY2 en suspension ont été cultivées à l'obscurité dans des incubateurs à 25°C et avec agitation orbitale de 100 rpm, en milieu liquide. Afin d'assurer leur croissance, les cellules sont repiquées tous les 7 jours.

2.2. Milieux de culture pour les cellules BY2

Milieu MS pour les cellules BY2: Murashige and Skoog Basal Salt Mixture 4,3 g/L(Sigma, réf. M5524), KH_2PO_4 1,5 mM, Myo-inositol 0,55 mM, MES 10 mM, Saccharose 3 % (w/v), pH 5.6, Thiamine 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, acide 2,4-dichlorophénoxyacétique 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Milieu MS-N pour les cellules BY2: Murashige and Skoog Basal Salt Micronutrient 10 x Solution (Sigma. réf. M0529 concentration finale 1 x), CaCl_2 3 mM, MgSO_4 1,5 mM, KCl 5 mM, KH_2PO_4 1,5 mM, Myo-inositol 0,55 mM, MES 10 mM, Saccharose 3 % (w/v), pH 5.6, Thiamine 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, acide 2,4-dichlorophénoxyacétique 0,2 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Milieu MS sans saccharose pour les cellules BY2: Le milieu dépourvu de saccharose est identique au milieu MS classique sauf que le saccharose a été remplacé par du mannitol 1,5 % (w/v), afin de conserver une pression osmotique identique.

2.3. Colorations cytologiques

Coloration au rouge neutre: 1 ml de cellules BY2 en suspension sont prélevées dans un tube Eppendorf (2 ml) puis colorées avec 35 μM rouge neutre (Merck, C.I. 50040, dilué dans de l'eau), pendant 10 minutes à l'obscurité et sous agitation (100 rpm) à température ambiante. Afin d'effectuer un lavage, les tubes contenant les cellules sont centrifugés (300 rpm, 30 sec), puis le surnageant est remplacé par du milieu. Cette opération est effectuée deux fois.

Coloration au LysoTracker Red: 1 ml de cellules BY2 en suspension sont prélevées dans un tube Eppendorf (2 ml) puis incubées avec 1 μM LysoTracker Red (Invitrogen, réf. L7528, dilué dans du DMSO), pendant 1 heure à l'obscurité et sous agitation (100 rpm) à température ambiante. Afin d'effectuer un lavage, les tubes contenant les cellules sont centrifugés (300 rpm, 30 sec), puis le surnageant est remplacé par du milieu. Cette opération est effectuée deux fois.

2.4. Traitements pharmacologiques

Traitement au E-64: La solution stock de E-64 (Sigma. réf. E3132) est réalisée à 1 mM après dissolution de la poudre dans de l'eau. Le E-64 est ensuite directement ajouté au milieu de culture pendant 24 h, à la concentration finale de 10 μ M (Moriyasu and Ohsumi 1996).

Traitement au 3-méthyladénine: La solution stock de 3-MA (Sigma. réf. M9281) est réalisée à 100 mM après dissolution de la poudre dans de l'eau. Le 3-MA est ensuite ajouté directement dans le milieu de culture pendant 24 h, à la concentration finale de 5 mM (Takatsuka, Inoue et al. 2004).

Traitement à la wortmannine: La solution stock de wortmannine (Sigma. réf. W1628) est réalisée à 10 mM après dissolution de la poudre dans du DMSO. La Wortmannin est ensuite directement ajouté au milieu de culture pendant 24 h, à la concentration finale de 10 μ M (Takatsuka, Inoue et al. 2004).

Conservations des solutions mères: les stocks d'E-64,3-MA et wortmannine sont conservées, en aliquotes, à -20°C .

3. Transformation d'Arabidopsis et du Tabac

3.1. Transformation stable d'Arabidopsis par *Agrobacterium tumefaciens*

La technique de transformation stable d'Arabidopsis par *Agrobacterium tumefaciens* se fait ici par "Floral dip" selon le protocole mis au point par Clough et Bent (Clough and Bent 1998). Les plantules d'Arabidopsis utilisées doivent avoir atteint un stade floral et ne comporter qu'environ deux ou quatre siliques par hampe florale, qui devront ensuite être retirées avant la transformation. Les cultures d'*Agrobacterium tumefaciens* (souche AGL0) contenant la construction d'intérêt sont cultivées à 28°C dans du milieu LB jusqu'à atteindre une DO à 600 nm = 1. Après centrifugation (6500 rpm, 10 min), les bactéries sont

resuspendues dans une solution de saccharose à 5 % (w/v). Juste avant la transformation, on ajoute du Silwet L-77 à 0,05 % (v/v) (Lehle Seeds, réf. VIS-30), puis les hampes florales sont trempées dans la solution d'inoculation pendant 1 minute. Après 24 heures de culture sous cloche en serre, les plantes sont ensuite cultivées normalement, puis les graines (génération T1) sont récoltées.

3.2. Transformation transitoire sur feuilles de Tabac

On réalise une culture de 24 h d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant la construction désirée dans un milieu 2x YT contenant l'antibiotique permettant la sélection. Ces bactéries sont centrifugées (10 min à 5 000 rpm) puis resuspendues dans le milieu d'infiltration composé : 10 mM MES pH 5.6, 15 mM MgCl₂, 0.2 mM Acétylsyringone (dilué à partir d'une solution mère 20 mM dans de l'éthanol absolu). La densité optique est ensuite mesurée à 600 nm et, si nécessaire, les volumes sont ajustés afin d'obtenir une densité optique finale comprise entre 0.1 et 0.5 en fonction des constructions. Enfin les feuilles de plants de Tabac *Nicotiana benthamiana*, âgés de 3 à 4 semaines, sont transformées par *Agrobacterium* par infiltration de la suspension bactérienne au niveau de l'épiderme abaxial, à l'aide d'une seringue en plastique. Les feuilles sont ensuite observées au microscope, 3 jours après la transformation.

3.3. Transformation stable de cellules BY2 via *Agrobacterium tumefaciens*

On utilise pour cette transformation, une suspension cellulaire de 3 jours. Les cultures d'*Agrobacterium tumefaciens* contenant le plasmide d'intérêt sont cultivées dans du milieu LB, jusqu'à atteindre une DO à 600 nm = 1. Dans une boîte de Petri, on dépose 2 ml de la culture cellulaire de BY2, auxquels on ajoute 10 µl - 25 µl de la culture d'*Agrobacterium*, en présence de 5 µl d'une solution 20 mM d'acétylsyringone (Sigma, réf. D134406) dans de l'éthanol absolu. Les boîtes de Petri sont ensuite scellées puis placées dans un incubateur à

25°C et à l'obscurité pendant 72 heures. Les cellules BY2 vont ensuite subir plusieurs cycles de rinçages dans du milieu MS, puis dans du milieu MS contenant de la céfotaxime (Sigma, réf. C7039) à 500 µg/ml, afin de se débarrasser des bactéries. Enfin, les cellules sont étalées sur une boîte de Petri contenant du milieu MS solide, toujours en présence de 500 µg/ml de céfotaxime, ainsi que l'antibiotique permettant la sélection des cellules transformées. Au bout de deux semaines des cals sont visibles, et après que la fluorescence de la protéine rapporteur d'intérêt ait été vérifiée, ces cals sont prélevés puis étalés sur une nouvelle boîte contenant du milieu MS solide + céfotaxime + antibiotique. Enfin, pour obtenir une suspension cellulaire, les cals sont mis en suspension dans du milieu MS liquide, toujours en présence de céfotaxime et de l'antibiotique. Au bout de quelques semaines, après des repiquages hebdomadaires successifs, on obtient une suspension cellulaire homogène.

4. Génération des constructions

Pour ce travail nous avons généré différentes constructions où ATG5, ATG8e et ATG9 ont été fusionnées avec la GFP ou la mCherry, par la méthode de recombinaison Gateway® (Invitrogen).

4.1. Génération des "Entry Clones"

Nous disposons de souches d'*Agrobacterium tumefaciens* possédant un plasmide pEZT contenant la séquence codante d'ATG5 ou ATG9, gracieusement fournies par K. Yoshimoto (INRA, Versailles). Pour AtTG8e, nous possédions déjà un "entry clone" pDONRTM207 (Invitrogen), contenant la séquence codante d'ATG8e, gracieusement donné par C. Masclaux-Daubresse (INRA, Versailles).

Dans un premier temps, les deux plasmides pEZT, contenant ATG5 et ATG9 ont été purifiés à partir d'*Agrobacterium* (Cf. 5.2), puis transférés dans *E.Coli* par transformation (Cf. 5.5). Après une seconde extraction de ces plasmides, une PCR a été réalisée afin d'amplifier les séquences codantes de ATG5 et ATG9 et de leur ajouter aux extrémités les

Composition du mélange réactionnel	
H ₂ O	28 µl
5X Phusion HF Buffer	10 µl
2 mM dNTP	5 µl
AtATGXGW For (1 µM)	2,5 µl
AtATGXGW Rev (1µM)	2,5 µl
Primer U3 (100 µM)	0,25 µl
Primer U5 (100 µM)	0,25 µl
ADN (1 pM)	1 µl
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl

Programme utilisé

25 cycles

Dénaturation initiale	5 min – 98°C
Dénaturation	15 s – 98°C
Hybridation	30 s – 55°C
Elongation (pour ATG)	30 s – 72°C
Elongation (pour ATG9)	75 s – 72°C
Extension finale	5 min – 72°C

Tableau 4 : Conditions les PCR permettant l'amplification et l'ajout des extrémités attB1 et attB2 de part et d'autre de ATG9 et ATG5.

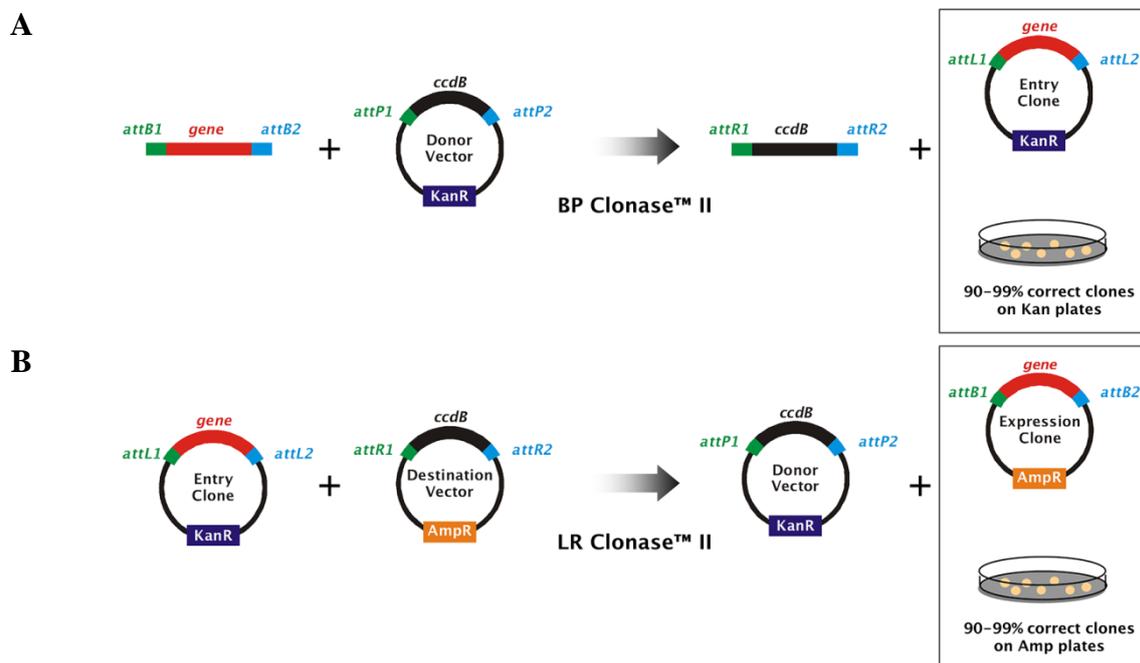


Figure 92 : Le système de clonage Gateway

Schéma représentant la réaction catalysée par la "BP Clonase II" (A), et celle catalysée par la "LR Clonase II" (B), permettant la formation d'un "Expression Clone".

Adapté de : *Introduction to the Gateway system*

<http://tools.lifetechnologies.com/downloads/gateway-the-basics-seminar.html>

séquences attB1 et attB2 essentielles pour la conjugaison. Cette PCR se déroule en deux étapes : lors d'une première étape environ 15 nucléotides sont ajoutés de part et d'autre de la séquence codante grâce à des couples de primers spécifiques (ATG5GW et ATG9GW), et dans une seconde étape l'intégralité de la séquence attB est complétée grâce à l'utilisation de primers universels (U5 et U3) (Annexe 2, Fig. 97). Dans notre cas, nous avons effectués ces deux réactions en même temps (Tableau 4). Pour chaque gène, deux formes ont été amplifiées (avec ou sans codon stop), afin de créer différents "Entry Clones" permettant de générer des fusions traductionnelles en position N-terminale ou C-terminale (Fig. 92A).

Ensuite le produit de cette PCR est purifié (Cf. 5.3) avant d'être utilisé dans la "BP reaction", en suivant les instructions du fabricant (invitrogen).

Afin de s'assurer du bon déroulement du clonage, les séquences des inserts des plasmides pDONR obtenus ont été déterminées. Pour cela nous avons utilisé des couples d'amorces placés de part et d'autre du site d'insertion dans le pDONR ainsi que des amorces situés dans la séquence codante d'ATG5 (1 seul couple) ou d'ATG9 (2 couples) (Annexe 2, Fig. 98).

4.2. Remplacement de la GFP présente dans les "Destination Vectors"

Cette étape a été réalisée par Sylvain Merlot (CNRS, ISV, Gif-sur-Yvette).

Les plasmides pMDC43 et pMDC83 (Curtis and Grossniklaus 2003), sont des vecteurs binaires permettant d'effectuer respectivement des fusions en N-terminale et en C-terminale de la séquence codante de la protéine d'intérêt avec la GFP6 (Annexe 2, Fig. 99, Fig. 100). Afin de disposer de fusions comportant également la mCherry, la séquence de la GFP6 a été tout d'abord retirée du plasmide par restriction enzymatique, puis la séquence codant pour la mCherry a été clonée à la place.

Entry Clone		Destination Vector		Expression Clone
ATG5	+	pMDC83	=	35S-ATG5-GFP
ATG5-stop	+	pMDC43	=	35S-GFP-ATG5
ATG5	+	pMDC83 (mCherry)	=	35S-ATG5-mCh
ATG5-stop	+	pMDC43 (mCherry)	=	35S-mCh-ATG5
ATG8e	+	pMDC43	=	35S-GFP-ATG8e
ATG8e	+	pMDC43 (mCherry)	=	35S-mCh-ATG8e
ATG9	+	pMDC83	=	35S-ATG9-GFP
ATG9-stop	+	pMDC43	=	35S-GFP-ATG9
ATG9	+	pMDC83 (mCherry)	=	35S-ATG9-mCh
ATG9-stop	+	pMDC43 (mCherry)	=	35S-mCh-ATG9

Tableau 5 : Récapitulatif des "LR Reactions" effectuées et des "Expression Clones" obtenus

4.3. Génération des "Expression Clones"

Une fois les différents "Entry Clones" générés, nous avons généré les "Expression Clones", qui sont l'étape finale permettant l'expression des constructions ont été générées. Pour cela les "Entry Clones" générés précédemment, ont été combinés avec les "Destination Vectors", pMDC43 et pMDC83, contenant soit la séquence codant pour la GFP ou la mCherry, grâce à la "LR Reaction" (Fig. 92B) (Tableau 5).

Pour s'assurer du bon déroulement de la réaction, nous avons effectué un séquençage de la jonction entre la région codante de la protéine d'intérêt et celle du rapporteur fluorescent. Pour cela nous avons utilisé des couples d'amorces placés de part et d'autre des sites d'insertion (Annexe 2, Fig. 98).

Une fois vérifiés, ces différents "Expression clones" (Annexe 2, Fig. 101, Fig. 102) ont été transférés dans *Agrobacterium* (Agl0 électro-compétentes) par électroporation (Cf. 5.6). Les souches d'*Agrobacterium* contenant les différents "Expression Clones" ont ensuite été stockées à -80°C.

5. Techniques de biologie moléculaire

5.1. Souches bactériennes utilisées

- *Echerichia coli* : DH5 α
- *Agrobacterium tumefaciens* : AGL0

5.2. Extraction d'ADN plasmidique

L'ADN plasmidique est extrait des bactéries par purification, en utilisant un kit "QIAprep Spin Miniprep" (Quiagen), et en suivant le protocole indiqué par le fournisseur.

5.3. Purification de produits de PCR

Le kit " Illustra™ GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit", a été utilisé pour la purification de produits de PCR, en suivant les instructions du fournisseur.

5.4. Séquençage

Pour les différents travaux de séquençage, nous avons fait appel à l'entreprise GATC Biotech.

5.5. Transformation d'*E. Coli* :

Dans un tube Eppendorf (2 ml), refroidi sur glace au préalable, on dépose l'équivalent de 150 ng d'une miniprep d'ADN plasmidique, auxquels on ajoute 100 µl de bactéries thermocompétentes. Après avoir mélangé délicatement la suspension, le tube contenant l'ADN et les bactéries est placé pendant 20 minutes à 4°C. On effectue ensuite le choc thermique en plaçant le tube à 42°C pendant 45 secondes puis en le replaçant immédiatement dans la glace pendant 5 minutes. On ajoute ensuite 200 µl de milieu de culture LB puis on place les bactéries dans des conditions de croissance optimales (37°C), pendant 30 minutes. Enfin les bactéries sont étalées sur une boîte de Petri contenant du milieu LB auquel un antibiotique permettant la sélection des colonies transformées a été ajouté. Les boîtes sont ensuite placées à l'obscurité, à 37°C, pendant environ 24 h.

5.6. Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*

Pour transformer *Agrobacterium*, on procède par électroporation. Dans un tube Eppendorf (1,5 ml), sont disposées 50 µl d'*Agrobacterium* AGL0 électro-compétentes, auxquelles est ajouté 1 µl d'ADN (environ 30 ng). Après homogénéisation, le contenu du tube est versé dans une cuve de 2 mm (Eurogentec, réf. CE-0002-50), préalablement refroidie dans

la glace. La cuve est ensuite placée dans électroporateur réglé sur 2500 V, 120 Ω , 50 μ F, puis un choc électrique est appliqué. 1 ml de milieu 2x YT est ajouté puis le tout est placé pendant 2 h à 30°C. On étale ensuite le contenu du tube sur une boîte de Petri contenant du milieu 2x YT solide, ainsi que l'antibiotique permettant la sélection.

5.7. Extraction des protéines

Pour ce travail, nous avons travaillé essentiellement sur des racines d'*Arabidopsis*. En fonction de la protéine étudiée, différentes quantités de racines ont été rapidement récoltées à l'aide d'une lame de rasoir, puis placées dans un tube Eppendorf (1,5 ml) après avoir retiré le surplus de milieu de culture à l'aide d'un papier absorbant. Les racines prélevées sont ensuite plongées dans l'azote liquide, puis broyées à l'aide d'un pilon, refroidi au préalable. Pour la suite, deux approches ont été utilisées, en fonction de l'abondance de la protéine à détecter. Pour la détection d'ATG8 et de GFP-ATG8, les racines broyées sont homogénéisées sur glace, dans le tampon d'extraction (50 μ l pour 20 mg de poids frais) : 50 mM Tris HCl pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM Iodacetamide et 1 mM PMSF (extemporanément), 0.05 % v/v Triton X100. Ensuite les échantillons sont centrifugés 5 min à 4 °C à 20 000 g, puis le surnageant est récupéré et dosé par Bradford (Bradford 1976). Dans le cas des protéines faiblement abondantes, nécessitant une quantité importante de protéine totale (ex : ATG5), les racines broyées sont directement homogénéisées sur la glace dans le tampon de Laemmli (5 μ l par mg de poids frais : 100 mM Tris HCl, pH 6.8, 2 % SDS (v/v), 10% glycerol (v/v), 100 mM DTT et 0.004% Bleu de bromophenol (w/v)).

5.8. Western Blot

Electrophorèse sur gel : Les extraits protéiques sont tout d'abord dénaturés dans du tampon de Laemmli pendant 5 min à 95°C. Ensuite les protéines sont séparées par SDS-PAGE sur un gel à 10 % Acrylamide / Bis-Acrylamide (37 :1). Pour l'étude de ATG8, après dosage des

protéines par Bradford, 10 µg de protéines sont déposées. Pour l'étude de ATG5, on dépose les protéines résultant de l'extraction de 3 mg (matière fraîche) de racines de 5 jours.

Transfert sur membrane : Après migration les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose Hybond-C Extra (Amersham-Biosciences 45µm) grâce à un système de transfert rapide semi-sec (Trans Blot Turbo Transfer System, Bio-Rad). Le transfert se déroule à 1 A, 25 V environ pendant 30 min dans du tampon de transfert (25 mM Tris Base, 190 mM Glycine, 20 % Ethanol (v/v)).

Immunodétection : Après transfert, la membrane est rincée dans du tampon TBST (50 mM Tris HCl pH 7.6, 150 mM NaCl, 0.05 % v/v Tween20), et incubé avec les différents anticorps selon des procédures standard (dit Frey, Muller et al. 2010). L'anticorps primaire monoclonal de souris anti-GFP (Clontech, réf. JL-8), a été employé à la dilution 1 :10000 (pour ATG8e) ou 1 :5000 (pour ATG5). Pour effectuer un contrôle de charge et de transfert, un anticorps polyclonal de lapin dirigé contre Tudor-SN (TSN ; (dit Frey, Muller et al. 2010) a été utilisé. Pour détecter l' α -GFP JL-8, nous avons utilisé des IgG de chèvre anti-souris (Calbiochem, réf. 401253), diluées au 1:10 000. Pour détecter l' α -TSN, nous avons utilisé des IgG de chèvre anti-lapin (Calbiochem, réf. 401353) diluées au 1:20 000. La détection s'effectue par chimioluminescence, en utilisant le protocole indiqué par le fournisseur du kit de révélation (Millipore, réf. WBKLS0500).

6. Microscopie confocale

L'observation de racines d'*Arabidopsis thaliana* en microscopie confocale a toujours été effectuée (sauf indication contraires) sur des plantules de 5 jours au niveau de cellules de l'épiderme présentes au début de la zone de différenciation. Afin d'identifier la partie du signal provenant de bruit de fond, des plantules Col-0 ont été imagées afin de déterminer les paramètres permettant de limiter au maximum la détection de ce bruit de fond. Ces paramètres ont ensuite été conservés lors de l'étude des différentes lignées fluorescentes. Afin de limiter au maximum, l'apparition de formes de stress liés au montage de la plantule entre lame et lamelle, un soin tout particulier a été apporté au fait que le temps d'observation de chaque plantule ne dépasse jamais 15 min.

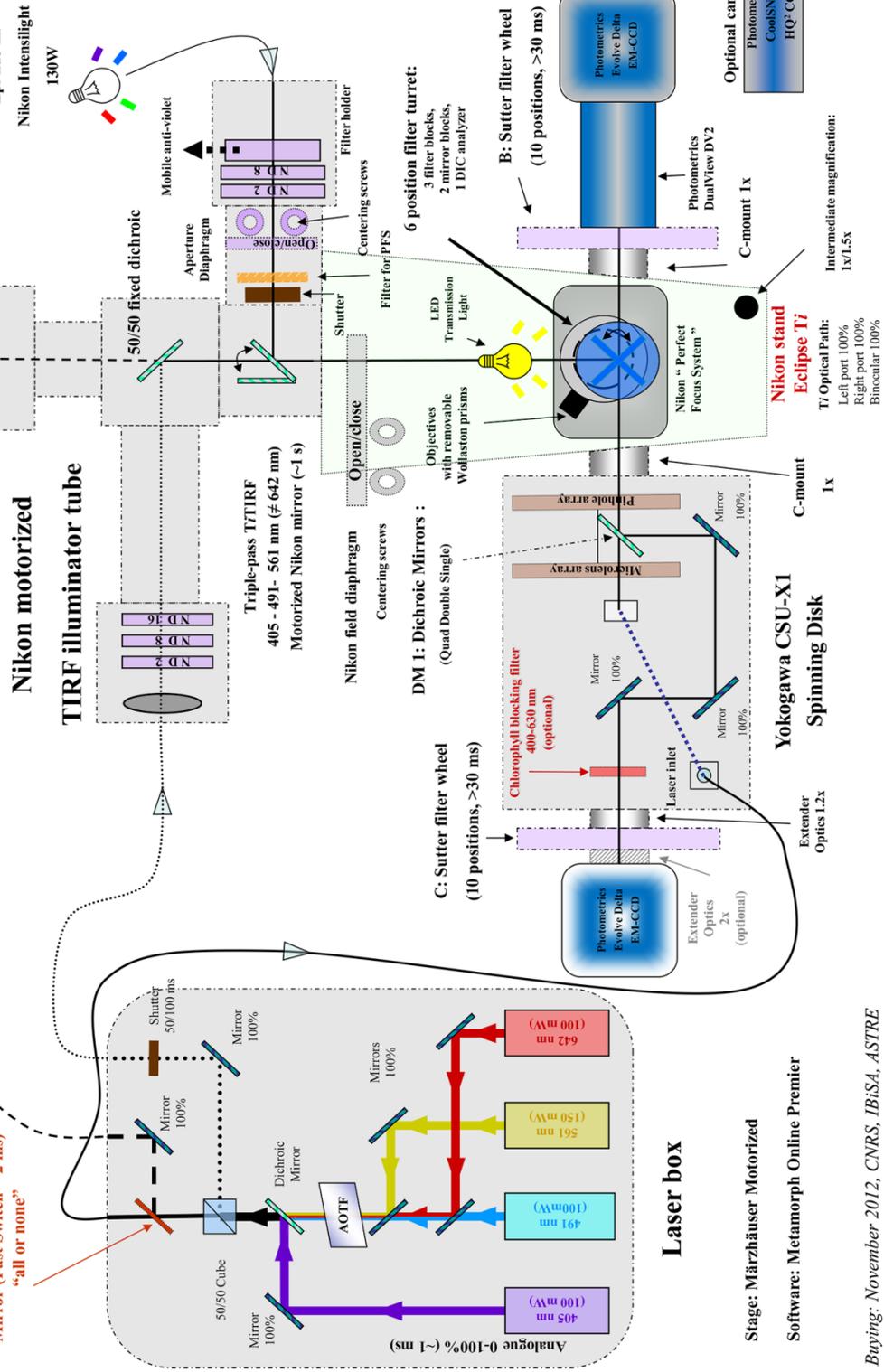
Confocal Microscope Spinning disk (“Nipkow Disk Microscope”)

Roper FRAP-PA iLas²

Optical configuration designed by: Roper Scientific, Evry, France

Scheme prepared by: Imagif, CNRS, Gif-sur-Yvette, <https://www.imagif.cnrs.fr>

Motorized Galvanometric Mirror (Fast Switch = 2 ms) “all or none”



Buying: November 2012, CNRS, IBISA, ASTRE

Figure 93 :Schéma du microscope confocal Spinning Disk (Imagif, <https://www.imagif.cnrs.fr>, Octobre 2013)

6.1. Configuration du Spinning Disk

La grande majorité des acquisitions de microscopie à fluorescence ont été effectuées sur un microscope Nikon Eclipse Ti E inversé, équipé d'un système confocal Nipkow Spinning Disk (Yokogawa CSU-X1-A1) (Fig. 93). Pour ce travail, ont été utilisés, un objectif à immersion dans l'huile 60 X APO TIRF (ouverture numérique : 1.49), ainsi qu'un objectif à immersion dans l'huile 100 X APO TIRF (ouverture numérique : 1.49). Un laser bleu à 491 nm (Cobolt Calypso DPSS laser, 100 mW) ainsi qu'un laser jaune à 561 nm (Cobolt Jive DPSS laser, 150 mW), ont été utilisés pour exciter respectivement la GFP et la mCherry. Un miroir dichroïque à double bande 491/561 (Chroma), ainsi que des filtres d'émission band-pass 525/45 nm et 607/36 nm (Semrock) ont été utilisés pour permettre la détection respective de la GFP et de la mCherry. La camera utilisé est une EMCCD Evolve 512 (Photometrics), et le tout est piloté par le logiciel Metamorph version 7.7 (Molecular Devices).

6.2. Dual View

Pour l'observation simultanée de la GFP et de la mCherry, nous avons utilisé le Dual View DV2 (Photometrics), qui est un système permettant de séparer spectralement le faisceau d'émission. Le Dual View contient un module composé d'un miroir dichroïque 565 nm (Chroma) et des filtres d'émission band-pass compatibles pour la détection de la GFP (Chroma, ET525/50) et la mCherry (Chroma, ET630/75m).

6.3. Expériences de FRAP

Les expériences de FRAP ont été effectuées sur le microscope à Spinning Disk; grâce au module iLAS² (Roper Scientifics). L'utilisation du Dual View nous a permis de suivre simultanément l'évolution de la fluorescence de structures initialement marquées par ATG5-GFP et mCh-ATG8e. Ces structures ont par la suite été "photobleachées" à la volée (FRAP on the fly) avec le laser 561, provoquant ainsi le "bleaching" de la mCherry, sans perturber la

fluorescence de la GFP. Pour analyser le retour de la fluorescence de la mCherry, les structures ont été suivies et isolées manuellement en utilisant ImageJ (Rasband, W.S., ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <http://imagej.nih.gov/ij/>, 1997-2012.).

6.4. Traitement et analyse des images

Les traitements d'image classiques (réglages luminosité/contraste, projection des intensités maximales, mesures d'intensité de fluorescence, applications de filtres), ont été effectués grâce à ImageJ. Certaines séries d'images possédant un faible signal ou destinées à des représentations tridimensionnelles ont été déconvoluées avec le logiciel Huygens Essential (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Netherlands) en utilisant un algorithme itératif CMLE (Classical Maximum Likelihood Estimation). Pour les études sur la dynamique des autophagosomes, les kymographes ainsi que le suivi automatique des autophagosomes ont été effectués en utilisant le logiciel Metamorph version 7.7 (Molecular Devices). Les rendus surfaciques 3D ont été réalisés à partir de "z-stacks" déconvolués, grâce au logiciel UCSF Chimera version 1.8 (développé par : the Resource for Biocomputing, Visualization, and Informatics at the University of California, San Francisco supported by NIGMS P41-GM103311) (Pettersen, Goddard et al. 2004). Pour les rendus surfaciques 3D, la distorsion le long de l'axe z a été évaluée sur des billes ($\varnothing = 3 \mu\text{m}$, TetraSpeck, Invitrogen), puis corrigée au mieux de manière linéaire. Ce facteur de correction a été utilisé par la suite pour effectuer les différents rendus 3D. Pour le dénombrement d'autophagosomes, les images de particule autophagiques marquées par des fusions GFP-ATG8 ont été traitées de la façon suivante, pour déterminer le nombre d'objets fluorescents.

- l'image est normalisée en la divisant par sa médiane (de rayon $r=4$ pixels)
- les objets sont recherchés par détections des contours (plugin « LoG filtering » <http://rsbweb.nih.gov/ij/plugins/log-filter.html>)
- L'image est binarisée, les contours remplis, et les objets ainsi générés dénombrés par la fonction « Analyze particles », avec un seuil de circularité de 0,85.

Les différentes étapes ont été programmées dans une macro pour ImageJ.

Etape	Solution	Conditions
Fixation	PFA 3 % dans MTSB	1 h, RT, agitation 100 rpm
Rinçages (x3)	MTSB	10 min, RT, agitation 100 rpm
Digestion de la paroi	Cellulase + pectinase dans MTSB	18 min, RT, agitation 100 rpm
Rinçages (x5)	MTSB	5 min, RT, agitation 100 rpm
Séchage des cellules sur lame		1 h, RT
Perméabilisation des membranes	Triton 0.5 % (v/v) dans MTSB	20 min, RT
Rinçages (x2)	MTSB	5 min, RT
Blocage des sites non spécifiques	BSA 1 % (w/v) dans MTSB	10 min, RT
Anticorps primaire	Anticorps dans MTSB + BSA	La nuit, 4°C
Rinçages (x3)	MTSB + gélatine de poisson	5 min, RT
Anticorps secondaire	Anticorps dans MTSB + BSA	1 h, RT
Rinçages (x3)	MTSB + gélatine de poisson	5 min, RT
Montage des lames	Citifluor	

Tableau 6 : Protocole d'immunomarquage des cellules BY2

6.5. Représentations graphiques et statistiques

Les différentes représentations graphiques (courbes, histogrammes, boîtes à moustaches) ainsi que les tests statistiques ont été réalisés à l'aide du logiciel Prism (GraphPad, Version 5.00). Les P values sont représentées comme suit : * = $P < 0.05$, ** = $P < 0.01$ and *** = $P < 0.001$.

7. Protocoles d'immunofluorescence chez les plantes

7.1. Immunomarquage de cellules BY2

Les immunomarquages sur les cellules BY2, pour les expériences d'immunofluorescence, ont été effectués à la main en suivant le protocole présenté dans le [Tableau 6](#). Les premières étapes de fixation et de digestion des parois, se déroulent dans un tube de 15 ml. Pour effectuer les lavages ou les changements de milieu, les cellules BY2 sont culotées par centrifugation douce (1 min, 400 rpm). Ensuite les étapes suivantes se déroulent sur des lames à multi-puits traitée avec du Vectabond (Vector Laboratories, London, UK).

MTSB (Microtubules Stabilizing Buffer) : 50 mM PIPES, 5 mM EGTA, 5 mM $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH ajusté à 7.0 avec du KOH.

Fixateur : Paraformaldéhyde (PFA) 3 % (w/v) dans MTSB (Sigma, réf. P6148)

Solution de digestion enzymatique : Cellulase “Onozuka” R-10 (Yakult Honsho Co., LTD.) 1 % (w/v) et Pectinase (Sigma. réf. P0690) 0.5 % (v/v), dans du MTSB.

Anticorps utilisés :

- α -ATG8 (Abcam, réf. ab77003), dilution 1:500
- α -lapin couplés à Alexa Fluor® 488 (Invitrogen. réf. A11008), dilution 1:100
- α -lapin couplés à Alexa Fluor® 568 (Invitrogen. réf. A11036), dilution 1:100

Etape	Solution	Conditions
Rinçages	MTSB + Triton 0.1 %	3 x 12 min, RT
Digestion enzymatique	Driselase 2 %	45 min, RT
Rinçages	MTSB + Triton 0.1 %	5 x 12 min, RT
Perméabilisation des membranes	Nonidet P-40 + DMSO	2 x 45 min, RT
Rinçages	MTSB + Triton 0.1 %	5 x 12 min, RT
Blocage des sites non spécifiques	BSA 3 % (w/v) dans MTSB	2 h, RT
Anticorps primaire	Anticorps dans MTSB + BSA	5 h, 37°C
Rinçages	MTSB + Triton 0.1 %	10 x 12 min, 37°C
Anticorps secondaire	Anticorps dans MTSB + BSA	3 h, 37°C
Rinçages	MTSB + Triton 0.1 %	10 x 12 min, 37°C
Rinçages	MTSB	2 x 12 min, 37°C

Tableau 7 : Protocole d'immunomarquage de racines d'Arabidopsis whole mount

Etape	Durée	Phase
10 % Ethanol	20 min	Déshydratation de l'échantillon
20 % Ethanol	20 min	
30 % Ethanol	20 min	
40 % Ethanol	20 min	
50 % Ethanol	20 min	
70 % Ethanol	Over night	
80 % Ethanol	30 min	
90 % Ethanol	30 min	
100 % Ethanol	30 min	
100 % Ethanol	30 min	
¼ de LR White dans éthanol	1 h	Infiltration de la résine
½ de LR White dans éthanol	1 h	
¾ de LR White dans éthanol	Over night	
100 % LR White	1 h	
100 % LR White	8 h	
100 % LR White	Over night	

Tableau 8 : Protocole d'inclusion des échantillons dans la résine LR White

7.2. Immunomarquage de racines d'*Arabidopsis* whole mount

Afin de réaliser nos immunomarquages sur les racines d'*Arabidopsis*, nous avons utilisé le robot In situPro VSi (Instavis Bioanalytical Instruments). Dans un premier temps, les racines sont coupées avec une lame de rasoir puis plongées dans du fixateur pendant 1 h (PFA à 3 % (w/v) dans MTSB). On sature ensuite les aldéhydes et on limite l'autofluorescence en remplaçant le fixateur par une solution de Glycine à 0.1 M pendant 15 min, puis par une solution de chlorure d'ammonium à 0.1M pendant 15 min. Les échantillons fixés sont ensuite placés dans le robot pour les étapes suivantes du protocole (Tableau 7).

Solution de digestion enzymatique : Solution de Driselase à 2 % (Sigma, réf. D9515), obtenue par mélange de la poudre dans du MTSB puis par récupération du surnageant après centrifugation.

Anticorps utilisés :

- α -ATG8 (Abcam, réf. ab77003), dilution 1:500
- α -lapin couplés à Alexa Fluor® 488 (Invitrogen. réf. A11008), dilution 1:100
- α -lapin couplés à Alexa Fluor® 568 (Invitrogen. réf. A11036), dilution 1:100

8. Microscopie électronique en transmission

8.1. Fixation chimique et inclusion en résine LR White

Les racines provenant de plantules d'*Arabidopsis* de 5 jours sont prélevées puis fixées chimiquement avec une solution de paraformaldéhyde 3% (w/v) et glutaraldéhyde 1% (w/v) dans du tampon cacodylate de sodium 0.1 M à pH 6.8 pendant 1 h à température ambiante, sous agitation. Les échantillons sont ensuite rincés 5 fois 5 min avec du tampon cacodylate de sodium 0.1 M pH6.8. Une fois fixés, les échantillons vont être déshydratés par immersion dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (Tableau 8). Ensuite, les échantillons vont être infiltrés avec la résine LR White (Agar, réf. R1281) en passant dans des

Etape	Durée	Phase
-90°C	27 h	"Freeze Substitution"
De -90°C à -60°C	15 h	
-60°C	8 h	
De -60°C à -30°C	15 h	
-30°C	8 h	
De -30°C à 0°C	1 h	
Rinçages à l'acétone	3 x 10 min	Rinçage
1/3 Epon dans acétone	5 h	Infiltration de la résine (température ambiante)
1/2 Epon dans acétone	Over night	
3/4 Epon dans acétone	5 h	
100 % Epon	Over night	
100 % Epon	5 h	
100 % Epon	5 h	
100 % Epon	Over night	

Tableau 9 : Protocole de Cryosubstitution en résine Epon

Etape	Durée	Phase
-90°C dans acétone	24 h	"Freeze substitution"
De -90°C à -80°C dans acétone	2,5 h	
-80°C dans acétone	107 h	
De -80°C à -60°C dans acétone	24 h	
De -60°C à 20°C dans acétone	4 h	
Rinçages à l'éthanol	4 x 1 h	Rinçage
25 % LR White dans éthanol	5 h	Infiltration de la résine (-20°C)
50 % LR White dans éthanol	12 h	
75 % LR White dans éthanol	5 h	
90 % LR White dans éthanol	5 h	
100 % LR White dans éthanol	12 h	
100 % LR White dans éthanol	5 h	
100 % LR White dans éthanol	5 h	
100 % LR White dans éthanol	15 h	
100 % LR White dans éthanol	1 h	

Tableau 10 : Protocole de Cryosubstitution en résine LR White

bains de concentrations croissantes de résine (Tableau 8). Afin de former un bloc solide, adapté pour les étapes de coupe, la résine est polymérisée pendant 24 h à -20°C avec les UV et 24 h à 0°C avec les UV.

8.2. Cryofixation

La pointe racinaire (3 mm) provenant de plantules d'*Arabidopsis thaliana* est coupée avec une lame de rasoir, et transférée rapidement dans les coupelles de 200 µm (Leica, réf. 16706807) contenant du 1-Hexadecene comme cryoprotectant (Sigma, réf. 52276) afin d'être immédiatement cryofixées sous haute pression par l'EMPACT2 (Leica). Les coupelles contenant les échantillons sont ensuite conservées dans l'azote liquide.

8.3. Cryosubstitution et inclusion en résine Epon

Une étape de post-fixation au Tetroxide d'osmium (2 % dans acétone) est ensuite effectuée afin de fixer et marquer les membranes, pour permettre des études morphologiques. Afin de pouvoir inclure les échantillons, on effectue tout d'abord une lente remontée en température pour préserver au maximum l'échantillon : c'est la "freeze substitution", gérée par l'AFS2 (Leica) (Tableau 9). Ensuite les échantillons sont progressivement imprégnés de résine Epon (Agar, Low Viscosity Premix Kit) (Tableau 9). Enfin, une fois l'imprégnation des échantillons terminée, la résine est polymérisée à 60°C pendant 16 h.

8.4. Cryosubstitution et inclusion en résine LR White

Après cryofixation, les échantillons sont directement plongés dans de l'acétone à -90°C pour entamer la "freeze substitution" dans l'AFS2 (Leica) puis effectuer l'imprégnation de la résine LR White à laquelle on a ajouté du Benzil (Agar, réf. R1285) 0.5 % (w/w) afin

d'accélérer la polymérisation de la résine en présence d'UV (Tableau 10). A la fin de ce processus on polymérise la résine, 24 h à -20°C, puis 24 h à 0°C, en présence d'UV.

8.5. Cryosubstitution et inclusion en résine HM20

Le protocole de cryosubstitution et d'inclusion en résine HM20 (EMS, réf. 14345), est identique à celui utilisé pour la LR White, excepté que lors de la cryosubstitution, la remontée en température se termine à -50°C. Quant à la polymérisation de la résine HM20, le processus s'effectue 48 h à -50°C, puis 48 h à 20°C, en présence d'UV.

8.6. Méthode de Tokuyasu

Les racines provenant de plantules d'*Arabidopsis* de 5 jours sont prélevées puis fixées chimiquement avec une solution de paraformaldéhyde 3% (w/v) et glutaraldéhyde 0.1 % (w/v) dans du tampon cacodylate de sodium 0.1 M à pH 6.8 pendant 1h à température ambiante, sous agitation. Une fois la fixation terminée, les échantillons sont rincés 3 fois 10 minutes à 4°C dans le tampon cacodylate de sodium. Les échantillons sont ensuite transférés dans un bain de glycine 0.1 M pendant 15 min pour saturer les aldéhydes et ainsi limiter le bruit de fond. Les échantillons sont ensuite de nouveau rincés 3 fois 10 minutes avec le tampon cacodylate de sodium. La phase suivante consiste à préparer les échantillons pour l'étape de coupe. Pour cela, les racines sont tout d'abord incluses dans un faible volume de gélatine à 12 %, puis laissées 30 min à 4°C. Les pointes de racines sont découpées à la lame de rasoir afin de former des cubes de gélatine contenant l'échantillon et ces échantillons sont ensuite plongés dans un bain de saccharose à 80 % (w/v) à 4°C pendant la nuit. Enfin, pour permettre la coupe, les cubes sont montés sur un porte échantillon puis congelés dans l'azote liquide.

Etape	Durée
PBS + Tween20	10 min
PBS + Glycine	10 min
PBS + BSA acétylée	10 min
Anticorps primaire dans PBS + BSA acétylée	60 min
PBS	5 x 2 min
PBS + BSA acétylé	10 min
Anticorps primaire dans PBS + BSA acétylée	30 min
PBS	3 x 2 min
Eau	8 x 2 min

Tableau 11 : Protocole de d'immunomarquage pour la MET

8.7. Coupe de l'échantillon

Pour les échantillons inclus en résine (Epon, LR White ou HM20), les blocs contenant les échantillons sont coupés en utilisant des ultramicrotomes (Leica, EM UC6) afin de réaliser des sections ultrafines de 80 nm. Pour les échantillons préparés par la méthode de Tokuyasu, des cryo-sections de 90 nm sont réalisées à -110°C à l'aide d'un cryo-ultramicrotome (Leica, EM FC6). Les coupes ainsi obtenues sont ensuite récupérées sur des grilles de cuivre (pour les observations morphologiques) ou (de nickel pour les immunomarquages), au préalable recouvertes par un film de formvar (Agar, réf. R1201) et de carbone.

8.8. Immunomarquage

Les immunomarquages sur grilles pour la microscopie électronique ont été effectués comme décrit dans le [Tableau 11](#).

PBS : NaCl 140 mM, KCl 3.9 mM, Na₂HPO₄ 12 H₂O 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.8 mM, pH 7.4

PBS + Tween20 : PBS + 1 % Tween20 (v/v)

PBS + Glycine : PBS + Glycine 100 mM

PBS + BSA acétylé : PBS + BSA acétylé 0.1 % (w/v) (Aurion)

Anticorps utilisés

α -GFP	Abcam, réf. ab290	Anticorps polyclonal de lapin	1:200 contre GFP-ATG8 1:10 contre GFP-ATG9
α -GFP	Clonotech, réf. JL-8	Anticorps monoclonal de souris	1:10 contre GFP-ATG9
α -ATG8	Abcam, réf. ab77003	Anticorps polyclonal de lapin	1:20
α -Lapin	BBI international	Immunogold conjugate (10 nm)	1:20
α -Souris	BBI international	Immunogold conjugate (10 nm)	1:20

8.9. Amélioration du contraste des échantillons

Pour permettre l'observation des différentes structures cellulaires, les coupes ultrafines sont contrastées. Cette étape se déroule en deux étapes : tout d'abord, les échantillons sont contrastés à l'acétate d'uranyle 2 % (w/v) pendant 20 min pour les approches morphologiques ou 10 min pour les approches d'immunomarquages. Ensuite les échantillons sont contrastés au citrate de plomb pendant 10 min pour les approches morphologiques ou 2 min pour les approches d'immunomarquages.

8.10. Observation des échantillons

Les échantillons sont observés sur un microscope électronique à transmission JEOL 1400 à 120 kV. L'acquisition des images se fait grâce à une caméra haute résolution Orius SC1000 (Gatan) placé en bas de colonne.

9. Microscopie corrélative

Pour les études de microscopie corrélative, les pointes de racines sont préparées selon la méthode de Tokuyasu (Cf. 8.6), coupées à l'ultracryomicrotome, puis les coupes sont récupérées sur des grilles de cuivre, dans une goutte de d'un mélange de méthylcellulose (1 % (w/v)) et de saccharose (40 % (w/v)). Ces grilles sont ensuite montées entre lame et lamelle dans de l'eau afin qu'elles puissent être observées en microscopie confocale classique (Leica, SP8X) ou en microscopie à Spinning Disk. Une fois les images en fluorescence obtenues, les grilles sont récupérées puis contrastées à l'acétate d'uranyle 2 % (w/v) dans l'eau pendant 5 min, puis 5 min dans Acétate d'uranyle 0.4 % (w/v) dans du méthylcellulose 2 % (w/v). Enfin les échantillons sont observés au microscope électronique en transmission. Une fois les images en fluorescence et de microscopie électronique obtenues, leur superposition est réalisée en utilisant le logiciel Photoshop CS5 (Adobe, version 12.0).

ANNEXES

ANNEXE I

ETUDE DE PROCESSUS AUTOPHAGIQUES DANS BY-2

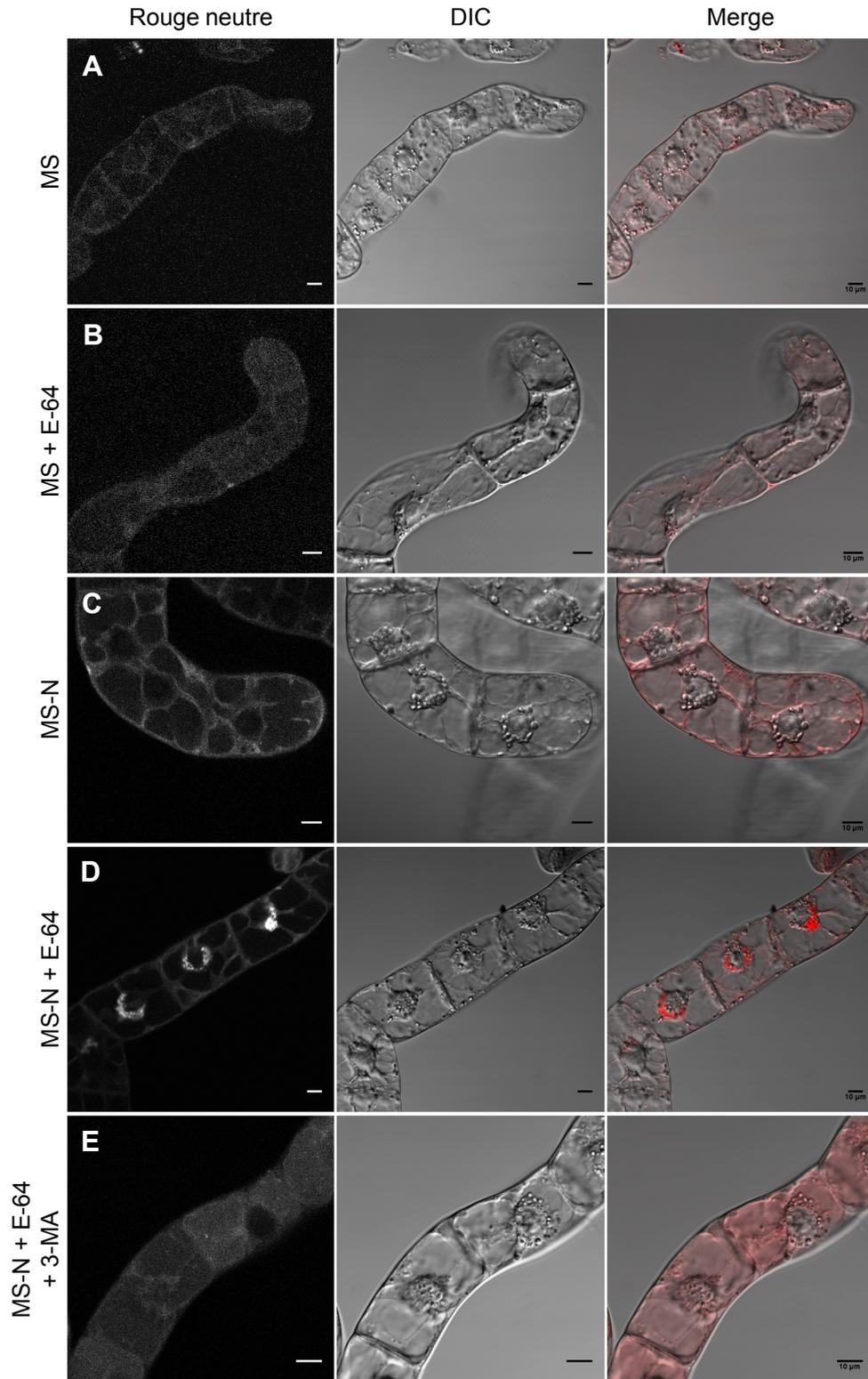


Figure 94 : Accumulation de structures de type "auto-lysosomes", marquées par le rouge neutre, en condition de carence azotée avec un inhibiteur de protéases (E-64)

Cellules BY2 marquées au rouge neutre (35 μ M), après culture pendant 24 h dans un milieu riche (MS), MS + E-64 (10 μ M), milieu dépourvu d'azote (MS-N), MS-N + E-64 (10 μ M), ou MS-N + E-64 +3-MA (5 mM).

Microscopie confocale à Spinning Disk.

1. Conditions d'induction de l'autophagie

Les colorants et les sondes vitales sont des outils couramment employés pour révéler des compartiments subcellulaires. Les propriétés physico-chimiques de la quinacrine, du rouge neutre, ou du lysotracker, font de ces composés des marqueurs de compartiments cellulaires acides. Ils ont été employés comme les premiers marqueurs permettant l'identification d'autophagosomes dans la cellule végétale (Moriyasu and Ohsumi 1996).

Ces précédents travaux chez les cellules BY-2 avaient permis de montrer que la carence en saccharose induisait la formation d'autolysosomes lors d'un processus autophagique (Moriyasu and Ohsumi 1996). Afin d'étudier si la formation de ces structures est spécifique à une déficience en carbohydrates ou une réaction générale face à une carence nutritionnelle nous avons décidé de tester l'effet d'une carence en azote sur les cellules BY-2.

Dans un premier temps les cellules ont été cultivées sur milieu riche en azote et carbone, puis traitées avec du rouge neutre. Dans de telles conditions, la fluorescence générée par la sonde est faible et diffuse dans le cytoplasme (Fig. 94A). Les cellules BY-2 ont été ensuite transférées pendant 24 h dans un milieu carencé en azote. Dans ces conditions, le marquage par le rouge neutre reste inchangé, et ne permet pas d'identifier de nouveaux compartiments acides dans la cellule (Fig. 94C).

Ces résultats peuvent être liés à la rapidité avec laquelle les structures autophagiques sont dégradées. Pour détecter d'éventuelles formations de structures autophagiques, la dégradation des autophagosomes a alors été bloquée par l'utilisation des inhibiteurs de cystéines protéases comme le E-64. Lorsque les cellules BY-2 ayant poussé sur un milieu riche sont traitées au E-64 pendant 24 h, le rouge neutre ne marque toujours aucun compartiment (Fig. 94B). Par contre, lorsque des cellules BY-2 ayant poussé sur un milieu dépourvu d'azote et en présence de l'inhibiteur de protéase E-64 pendant 24 h, on observe en DIC de nombreux amas de vésicules s'accumulant autour du noyau et fortement marqués par le rouge neutre (Fig. 94D). Ces structures sont-elles des structures autophagiques ?

Un blocage de la voie autophagique par le 3-méthyladénine (3-MA), ou par la wortmannine, (inhibiteurs des PtdIns-Kinases de type 3 (PI3K) et donc de l'autophagie, a alors été réalisé (Fig. 94E). Les cellules BY-2 ont été cultivées pendant 24 h dans un milieu

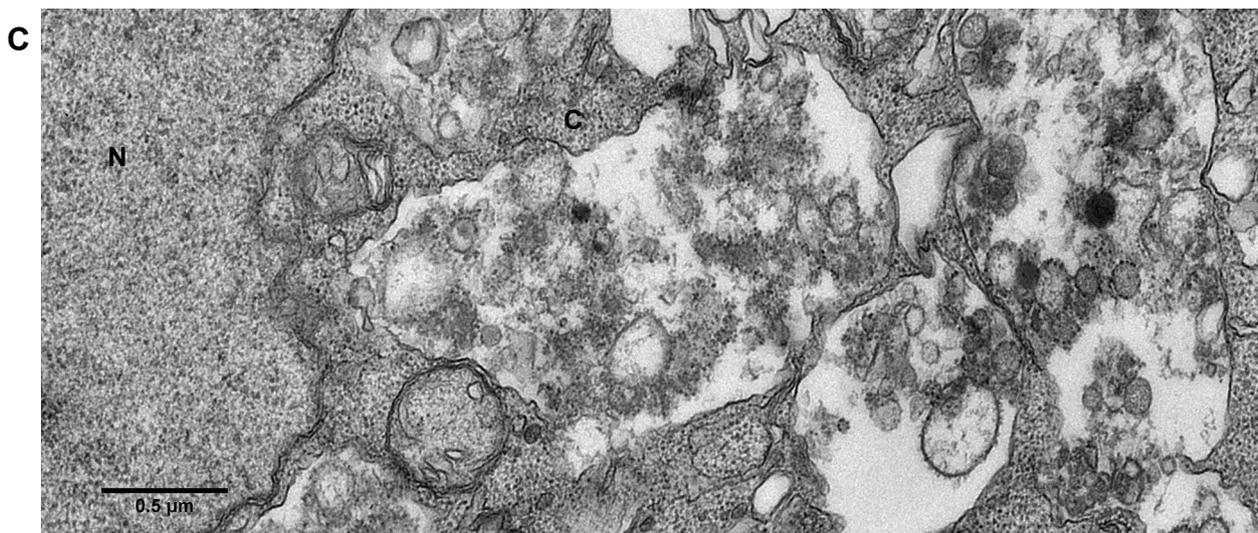
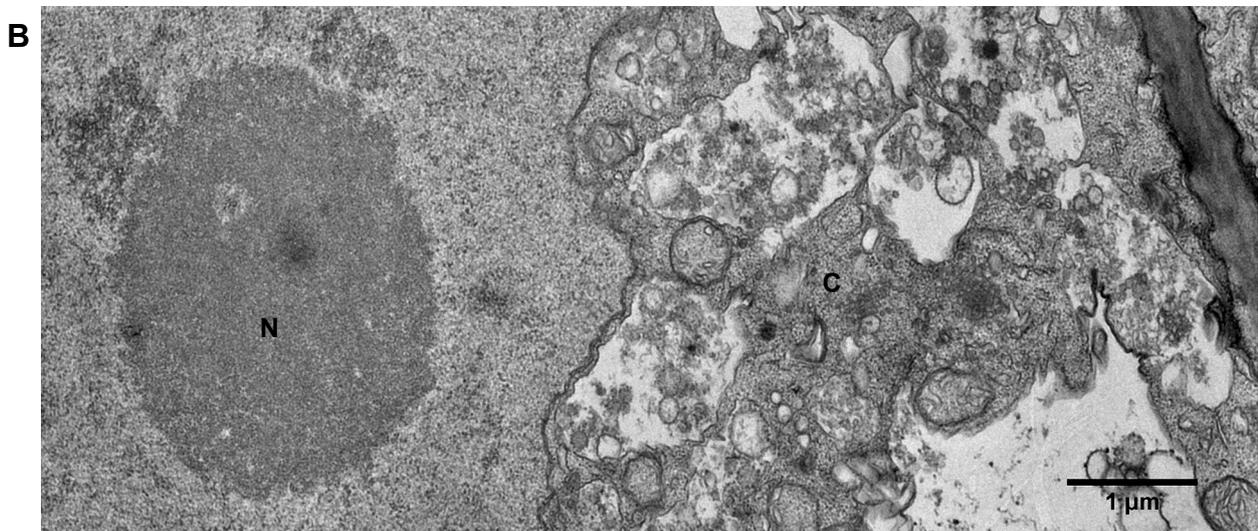
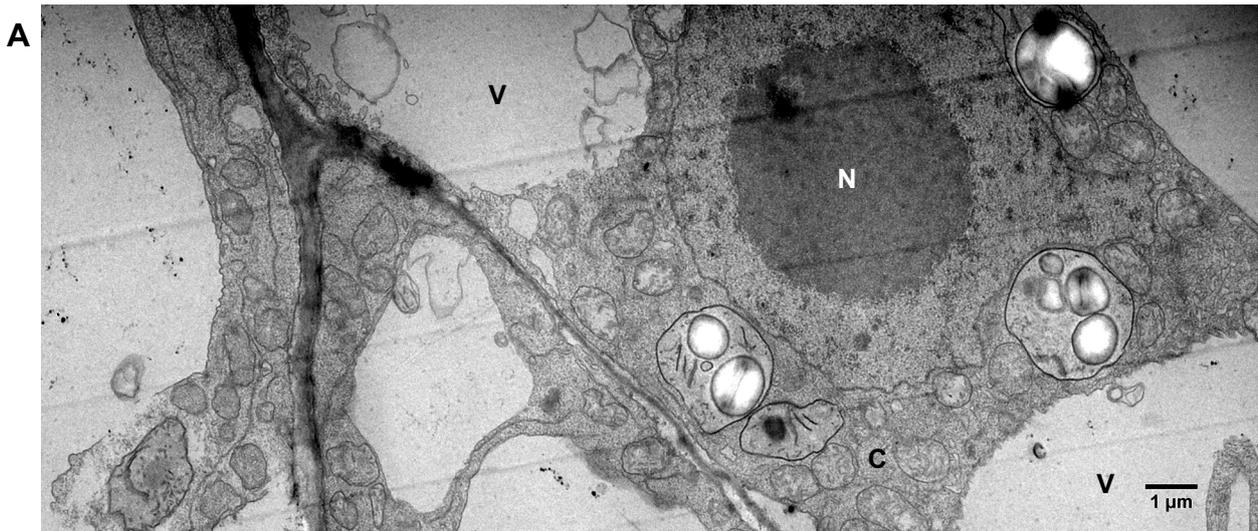


Figure 95 : Accumulation de vacuoles autophagiques autour du noyau en conditions de carence azotée et en présence d'un inhibiteur de protéases (E-64)

Cellules BY2 cultivées 24 h dans un milieu MS (A) ou MS-N +E-64 (B et C)

N : noyau, V : vacuole, C : cytoplasme.

Microscopie électronique en transmission.

dépourvu d'azote, en présence de E-64 pour bloquer la dégradation des structures autophagiques, et de 3-MA pour inhiber l'autophagie : aucun amas de vésicules périnucléaires n'est observé. Le marquage du rouge neutre est de nouveau diffus et semble marquer l'intégralité de la cellule. Des résultats similaires sont obtenus en utilisant le lysotracker en lieu du rouge neutre.

Pour conclure, tout comme la carence en saccharose, la carence en azote provoque la formation d'amas de vésicules acides dans une région périnucléaire. Ces vésicules sont sensibles à des inhibiteurs de l'autophagie, ce qui laisse penser que ces structures pourraient être des autolysosomes. Cependant le manque de spécificités tant des marqueurs que des agents pharmacologiques ne permet pas de confirmer cette hypothèse.

2. Etude ultrastructurale des "autolysosomes" chez BY-2

Afin de progresser dans l'identification de structures subcellulaires induites sous conditions carencées, nous avons fait appel à la microscopie électronique en transmission.

La micrographie de la figure (Fig. 95A) illustre la morphologie des cellules BY-2 ayant poussé sur un milieu riche. Le noyau est entouré par une fine bande de cytoplasme (1 à 3 μm). Au sein du cytoplasme on retrouve les organites présents chez toutes les cellules végétales à savoir : le réticulum endoplasmique, les nombreux appareils de Golgi, les mitochondries, les plastes (notamment les amyloplastes facilement reconnaissables grâce à leurs grains d'amidon)... La vacuole apparaît la plupart du temps vide. Plus rarement, elle contient quelques éléments en cours de dégradation.

En milieu carencé en azote, et en présence d'un inhibiteur de protéases (E-64), les cellules BY-2 ont une morphologie relativement semblable aux cellules cultivées sur un milieu riche (Fig. 95B). La différence majeure, d'un point de vue morphologique, entre ces deux conditions, est la structure de la région périnucléaire. En lieu d'un cytoplasme compact décrit précédemment, les cellules cultivées dans un milieu carencé et en présence de E-64, présentent de nombreux compartiments d'aspect vacuolaires au sein du cytoplasme. Ces compartiments sont délimités par une simple membrane et contiennent des constituants

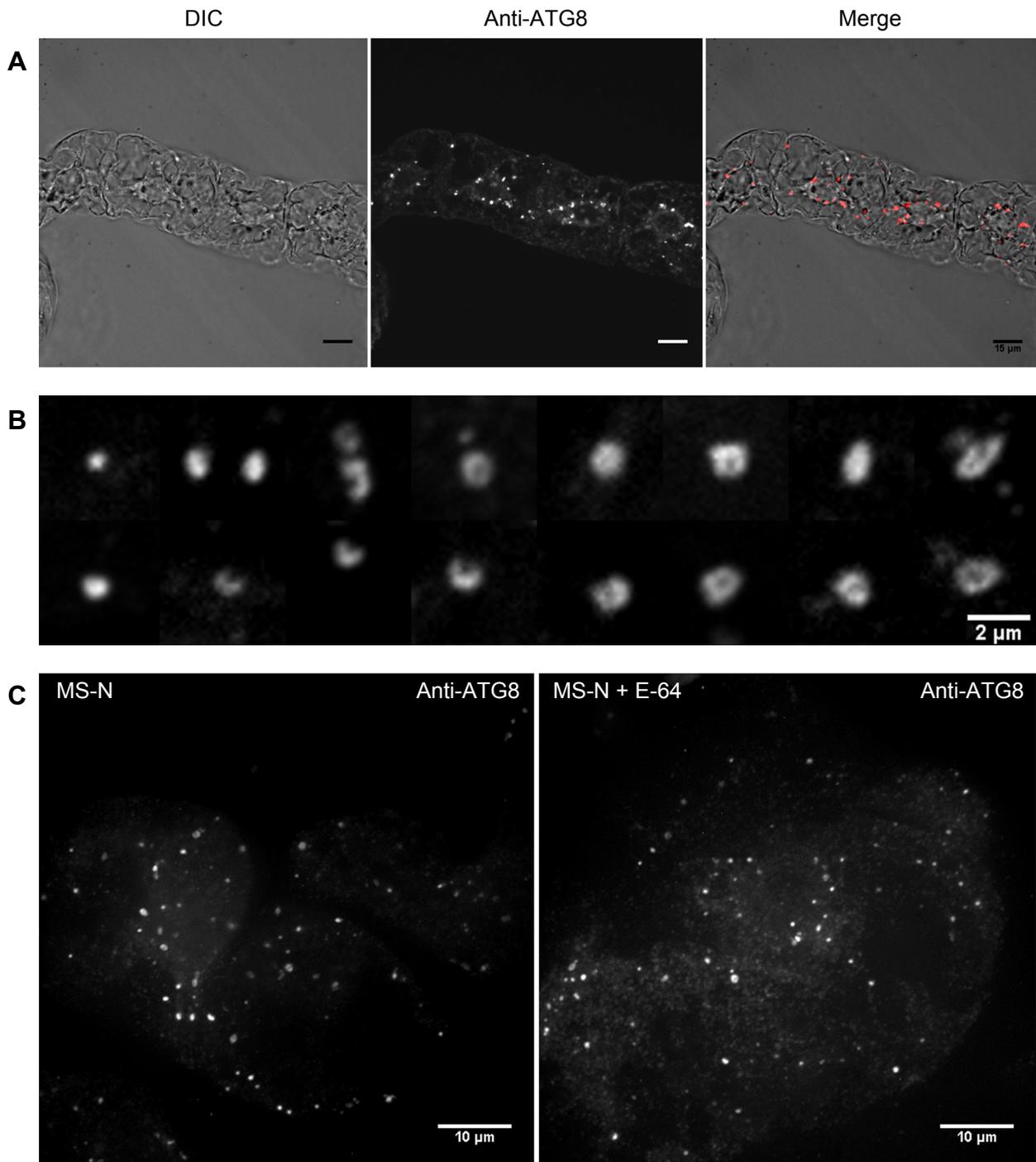


Figure 96 : Immunomarquage de ATG8 chez les cellules BY2

(A) Cellules BY2 cultivées 24 h en milieu riche (MS), immunomarquées par un anticorps anti-ATG8 (Alexa 561) (MIP d'un stack de 10 µm) .

(B) Structures marquées par un anticorps anti-ATG8, observées chez des BY2 cultivées en condition carence azotée (MS-N).

(C) Cellules BY2 cultivées 24 h en condition carence azotée (MS-N), avec ou sans E-64 (10 µM), immunomarquées par un anticorps anti-ATG8 (Alexa 568) (MIP d'un stack de 15 µm).

Microscopie confocale à Spinning Disk.

cytosoliques, identifiables par la présence de ribosomes, et en cours de dégradation (Fig. 95C). On observe également des vésicules à simple membrane, plus ou moins intactes, présentes dans ces compartiments vacuolaires, laissant penser à des corps autophagiques. En effet, lorsque les autophagosomes fusionnent avec un compartiment vacuolaire, leur membrane externe fusionne avec la membrane vacuolaire et la membrane interne ainsi que son contenu se retrouve déversée dans la vacuole, formant un corps autophagique. Etonnement alors que les petites vacuoles accumulent des inclusions cytosoliques en cours de dégradation, la vacuole centrale ne semble pas affectée par ce phénomène.

Ces observations confirment que, dans des conditions de carence en azote et en présence d'un inhibiteur de protéase, de compartiments "vacuolaires" contenant de nombreuses inclusions en cours de dégradation apparaissent. Des structures de type corps autophagiques se retrouvent accumulées dans des vacuoles lytiques.

3. Identification des structures autophagiques par immunomarquage.

Afin d'identifier avec plus de certitude si les différentes structures subcellulaires induites par des conditions de carence constituent des structures autophagiques, il est nécessaire d'utiliser des marqueurs spécifiques de l'autophagie. Le marqueur le plus communément utilisé pour cela est ATG8, lié de manière covalente à la membrane de l'autophagosome jusque sa dégradation. L'étude des banques d'ADNc (séquences EST), a permis de mettre en évidence 4 isoformes d'ATG8 chez le tabac: NtATG8 (Takatsuka, Inoue et al. 2004). L'étude de leur séquence montre que ces isoformes possèdent une forte similarité avec les différentes isoformes d'ATG8 présentes chez *Arabidopsis thaliana*. Afin d'identifier les structures autophagiques chez BY-2 nous avons utilisé un anticorps dirigé contre l'isoforme d'*Arabidopsis* ATG8a.

En microscopie photonique, un marquage par immunofluorescence indirecte réalisé avec cet anticorps sur des cellules BY-2 cultivées en milieu riche en nutriments révèle des structures ponctiformes réparties dans tout le cytosol (Fig. 96A). Ce marquage est spécifique

de l'anticorps puisqu'il n'y a aucun signal fluorescent dans les contrôles sans anticorps anti-ATG8. Les structures fluorescentes sont de tailles différentes, comprises entre 0,5 et 2 μm . Leur forme est également variable, on trouve des structures sphériques, d'autres en forme de croissants et enfin certaines, plus grandes, semblent former des vésicules plus ou moins régulières (Fig. 96B). Les structures révélées par cet anticorps ressemblent fortement aux structures autophagiques observées chez d'autres organismes. Ces observations semblent indiquer que l'anticorps initialement dirigé contre ATG8a permet bien de marquer les autophagosomes chez les cellules BY-2. Leur absence dans les structures vacuolaires pourraient être liée à un problème de détection de la fluorescence.

Ces observations suggèreraient à priori que l'autophagie existe de manière constitutive chez BY-2. En conditions carencées de nombreuses structures cytosoliques sont également marquées par l'anticorps (Fig. 96C). En présence de l'inhibiteur de protéase E64 on retrouve toujours ces nombreuses structures cytosoliques, mais, contrairement à ce qui était observé par coloration au rouge neutre, cette fois ci aucune structure périnucléaire ne se trouve marquée par l'anticorps.

Pour conclure, l'anticorps anti ATG8a marque, chez BY-2, des structures qui pourraient correspondre de par leur taille et leur forme à des autophagosomes. De manière surprenante cependant, aucune structure correspondant aux autolysosomes présumés accumulés en zone périnucléaires, n'a été marquée par l'anticorps.

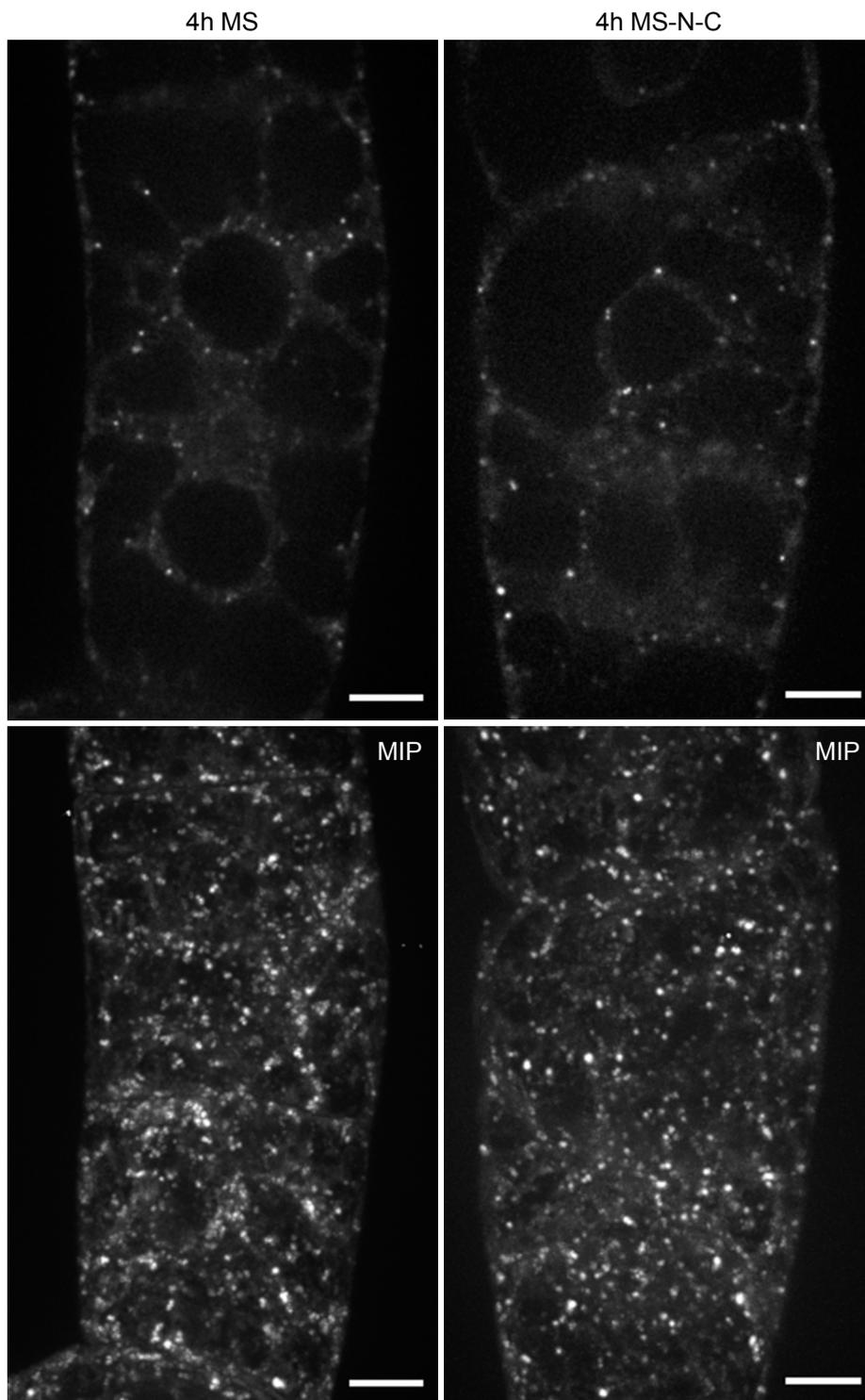


Figure 96 bis : Localisation cellulaire de AtATG9 chez BY-2

Cellules BY-2 exprimant de manière stable GFP-ATG9. 3 jours après leur le repiquage, les cellules sont transférées pendant 4 heures dans un milieu MS ou dans un milieu MS-N-C pour induire l'autophagie. Echelle : 10 μ m. MIPs : 40 μ m.

Spinning Disk

4. Identification de structures autophagiques par expression de protéines ATG chimériques.

L'étape suivante de cette étude, était de générer des lignées BY-2 exprimant différents marqueurs de la voie autophagiques, couplés à des protéines fluorescentes, afin d'identifier les différentes étapes de la formation des autophagosomes chez BY-2. Pour cela nous avons tenté de transformer des cellules BY-2 par co-culture avec différentes souches d'*Agrobacterium tumefaciens*, exprimant des constructions comportant la séquence codante d'ATG5, ATG8e ou d'ATG9 couplée à la GFP. Malgré de multiples essais, la tentative d'obtention de lignées ATG5 et ATG8 est restée vaine. Par contre l'obtention d'une lignée GFP-ATG9 stable est en cours (Fig. 96bis)

5. Bilan

Avec un marquage basé sur le rouge neutre, on note, une accumulation de structures "autophagiques" en zone périnucléaire, visibles essentiellement après avoir effectué un blocage de leur dégradation avec du E64.

Avec un marquage par un anticorps ATG8, on note des structures "autophagiques" dont le nombre ne semble pas augmenter après un traitement par E64 et qui ne se regroupent pas en zone périnucléaire.

La discordance d'interprétations entre les marquages de compartiments marqués par le rouge neutre ou les marquages révélés par un anticorps anti-Atg8 sur un milieu carencé amène plusieurs hypothèses, et une conclusion :

- Soit cet amas de vésicules ne résulte pas d'un blocage de la voie autophagique et correspond alors à un compartiment de type pré-vacuolaire ou endosomal tardif, comme évoqué par Yamada, K et al (Yamada, Fuji et al. 2005) sous l'action des drogues.

- Soit cet amas périnucléaire correspond bien à une accumulation de structures autophagiques ayant fusionné avec un compartiment lytique, mais l'absence de marquage par

l'anti ATG8a est le résultat d'un problème d'accessibilité de l'anticorps ou de dégradation rapide des épitopes une fois dans ce compartiment lytique.

- Il se peut également que l'anticorps ne reconnaisse pas toutes les isoformes de ATG8 présentes chez BY2, ce qui pourrait expliquer que seule une population de structures autophagique soit marquée par cet anticorps.

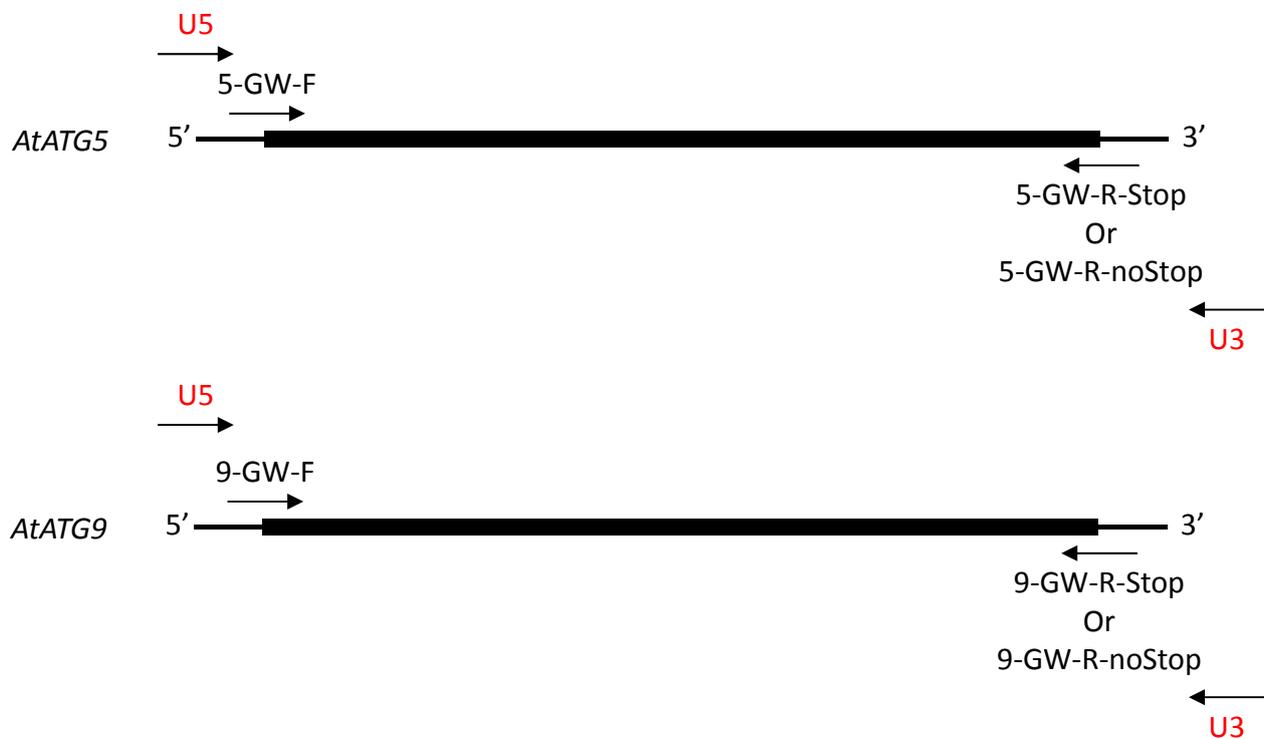
Nos essais d'immunomarquages à l'or en microscopie électronique en transmission n'ont pas permis de trancher entre ces hypothèses. Malgré les nombreuses méthodes de fixation testées et les nombreuses conditions de préparation des échantillons, nous ne sommes pas parvenus à identifier des structures particulières grâce à l'anticorps anti ATG8. En effet, couplé à des billes d'or, cet anticorps s'est avéré marquer le cytosol, le contenu des vacuoles et les éventuelles structures autophagiques. Ce modèle de marquage peut traduire des réactions non spécifiques mais il se peut également que ce marquage soit lié à la présence d'ATG8 dans le cytosol dans sa forme non lipidée, au niveau des structures autophagiques lorsqu'il s'y trouve associé puis au niveau de la vacuole lors de la dégradation de l'autophagosome.

6. Conclusion

Bien que l'intérêt des cellules BY-2 comme modèle expérimental pour les études de biologie cellulaire ne soit pas à démontrer, cette étude préliminaire n'a pas permis de formellement identifier des structures autophagiques. Elle suggère de plus que le niveau d'autophagie pourrait être élevé en conditions de cultures contrôlées, limitant l'intérêt du modèle pour étudier une formation *de novo*. Elles démontrent également le fort impact des drogues sur le remaniement membranaire de la cellule, compliquant l'interprétation des résultats en absence de marqueurs spécifiques.

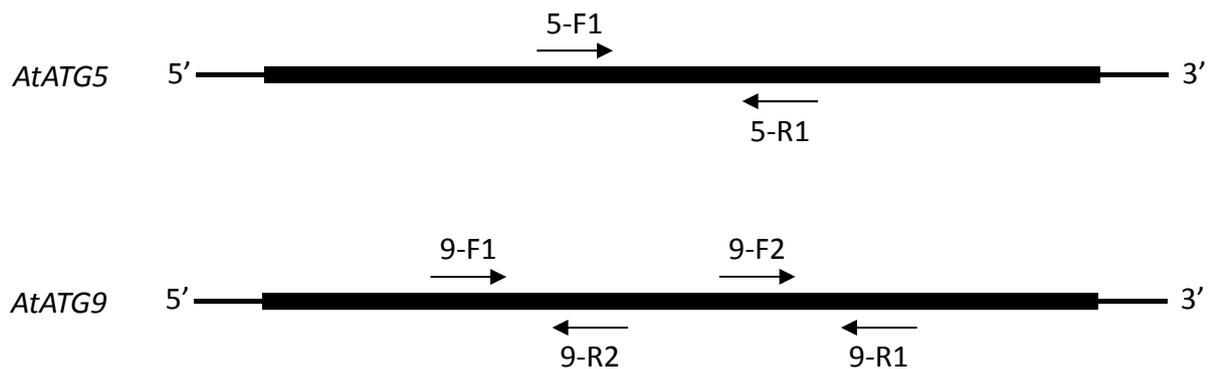
ANNEXE II

PRIMERS / VECTEURS



	Nom primer	Sequence (les séquences attB sont soulignées)
<i>AtATG5</i>	5-GW-F	5'- <u>TACAAAAAAGCAGGCTTC</u> ATGGCGAAGGAAGCGGTCAAG-3'
	5-GW-R-noStop	5'- <u>CAAGAAAGCTGGGTCC</u> CTTTGAGGAGCTTTCACAAG-3'
	5-GW-R-Stop	5'- <u>CAAGAAAGCTGGGTCT</u> CACCTTTGAGGAGCTTTCAC-3'
<i>AtATG9</i>	9-GW-F	5'- <u>TACAAAAAAGCAGGCTTC</u> ATGATGAGCAGTGGGCATAAG-3'
	9-GW-R-noStop	5'- <u>CAAGAAAGCTGGGTCC</u> CGTAATGTGGTGCTTGATGTTG-3'
	9-GW-R-Stop	5'- <u>CAAGAAAGCTGGGTCT</u> CACCGTAATGTGGTGCTTGATG-3'
<i>Universal Primers</i>	attB1 adapter (U5)	5'-GGGGACA AGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT-3'
	attB2 adapter (U3)	5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT-3'

Figure 97 : Primers utilisés pour amplifier la séquence codante et ajouter les régions attB



	Nom primer	Séquence
<i>AtATG5</i>	5-F1	5'-TGAACATGTCTCAGAGTG-3'
	5-R1	5'-CTTGTTGAGATTGTGGAG-3'
<i>AtATG9</i>	9-F1	5'-TGGTCCAGCAGTCAAATC-3'
	9-F2	5'-GATATTGAAGGTGTAGGC-3'
	9-R1	5'-CCCAAGAAGGATAACTAC-3'
	9-R2	5'-CATAGCAAGCCCAACCAC-3'
<i>pDONR</i>	pDONOR-FP	5'-TAACGCTAGCATGGATCTC-3'
	pDONOR-RP	5'-GCAATGTAACATCAGAGAT-3'

Figure 98 : Primers utilisés pour le séquençage

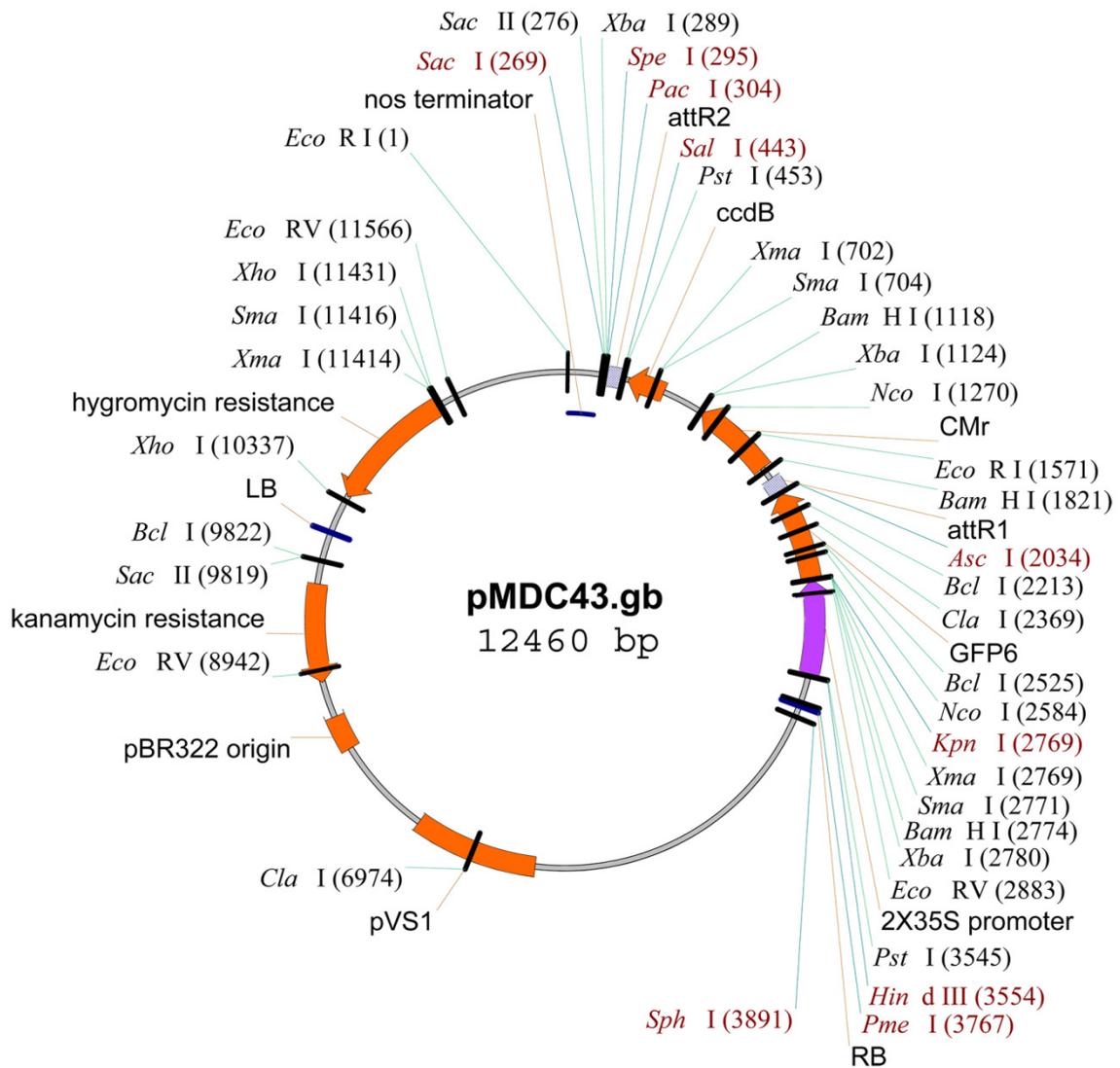


Figure 99 : Schéma du vecteurs pMDC43

Marks Gateway Vector Page, http://botserv1.uzh.ch/home/grossnik/curtisvector/index_2.html, 02-2009

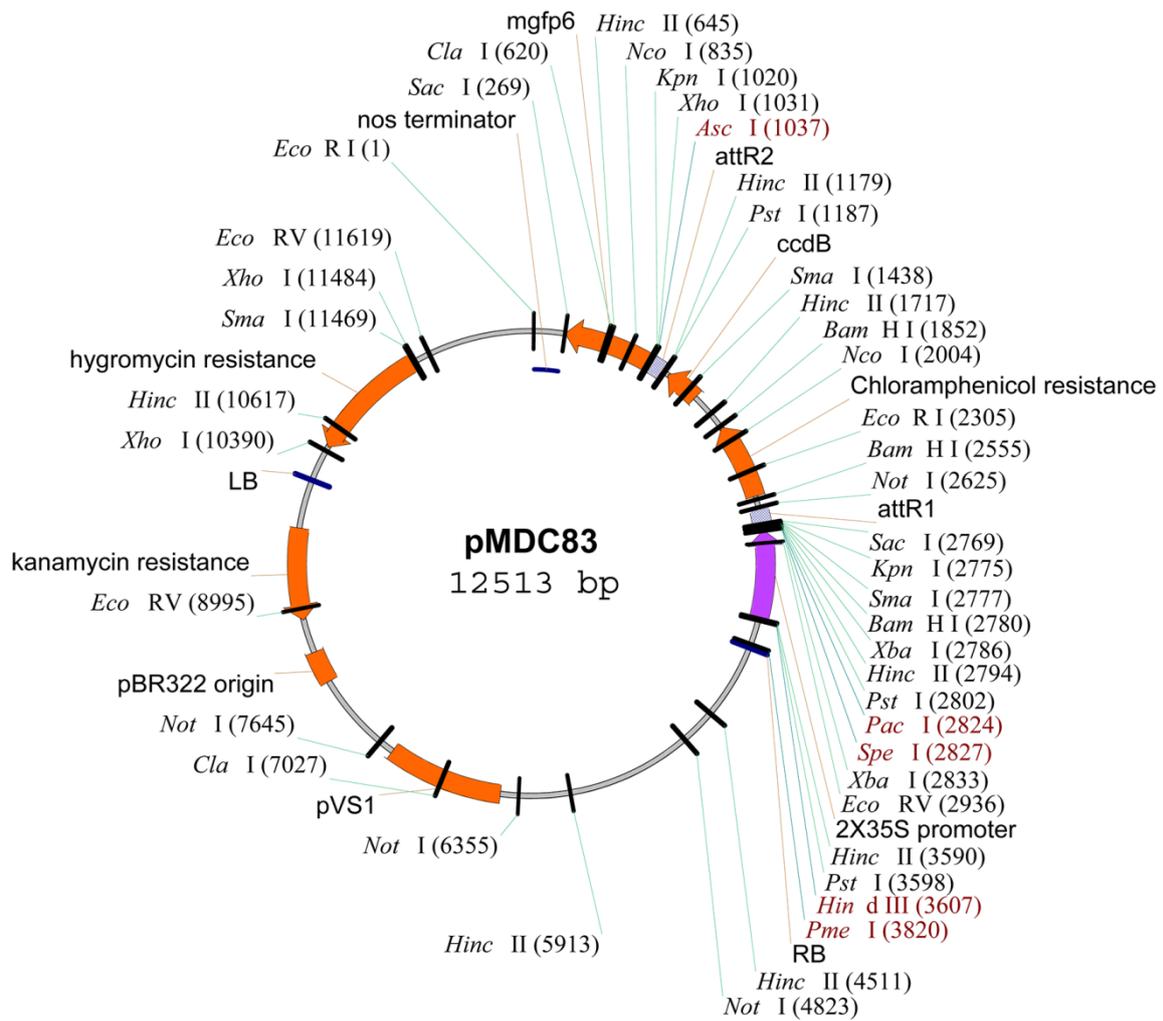


Figure 100 : Schéma du vecteurs pMDC83

Marks Gateway Vector Page, http://botserv1.uzh.ch/home/grossnik/curtisvector/index_2.html, 02-2009

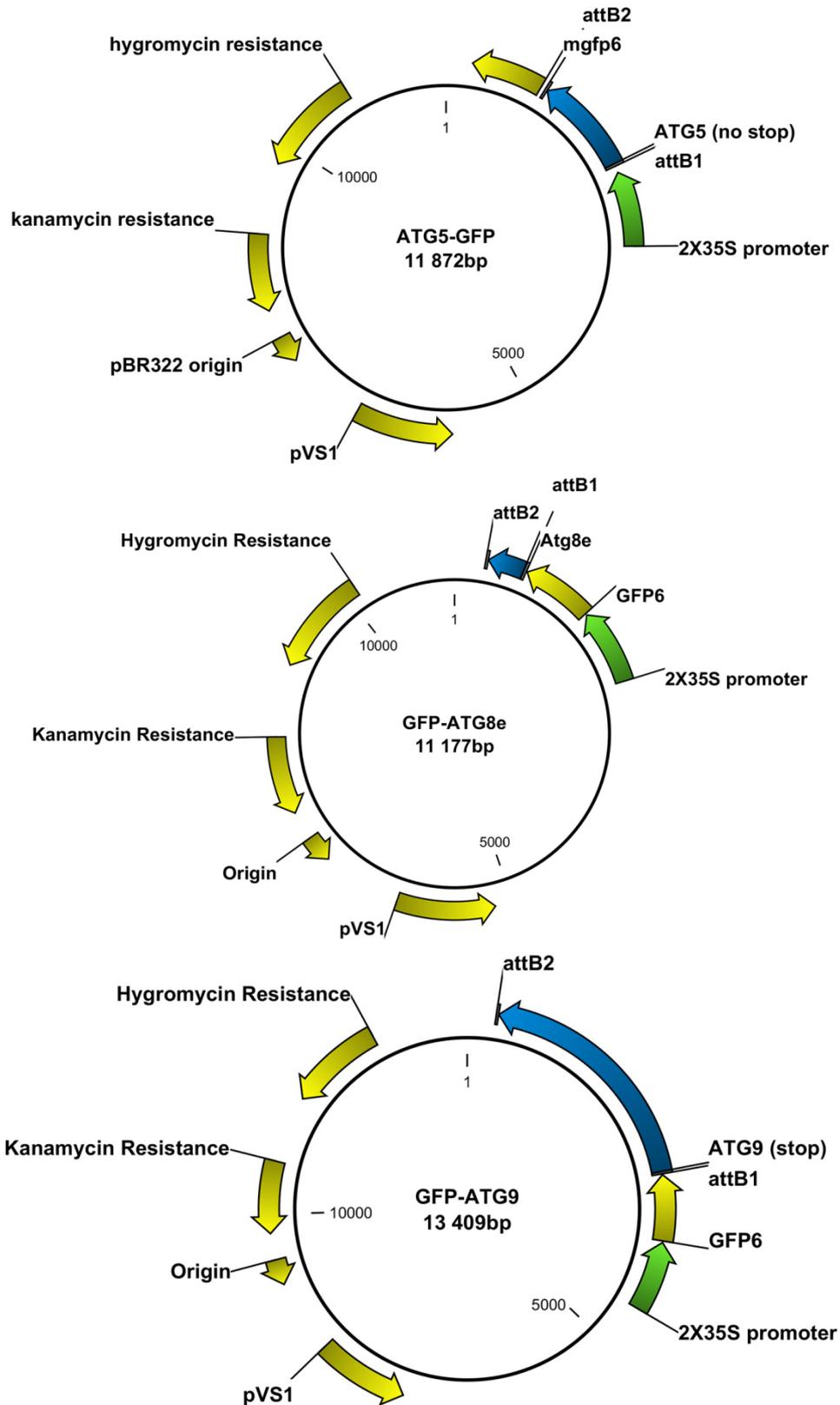


Figure 101 : Schéma des vecteurs générés permettant l'expression des constructions ATG5-GFP, GFP-ATG8e et GFP-ATG9

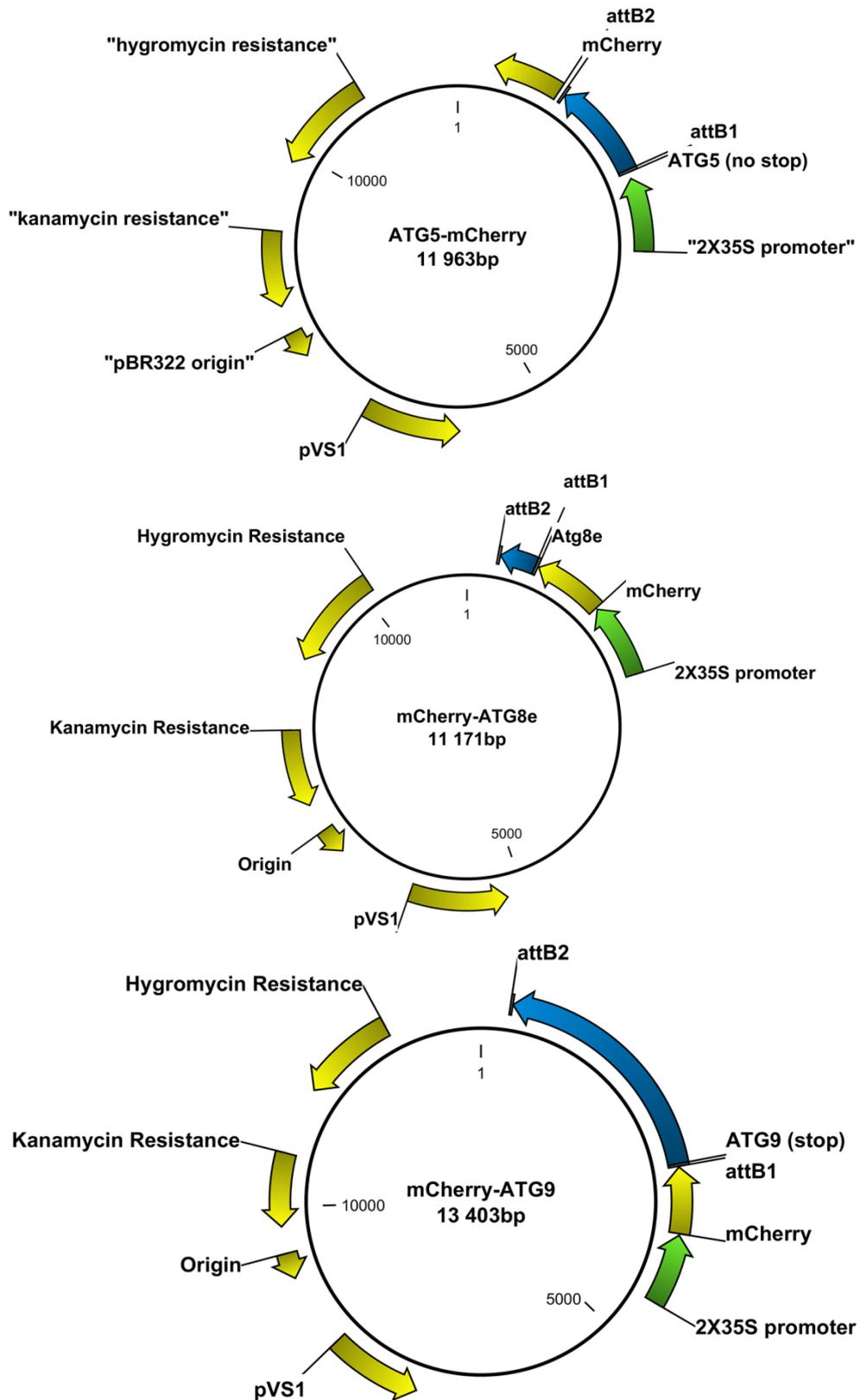


Figure 102 : Schéma des vecteurs générés permettant l'expression des constructions ATG5-mCh, mCh-ATG8e, et mCh-ATG9

REFERENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- Agrawal, G.K., Jwa, N.-S., Lebrun, M.-H., Job, D., and Rakwal, R.** (2010). Plant secretome: Unlocking secrets of the secreted proteins. *PROTEOMICS* **10**, 799-827.
- Aguilera, M.O., Berón, W., and Colombo, M.I.** (2012). The actin cytoskeleton participates in the early events of autophagosome formation upon starvation induced autophagy. *Autophagy* **8**.
- Alemu, E.A., Lamark, T., Torgersen, K.M., Birgisdottir, A.B., Larsen, K.B., Jain, A., Olsvik, H., Øvervatn, A., Kirkin, V., and Johansen, T.** (2012). ATG8 Family Proteins Act as Scaffolds for Assembly of the ULK Complex SEQUENCE REQUIREMENTS FOR LC3-INTERACTING REGION (LIR) MOTIFS. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 39275-39290.
- An, Q., Hüchelhoven, R., Kogel, K.-H., and Van Bel, A.J.E.** (2006). Multivesicular bodies participate in a cell wall-associated defence response in barley leaves attacked by the pathogenic powdery mildew fungus. *Cellular Microbiology* **8**, 1009-1019.
- Antonny, B.** (2011). Mechanisms of Membrane Curvature Sensing. *Annual Review of Biochemistry* **80**, 101-123.
- Avin-Wittenberg, T., Honig, A., and Galili, G.** (2012). Variations on a theme: plant autophagy in comparison to yeast and mammals. *Protoplasma* **249**, 285-299.
- Axe, E.L., Walker, S.A., Manifava, M., Chandra, P., Llewelyn Roderick, H., 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 — JCB. *JCB* **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 Structure and Function* **20**, 465-471.
- Bandmann, V., and Homann, U.** (2012). Clathrin-independent endocytosis contributes to uptake of glucose into BY-2 protoplasts. *The Plant Journal* **70**, 578-584.
- Bassham, D.C., Brandizzi, F., Otegui, M.S., and Sanderfoot, A.A.** (2008). The Secretory System of Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* **65**.
- Bassham, D.C., Laporte, M., Marty, F., Moriyasu, Y., Oshumi, Y., Olsen, L.J., and Yoshimoto, K.** (2006). Autophagy in Development and Stress Responses of Plants. *Autophagy* **2**, 2-11.
- Bernales, S., McDonald, K.L., and Walter, P.** (2006). Autophagy Counterbalances Endoplasmic Reticulum Expansion during the Unfolded Protein Response. *PLoS Biol* **4**, 2311-2324.
- Bethoney, K.A., King, M.C., Hinshaw, J.E., Ostap, E.M., and Lemmon, M.A.** (2009). A possible effector role for the pleckstrin homology (PH) domain of dynamin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 13359-13364.
- Birgisdottir, Å.B., Lamark, T., and Johansen, T.** (2013). The LIR motif – crucial for selective autophagy. *Journal of Cell Science* **126**, 3237-3247.

- Bjørkøy, G., Lamark, T., Brech, A., Outzen, H., Perander, M., Øvervatn, 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. *The Journal of Cell Biology* **171**, 603-614.
- Blommaart, E.F.C., Krause, U., Schellens, J.P.M., Vreeling-Sindelárová, H., and Meijer, A.J.** (1997). The Phosphatidylinositol 3-Kinase Inhibitors Wortmannin and LY294002 Inhibit Autophagy in Isolated Rat Hepatocytes. *European Journal of Biochemistry* **243**, 240-246.
- Boutte, Y., Vernhettes, S., and Satiatjeunemaitre, B.** (2007). Involvement of the cytoskeleton in the secretory pathway and plasma membrane organisation of higher plant cells. *Cell Biology International* **31**, 649-654.
- Bradford, M.M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brandizzi, F., and Barlowe, C.** (2013). Organization of the ER–Golgi interface for membrane traffic control. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **14**, 382-392.
- Brown, S.C., Bolte, S., Gaudin, M., Pereira, C., Marion, J., Soler, M.-N., and Satiat-Jeunemaitre, B.** (2010). Exploring plant endomembrane dynamics using the photoconvertible protein Kaede. *The Plant Journal* **63**, 696-711.
- Campelo, F., and Malhotra, V.** (2012). Membrane Fission: The Biogenesis of Transport Carriers. *Annual Review of Biochemistry* **81**, 407-427.
- Carlton, J.G., Agromayor, M., and Martin-Serrano, J.** (2008). Differential requirements for Alix and ESCRT-III in cytokinesis and HIV-1 release. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 10541-10546.
- Chan, E.Y.W., Longatti, A., McKnight, N.C., and Tooze, S.A.** (2009). Kinase-Inactivated ULK Proteins Inhibit Autophagy via Their Conserved C-Terminal Domains Using an Atg13-Independent Mechanism. *Mol. Cell. Biol.* **29**, 157-171.
- Chen, B.J., and Lamb, R.A.** (2008). Mechanisms for enveloped virus budding: Can some viruses do without an ESCRT? *Virology* **372**, 221-232.
- Chen, J., Doyle, C., Qi, X., and Zheng, H.** (2012). The Endoplasmic Reticulum: A Social Network in Plant Cells. *Journal of Integrative Plant Biology* **54**, 840-850.
- Chernomordik, L., Chanturiya, A., Green, J., and Zimmerberg, J.** (1995). The hemifusion intermediate and its conversion to complete fusion: regulation by membrane composition. *Biophysical Journal* **69**.
- Chernomordik, L.V., and Kozlov, M.M.** (2003). Protein-Lipid Interplay in Fusion and Fission of Biological Membranes *. *Annual Review of Biochemistry* **72**, 175-207.
- Clough, S.J., and Bent, A.F.** (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**, 735-743.
- Contento, A.L., Xiong, Y., and Bassham, D.C.** (2005). Visualization of autophagy in *Arabidopsis* using the fluorescent dye monodansylcadaverine and a GFP-AtATG8e fusion protein. *The Plant Journal* **42**, 598-608.

- Curtis, M.D., and Grossniklaus, U.** (2003). A Gateway Cloning Vector Set for High-Throughput Functional Analysis of Genes in Planta. *Plant Physiology* **133**, 462-469.
- de Duve, C.** (2005). The lysosome turns fifty. *Nat Cell Biol* **7**, 847-849.
- de Duve, C., and Wattiaux, R.** (1966). Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* **28**, 435-492.
- Deprost, D., Yao, L., Sormani, R., Moreau, M., Leterreux, G., Nicolai, M., Bedu, M., Robaglia, C., and Meyer, C.** (2007). The Arabidopsis TOR kinase links plant growth, yield, stress resistance and mRNA translation. *EMBO Rep* **8**, 864-870.
- Devenish, R.J., and Klionsky, D.J.** (2012). Autophagy: mechanism and physiological relevance 'brewed' from yeast studies. *Frontiers in bioscience (Scholar edition)* **4**.
- Dhonukshe, P., Baluška, F., Schlicht, M., Hlavacka, A., Šamaj, J., Friml, J., and Gadella Jr, T.W.J.** (2006). Endocytosis of Cell Surface Material Mediates Cell Plate Formation during Plant Cytokinesis. *Developmental Cell* **10**, 137-150.
- Di Bartolomeo, S., Corazzari, M., Nazio, F., Oliverio, S., Lisi, G., Antonioli, M., Pagliarini, V., Matteoni, S., Fuoco, C., Giunta, L., D'Amelio, M., Nardacci, R., Romagnoli, A., Piacentini, M., Cecconi, F., and Fimia, G.M.** (2010). The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *The Journal of Cell Biology* **191**, 155-168.
- Díaz-Troya, S., Pérez-Pérez, M.E., Florencio, F.J., and Crespo, J.L.** (2008). The role of TOR in autophagy regulation from yeast to plants and mammals. *Autophagy* **4**, 851-865.
- dit Frey, N.F., Muller, P., Jammes, F., Kizis, D., Leung, J., Perrot-Rechenmann, C., and Bianchi, M.W.** (2010). The RNA Binding Protein Tudor-SN Is Essential for Stress Tolerance and Stabilizes Levels of Stress-Responsive mRNAs Encoding Secreted Proteins in Arabidopsis. *The Plant cell* **22**, 1575-1591.
- Doelling, J.H., Walker, J.M., Friedman, E.M., Thompson, A.R., and Vierstra, R.D.** (2002). The APG8/12-activating Enzyme APG7 Is Required for Proper Nutrient Recycling and Senescence in Arabidopsis thaliana. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 33105-33114.
- Dowhan, D.W.** (2013). Functional Roles of Lipids in Membranes. In *Encyclopedia of Biophysics*, G.C.K. Roberts, ed (Springer Berlin Heidelberg), pp. 868-875.
- Drakakaki, G., and Dandekar, A.** (2013). Protein secretion: How many secretory routes does a plant cell have? *Plant Science* **203–204**, 74-78.
- Dunn, W.A., and Cregg, J.M.** (2005). Pexophagy: The Selective Autophagy of Peroxisomes. *Autophagy* **1**, 75-83.
- Dupree, P., and Sherrier, D.J.** (1998). The plant Golgi apparatus. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1404**, 259-270.
- Ezaki, J., Matsumoto, N., Takeda-Ezaki, M., Komatsu, M., Takahashi, K., Hiraoka, Y., Taka, H., Fujimura, T., Takehana, K., Yoshida, M., Iwata, J., Tanida, I., Furuya, N., Zheng, D.-M., Tada, N., Tanaka, K., Kominami, E., and Ueno, T.** (2011). Liver autophagy contributes to the maintenance of blood glucose and amino acid levels. *Autophagy* **7**, 727-736.

- Fabrikant, G., Lata, S., Riches, J.D., Briggs, J.A.G., Weissenhorn, W., and Kozlov, M.M.** (2009). Computational Model of Membrane Fission Catalyzed by ESCRT-III. *PLoS Comput Biol* **5**.
- Fader, C.M., and Colombo, M.I.** (2008). Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell Death Differ* **16**, 70-78.
- Faini, M., Beck, R., Wieland, F.T., and Briggs, J.A.G.** (2013). Vesicle coats: structure, function, and general principles of assembly. *Trends in Cell Biology* **23**, 279-288.
- Fan, W., Nassiri, A., and Zhong, Q.** (2011). Autophagosome targeting and membrane curvature sensing by Barkor/Atg14(L). *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 7769-7774.
- Farge, E., Ojcius, D.M., Subtil, A., and Dautry-Varsat, A.** (1999). Enhancement of endocytosis due to aminophospholipid transport across the plasma membrane of living cells. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **276**, C725-C733.
- Fengsrud, M., Erichsen, E.S., Berg, T.O., Raiborg, C., and Seglen, P.O.** (2000). Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy. *European Journal of Cell Biology* **79**, 871-882.
- Filimonenko, M., Isakson, P., Finley, K.D., Anderson, M., Jeong, H., Melia, T.J., Bartlett, B.J., Myers, K.M., Birkeland, H.C.G., Lamark, T., Krainc, D., Brech, A., Stenmark, H., Simonsen, A., and Yamamoto, A.** (2010). The Selective Macroautophagic Degradation of Aggregated Proteins Requires the PI3P-Binding Protein Alf1. *Molecular Cell* **38**, 265-279.
- Ford, M.G.J., Mills, I.G., Peter, B.J., Vallis, Y., Praefcke, G.J.K., Evans, P.R., and McMahon, H.T.** (2002). Curvature of clathrin-coated pits driven by epsin. *Nature* **419**, 361-366.
- Foresti, O., and Denecke, J.** (2008). Intermediate Organelles of the Plant Secretory Pathway: Identity and Function. *Traffic* **9**, 1599-1612.
- Fotin, A., Cheng, Y., Sliz, P., Grigorieff, N., Harrison, S.C., Kirchhausen, T., and Walz, T.** (2004). Molecular model for a complete clathrin lattice from electron cryomicroscopy. *Nature* **432**, 573-579.
- Frigerio, L., Hinz, G., and Robinson, D.G.** (2008). Multiple Vacuoles in Plant Cells: Rule or Exception? *Traffic* **9**, 1564-1570.
- Frolov, V.A., Shnyrova, A.V., and Zimmerberg, J.** (2011). Lipid Polymorphisms and Membrane Shape. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **3**.
- Fujiki, Y., Yoshimoto, K., and Ohsumi, Y.** (2007). An Arabidopsis Homolog of Yeast ATG6/VPS30 Is Essential for Pollen Germination. *PLANT PHYSIOLOGY* **143**, 1132-1139.
- Fujioka, Y., Noda, N.N., Nakatogawa, H., Ohsumi, Y., and Inagaki, F.** (2010). Dimeric Coiled-coil Structure of *Saccharomyces cerevisiae* Atg16 and Its Functional Significance in Autophagy. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 1508-1515.

- Fujioka, Y., Noda, N.N., Fujii, K., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., and Inagaki, F.** (2008). In Vitro Reconstitution of Plant Atg8 and Atg12 Conjugation Systems Essential for Autophagy. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 1921-1928.
- Fujita, N., Itoh, T., Omori, H., Fukuda, M., Noda, T., and Yoshimori, T.** (2008). The Atg16L Complex Specifies the Site of LC3 Lipidation for Membrane Biogenesis in Autophagy. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 2092-2100.
- Furt, F., Simon-Plas, F., and Mongrand, S.** (2011). Lipids of the Plant Plasma Membrane. In *The Plant Plasma Membrane*, A.S. Murphy, B. Schulz, and W. Peer, eds (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 3-30.
- Geldner, N., Dénervaud-Tendon, V., Hyman, D.L., Mayer, U., Stierhof, Y.-D., and Chory, J.** (2009). Rapid, combinatorial analysis of membrane compartments in intact plants with a multicolor marker set. *The Plant Journal* **59**, 169-178.
- Geng, J., Baba, M., Nair, U., and Klionsky, D.J.** (2008). Quantitative analysis of autophagy-related protein stoichiometry by fluorescence microscopy. *The Journal of Cell Biology* **182**, 129-140.
- Graef, M., Friedman, J.R., Graham, C., Babu, M., and Nunnari, J.** (2013). ER exit sites are physical and functional core autophagosome biogenesis components. *Molecular Biology of the Cell* **24**, 2918-2931.
- Grossmann, G., Guo, W.-J., Ehrhardt, D.W., Frommer, W.B., Sit, R.V., Quake, S.R., and Meier, M.** (2011). The RootChip: an integrated microfluidic chip for plant science. *The Plant cell* **23**, 4234-4240.
- Gu, F., Crump, C.M., and Thomas, G.** (2001). Trans-Golgi network sorting. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* **58**.
- Guiboileau, A., Yoshimoto, K., Soulay, F., Bataillé, M.P., Avice, J.C., and Masclaux-Daubresse, C.** (2012). Autophagy machinery controls nitrogen remobilization at the whole-plant level under both limiting and ample nitrate conditions in Arabidopsis. *New Phytologist*.
- Guiboileau, A., Avila-Ospina, L., Yoshimoto, K., Soulay, F., Azzopardi, M., Marmagne, A., Lothier, J., and Masclaux-Daubresse, C.** (2013). Physiological and metabolic consequences of autophagy deficiency for the management of nitrogen and protein resources in Arabidopsis leaves depending on nitrate availability. *New Phytologist*, n/a-n/a.
- 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.
- Hamasaki, M., Shibutani, S.T., and Yoshimori, T.** (2013a). Up-to-date membrane biogenesis in the autophagosome formation. *Current opinion in cell biology*.
- Hamasaki, M., Furuta, N., Matsuda, A., Nezu, A., Yamamoto, A., Fujita, N., Omori, H., Noda, T., Haraguchi, T., Hiraoka, Y., Amano, A., and Yoshimori, T.** (2013b). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature advance online publication*.

- Hanada, T., Noda, N.N., Satomi, Y., Ichimura, Y., Fujioka, Y., Takao, T., Inagaki, F., and Ohsumi, Y.** (2007). The Atg12-Atg5 Conjugate Has a Novel E3-like Activity for Protein Lipidation in Autophagy. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 37298-37302.
- Hanaoka, H., Noda, T., Shirano, Y., Kato, T., Hayashi, H., Shibata, D., Tabata, S., and Ohsumi, Y.** (2002). Leaf Senescence and Starvation-Induced Chlorosis Are Accelerated by the Disruption of an Arabidopsis Autophagy Gene. *Plant Physiol.* **129**, 1181-1193.
- Hanson, P.I., Roth, R., Lin, Y., and Heuser, J.E.** (2008). Plasma membrane deformation by circular arrays of ESCRT-III protein filaments. *The Journal of Cell Biology* **180**, 389-402.
- 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. *The Journal of Cell Biology* **131**, 591-602.
- Hawes, C., and Satiat-Jeunemaitre, B.** (2005). The plant Golgi apparatus--Going with the flow. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1744**, 93-107.
- Hawes, M.C., and Lin, H.-J.** (1990). Correlation of Pectolytic Enzyme Activity with the Programmed Release of Cells from Root Caps of Pea (*Pisum sativum*). *Plant Physiology* **94**.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Yoshimori, T., and Yamamoto, A.** (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol* **11**, 1433-1437.
- Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N.** (1991). Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* **253**, 905-909.
- Henne, William M., Buchkovich, Nicholas J., and Emr, Scott D.** (2011). The ESCRT Pathway. *Developmental Cell* **21**, 77-91.
- Huang, W.-P., Scott, S.V., Kim, J., and Klionsky, D.J.** (2000). The Itinerary of a Vesicle Component, Aut7p/Cvt5p, Terminates in the Yeast Vacuole via the Autophagy/Cvt Pathways. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 5845-5851.
- Hurley, J.H., Boura, E., Carlson, L.-A., and Rózycki, B.** (2010). Membrane Budding. *Cell* **143**, 875-887.
- 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. *Journal of Biological Chemistry* **283**, 22847-22857.
- Ichimura, Y., Kirisako, T., Takao, T., Satomi, Y., Shimonishi, Y., Ishihara, N., Mizushima, N., Tanida, I., Kominami, E., Ohsumi, M., Noda, T., and Ohsumi, Y.** (2000). A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature* **408**, 488-492.
- Inoue, Y., Suzuki, T., Hattori, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., and Moriyasu, Y.** (2006). AtATG Genes, Homologs of Yeast Autophagy Genes, are Involved in Constitutive Autophagy in Arabidopsis Root Tip Cells. *Plant and Cell Physiology* **47**, 1641-1652.

- Ishida, H., Yoshimoto, K., Izumi, M., Reisen, D., Yano, Y., Makino, A., Ohsumi, Y., Hanson, M.R., and Mae, T.** (2008). Mobilization of Rubisco and Stroma-Localized Fluorescent Proteins of Chloroplasts to the Vacuole by an ATG Gene-Dependent Autophagic Process. *PLANT PHYSIOLOGY* **148**, 142-155.
- Itakura, E., and Mizushima, N.** (2010). Characterization of autophagosome formation site by a hierarchical analysis of mammalian Atg proteins. *Autophagy* **6**, 764-776.
- Iwata, A., Christianson, J.C., Bucci, M., Ellerby, L.M., Nukina, N., Forno, L.S., and Kopito, R.R.** (2005). Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13135-13140.
- Iwata, J.-i., Ezaki, J., Komatsu, M., Yokota, S., Ueno, T., Tanida, I., Chiba, T., Tanaka, K., and Kominami, E.** (2006). Excess Peroxisomes Are Degraded by Autophagic Machinery in Mammals. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 4035-4041.
- Jacobson, K., Sheets, E.D., and Simson, R.** (1995). Revisiting the fluid mosaic model of membranes. *Science* **268**, 1441-1442.
- Jahn, R., and Scheller, R.H.** (2006). SNAREs — engines for membrane fusion. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 631-643.
- Jao, C.C., Ragusa, M.J., Stanley, R.E., and Hurley, J.H.** (2013). A HORMA domain in Atg13 mediates PI 3-kinase recruitment in autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **110**, 5486-5491.
- Jin, A.J., and Nossal, R.** (2000). Rigidity of triskelion arms and clathrin nets. *Biophysical Journal* **78**.
- Johansen, T., and Lamark, T.** (2011). 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. *The Journal of Cell Biology* **143**, 1883-1898.
- Juhasz, G., and Neufeld, T.P.** (2006). Autophagy: A Forty-Year Search for a Missing Membrane Source. *PLoS Biol* **4**.
- Kabeya, Y., Mizushima, N., Yamamoto, A., Oshitani-Okamoto, S., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T.** (2004). LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *Journal of Cell Science* **117**, 2805-2812.
- Kageyama, S., Omori, H., Saitoh, T., Sone, T., Guan, J.-L., Akira, S., Imamoto, F., Noda, T., and Yoshimori, T.** (2011). The LC3 recruitment mechanism is separate from Atg9L1-dependent membrane formation in the autophagic response against Salmonella. *Molecular Biology of the Cell* **22**, 2290-2300.
- Kamada, Y., Funakoshi, T., Shintani, T., Nagano, K., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y.** (2000). Tor-Mediated Induction of Autophagy via an Apg1 Protein Kinase Complex. *The Journal of Cell Biology* **150**, 1507-1513.
- Kanki, T., Wang, K., Cao, Y., Baba, M., and Klionsky, D.J.** (2009). Atg32 Is a Mitochondrial Protein that Confers Selectivity during Mitophagy. *Developmental Cell* **17**, 98-109.

- Kaushik, S., and Cuervo, A.M.** (2012). Chaperone-mediated autophagy: a unique way to enter the lysosome world. *Trends in cell biology* **22**, 407-417.
- Képès, F., Rambourg, A., and Satiat-Jeunemaître, B.** (2004). Morphodynamics of the Secretory Pathway. In *International Review of Cytology* (Academic Press), pp. 55-120.
- Ketelaar, T., Voss, C., Dimmock, S.A., Thumm, M., and Hussey, P.J.** (2004). Arabidopsis homologues of the autophagy protein Atg8 are a novel family of microtubule binding proteins. *FEBS Letters* **567**, 302-306.
- 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. *The Journal of Cell Biology* **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. *The Journal of Cell Biology* **151**, 263-276.
- Kiššová, I.B., Salin, B., Schaeffer, J., Bhatia, S., Camougrand, S.M., and Nadine.** (2007). Selective and Non-Selective Autophagic Degradation of Mitochondria in Yeast. *Autophagy* **3**, 329-336.
- Klionsky, D.J.** (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. *Journal of Cell Science* **118**, 7-18.
- Klionsky, D.J., Cuervo, A.M., Dunn, W.A., Jr, Levine, B., Seglen, I.J.v.d.K., and Per, O.** (2007). How Shall I Eat Thee? *Autophagy* **3**, 413-416.
- Klionsky, D.J., Cregg, J.M., Dunn Jr, W.A., Emr, S.D., Sakai, Y., Sandoval, I.V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., and Ohsumi, Y.** (2003). A Unified Nomenclature for Yeast Autophagy-Related Genes. *Developmental Cell* **5**, 539-545.
- Köchl, R., Hu, X.W., Chan, E.Y.W., and Tooze, S.A.** (2006). Microtubules Facilitate Autophagosome Formation and Fusion of Autophagosomes with Endosomes. *Traffic* **7**, 129-145.
- Konopka, C.A., and Bednarek, S.Y.** (2008). Variable-angle epifluorescence microscopy: a new way to look at protein dynamics in the plant cell cortex. *The Plant Journal* **53**, 186-196.
- Koroleva, O.a., Calder, G., Pendle, A.f., Kim, S.h., Lewandowska, D., Simpson, C.g., Jones, I.m., Brown, J.w.s., and Shaw, P.j.** (2009). Dynamic Behavior of Arabidopsis eIF4A-III, Putative Core Protein of Exon Junction Complex: Fast Relocation to Nucleolus and Splicing Speckles under Hypoxia. *The Plant Cell Online* **21**, 1592-1606.
- Kozlovsky, Y., and Kozlov, M.M.** (2003). Membrane Fission: Model for Intermediate Structures. *Biophysical Journal* **85**, 85-96.
- Kraft, C., Reggiori, F., and Peter, M.** (2009). Selective types of autophagy in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1793**, 1404-1412.

- Kraft, C., Peter, M., and Hofmann, K.** (2010). Selective autophagy: ubiquitin-mediated recognition and beyond. *Nat Cell Biol* **12**, 836-841.
- 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., Kijanska, M., Kalie, E., Siergiejuk, E., Lee, S.S., Semplicio, G., Stoffel, I., Brezovich, A., Verma, M., Hansmann, I., Ammerer, G., Hofmann, K., Tooze, S., and Peter, M.** (2012). Binding of the Atg1/ULK1 kinase to the ubiquitin-like protein Atg8 regulates autophagy. *The EMBO Journal* **31**, 3691-3703.
- Krendel, M., Osterweil, E.K., and Mooseker, M.S.** (2007). Myosin 1E interacts with synaptojanin-1 and dynamin and is involved in endocytosis. *FEBS Letters* **581**, 644-650.
- Krick, R., Muehe, Y., Prick, T., Bremer, S., Schlotterhose, P., Eskelinen, E.L., Millen, J., Goldfarb, D.S., and Thumm, M.** (2008). Piecemeal Microautophagy of the Nucleus Requires the Core Macroautophagy Genes. *Molecular Biology of the Cell* **19**, 4492-4505.
- Kuma, A., Mizushima, N., Ishihara, N., and Ohsumi, Y.** (2002). Formation of the ~350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 Multimeric Complex, Mediated by Apg16 Oligomerization, Is Essential for Autophagy in Yeast. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 18619-18625.
- Kumari, S., Mg, S., and Mayor, S.** (2010). Endocytosis unplugged: multiple ways to enter the cell. *Cell Res* **20**, 256-275.
- Kurihara, Y., Kanki, T., Aoki, Y., Hirota, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T., and Kang, D.** (2012). Mitophagy Plays an Essential Role in Reducing Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species and Mutation of Mitochondrial DNA by Maintaining Mitochondrial Quantity and Quality in Yeast. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 3265-3272.
- Lafontaine, D.L.J.** (2010). A 'garbage can' for ribosomes: how eukaryotes degrade their ribosomes. *Trends in Biochemical Sciences* **35**, 267-277.
- Lai, Z., Wang, F., Zheng, Z., Fan, B., and Chen, Z.** (2011). A critical role of autophagy in plant resistance to necrotrophic fungal pathogens. *The Plant Journal* **66**, 953-968.
- Lang, T., Reiche, S., Straub, M., Bredschneider, M., and Thumm, M.** (2000). Autophagy and the cvt Pathway Both Depend onAUT9. *J. Bacteriol.* **182**, 2125-2133.
- Lata, S., Schoehn, G., Jain, A., Pires, R., Piehler, J., Göttliger, H.G., and Weissenhorn, W.** (2008). Helical Structures of ESCRT-III Are Disassembled by VPS4. *Science* **321**, 1354-1357.
- Lee, G.-J., Sohn, E.J., Lee, M.H., and Hwang, I.** (2004). The Arabidopsis Rab5 Homologs Rha1 and Ara7 Localize to the Prevacuolar Compartment. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1211-1220.
- Lee, Y., Bak, G., Choi, Y., Chuang, W.-I., Cho, H.-T., and Lee, Y.** (2008a). Roles of Phosphatidylinositol 3-Kinase in Root Hair Growth. *Plant Physiology* **147**, 624-635.

- Lee, Y., Kim, E.S., Choi, Y., Hwang, I., Staiger, C.J., and Chung, Y.Y.** (2008b). The Arabidopsis Phosphatidylinositol 3-Kinase Is Important for Pollen Development. *PLANT PHYSIOLOGY* **147**, 1886-1897.
- Lenz, M., Morlot, S., and Roux, A.** (2009). Mechanical requirements for membrane fission: Common facts from various examples. *FEBS Letters* **583**, 3839-3846.
- Leucci, M.R., Sansebastiano, G.-P.D., Gigante, M., Dalessandro, G., and Piro, G.** (2007). Secretion marker proteins and cell-wall polysaccharides move through different secretory pathways. *Planta* **225**, 1001-1017.
- Levanony, H., Rubin, R., Altschuler, Y., and Galili, G.** (1992). Evidence for a novel route of wheat storage proteins to vacuoles. *The Journal of Cell Biology* **119**, 1117-1128.
- Levine, B., and Deretic, V.** (2007). Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* **7**, 767-777.
- Levine, B., Mizushima, N., and Virgin, H.W.** (2011). Autophagy in immunity and inflammation. *Nature* **469**, 323-335.
- Li, F., and Vierstra, R.D.** (2012). Autophagy: a multifaceted intracellular system for bulk and selective recycling. *Trends in Plant Science* **17**, 526-537.
- Li, S.C., and Kane, P.M.** (2009). The yeast lysosome-like vacuole: endpoint and crossroads. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 650-663.
- Li, W.-w., Li, J., and Bao, J.-k.** (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. *Cell. Mol. Life Sci.* **69**, 1125-1136.
- Liu, Y., and Bassham, D.C.** (2010). TOR Is a Negative Regulator of Autophagy in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **5**.
- Liu, Y., Xiong, Y., and Bassham, D.C.** (2009). Autophagy is required for tolerance of drought and salt stress in plants. *Autophagy* **5**, 954-964.
- Liu, Y., Burgos, J.S., Deng, Y., Srivastava, R., Howell, S.H., and Bassham, D.C.** (2012). Degradation of the Endoplasmic Reticulum by Autophagy during Endoplasmic Reticulum Stress in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* **24**, 4635-4651.
- Loewith, R., and Hall, M.N.** (2011). Target of Rapamycin (TOR) in Nutrient Signaling and Growth Control. *Genetics* **189**, 1177-1201.
- Luzio, J.P., Pryor, P.R., and Bright, N.A.** (2007). Lysosomes: fusion and function. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**, 622-632.
- Lynch-Day, M.A., Bhandari, D., Menon, S., Huang, J., Cai, H., Bartholomew, C.R., Brumell, J.H., Ferro-Novick, S., and Klionsky, D.J.** (2010). Trs85 directs a Ypt1 GEF, TRAPPIII, to the phagophore to promote autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 7811-7816.
- Manjithaya, R., Nazarko, T.Y., Farré, J.-C., and Subramani, S.** (2010). Molecular mechanism and physiological role of pexophagy. *FEBS Letters* **584**, 1367-1373.
- Marchbank, K., Waters, S., Roberts, R.G., Solomon, E., and Whitehouse, C.A.** (2012). MAP1B Interaction with the FW Domain of the Autophagic Receptor Nbr1 Facilitates Its Association to the Microtubule Network. *International Journal of Cell Biology* **2012**.

- Mari, M., Griffith, J., Rieter, E., Krishnappa, L., Klionski, D.J., and Reggiori, F.** (2010). An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis — JCB. *JCB* **190**, 1005-1022.
- Marty, F.** (1999). Plant Vacuoles. *The Plant Cell Online* **11**, 587-599.
- Matile, P.** (1975). *The lytic compartment of plant cells.* (Springer-Verlag).
- Matsunaga, K., Morita, E., Saitoh, T., Akira, S., Ktistakis, N.T., Izumi, T., Noda, T., and Yoshimori, T.** (2010). Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *The Journal of Cell Biology* **190**, 511-521.
- Matsunaga, K., Saitoh, T., Tabata, K., Omori, H., Satoh, T., Kurotori, N., Maejima, I., Shirahama-Noda, K., Ichimura, T., Isobe, T., Akira, S., Noda, T., and Yoshimori, T.** (2009). Two Beclin 1-binding proteins, Atg14L and Rubicon, reciprocally regulate autophagy at different stages. *Nat Cell Biol* **11**, 385-396.
- McMahon, H.T., and Gallop, J.L.** (2005). Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. *Nature* **438**, 590-596.
- McMahon, H.T., and Boucrot, E.** (2011). Molecular mechanism and physiological functions of clathrin-mediated endocytosis. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**, 517-533.
- Meer, G.v., and Sprong, H.** (2004). Membrane lipids and vesicular traffic. *Current Opinion in Cell Biology* **16**, 373-378.
- Menand, B., Desnos, T., Nussaume, L., Berger, F., Bouchez, D., Meyer, C., and Robaglia, C.** (2002). Expression and disruption of the Arabidopsis TOR (target of rapamycin) gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **99**, 6422-6427.
- Mijaljica, D., Prescott, M., Devenish, D.J.K., and Rodney, J.** (2007). Autophagy and Vacuole Homeostasis: A Case for Self-Degradation? *Autophagy* **3**, 417-421.
- Mittler, R.** (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* **7**, 405-410.
- Mizushima, N.** (2010). The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation. *Current Opinion in Cell Biology* **22**, 132-139.
- Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y.** (1999). Apg16p is required for the function of the Apg12p–Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway. *The EMBO Journal* **18**, 3888-3896.
- Mizushima, N., Sugita, H., Yoshimori, T., and Ohsumi, Y.** (1998a). A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy. *J. Biol. Chem.* **273**, 33889-33892.
- Mizushima, N., Noda, T., Yoshimori, T., Tanaka, Y., Ishii, T., George, M.D., Klionsky, D.J., Ohsumi, M., and Ohsumi, Y.** (1998b). A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature* **395**, 395-398.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhi, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T.** (2001). Dissection of Autophagosome Formation Using Apg5-Deficient Mouse Embryonic Stem Cells. *The Journal of Cell Biology* **152**, 657-668.

- Mizushima, N., Kuma, A., Kobayashi, Y., Yamamoto, A., Matsubae, M., Takao, T., Natsume, T., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T.** (2003). Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci* **116**, 1679-1688.
- Mollenhauer, H.H., and Morré, D.J.** (1994). Structure of Golgi apparatus. *Protoplasma* **180**, 14-28.
- Moreau, P., Brandizzi, F., Hanton, S., Chatre, L., Melser, S., Hawes, C., and Satiat-Jeunemaitre, B.** (2007). The plant ER–Golgi interface: a highly structured and dynamic membrane complex. *Journal of Experimental Botany* **58**, 49-64.
- Moriyasu, Y., and Ohsumi, Y.** (1996). Autophagy in Tobacco Suspension-Cultured Cells in Response to Sucrose Starvation. *Plant Physiology* **111**, 1233-1241.
- Morlot, S., and Roux, A.** (2013). Mechanics of Dynamin-Mediated Membrane Fission. *Annual Review of Biophysics* **42**, 629-649.
- Müller, O., Sattler, T., Flötenmeyer, M., Schwarz, H., Plattner, H., and Mayer, A.** (2000). Autophagic Tubes Vacuolar Invaginations Involved in Lateral Membrane Sorting and Inverse Vesicle Budding. *The Journal of Cell Biology* **151**, 519-528.
- Nair, U., Jotwani, A., Geng, J., Gammoh, N., Richerson, D., Yen, W.-L., Griffith, J., Nag, S., Wang, K., Moss, T., Baba, M., McNew, J.A., Jiang, X., Reggiori, F., Melia, T.J., and Klionsky, D.J.** (2011). SNARE Proteins Are Required for Macroautophagy. *Cell* **146**, 290-302.
- 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., Ishii, J., Asai, E., and Ohsumi, Y.** (2012). Atg4 recycles inappropriately lipidated Atg8 to promote autophagosome biogenesis. *Autophagy* **8**, 177-186.
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., and Youle, R.J.** (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *The Journal of Cell Biology* **183**, 795-803.
- Nebenführ, A., and Staehelin, L.A.** (2001). Mobile factories: Golgi dynamics in plant cells. *Trends in Plant Science* **6**, 160-167.
- Nickel, W.** (2010). Pathways of unconventional protein secretion. *Current Opinion in Biotechnology* **21**, 621-626.
- Nixon, R.A.** (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nat Med* **19**, 983-997.
- 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.
- Nossal, R.** (2001). Energetics of Clathrin Basket Assembly. *Traffic* **2**, 138-147.
- Novak, I., Kirkin, V., McEwan, D.G., Zhang, J., Wild, P., Rozenknop, A., Rogov, V., Löhr, F., Popovic, D., Occhipinti, A., Reichert, A.S., Terzic, J., Dötsch, V., Ney, P.A., and Dikic, I.** (2010). Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* **11**, 45-51.

- Obara, K., and Ohsumi, Y.** (2011). Atg14: A Key Player in Orchestrating Autophagy. *International Journal of Cell Biology* **2011**, 1-7.
- Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Kobayashi, T., Mimuro, H., Fukumatsu, M., Kiga, K., Piao, Z., Ashida, H., Yoshida, M., Kakuta, S., Koyama, T., Goto, Y., Nagatake, T., Nagai, S., Kiyono, H., Kawalec, M., Reichhart, J.-M., and Sasakawa, C.** (2011). A Tecpr1-Dependent Selective Autophagy Pathway Targets Bacterial Pathogens. *Cell Host & Microbe* **9**, 376-389.
- Onodera, J., and Ohsumi, Y.** (2005). Autophagy Is Required for Maintenance of Amino Acid Levels and Protein Synthesis under Nitrogen Starvation. *Journal of Biological Chemistry* **280**, 31582-31586.
- Orsi, A., Razi, M., Dooley, H.C., Robinson, D., Weston, A.E., Collinson, L.M., and Tooze, S.A.** (2012). Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Molecular Biology of the Cell* **23**, 1860-1873.
- Øverbye, A., Seglen, M.F.B., and Per, O.** (2007). Proteomic Analysis of Membrane-Associated Proteins from Rat Liver Autophagosomes. *Autophagy* **3**, 300-322.
- Paris, N., Stanley, C.M., Jones, R.L., and Rogers, J.C.** (1996). Plant Cells Contain Two Functionally Distinct Vacuolar Compartments. *Cell* **85**, 563-572.
- Paul, M.J., and Frigerio, L.** (2007). Coated vesicles in plant cells. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **18**, 471-478.
- Peter, B.J., Kent, H.M., Mills, I.G., Vallis, Y., Butler, P.J.G., Evans, P.R., and McMahon, H.T.** (2004). BAR Domains as Sensors of Membrane Curvature: The Amphiphysin BAR Structure. *Science* **303**, 495-499.
- Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., and Ferrin, T.E.** (2004). UCSF Chimera—A visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry* **25**, 1605-1612.
- Phillips, A.R., Suttangkakul, A., and Vierstra, R.D.** (2008). The ATG12-Conjugating Enzyme ATG10 Is Essential for Autophagic Vesicle Formation in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **178**, 1339-1353.
- Pickart, C.M.** (2001). Mechanisms Underlying Ubiquitination. *Annual Review of Biochemistry* **70**, 503-533.
- Pinheiro, H., Samalova, M., Geldner, N., Chory, J., Martinez, A., and Moore, I.** (2009). Genetic evidence that the higher plant Rab-D1 and Rab-D2 GTPases exhibit distinct but overlapping interactions in the early secretory pathway. *Journal of Cell Science* **122**, 3749-3758.
- Pomorski, T., Hrafnsdóttir, S., Devaux, P.F., and van Meer, G.** (2001). Lipid distribution and transport across cellular membranes. *Seminars in cell & developmental biology* **12**, 139-148.
- Priault, M., Salin, B., Schaeffer, J., Vallette, F.M., di Rago, J.P., and Martinou, J.C.** (2005). Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell Death Differ* **12**, 1613-1621.

- Qualmann, B., Koch, D., and Kessels, M.M.** (2011). Let's go bananas: revisiting the endocytic BAR code. *The EMBO Journal* **30**, 3501-3515.
- Ragusa, Michael J., Stanley, Robin E., and Hurley, James H.** (2012). Architecture of the Atg17 Complex as a Scaffold for Autophagosome Biogenesis. *Cell* **151**, 1501-1512.
- Ramachandran, R.** (2011). Vesicle scission: Dynamin. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **22**, 10-17.
- Ravikumar, B., Moreau, K., Jahreiss, L., Puri, C., and Rubinsztein, D.C.** (2010). Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol* **12**, 747-757.
- Reggiori, F., Tucker, K.A., Stromhaug, P.E., and Klionsky, D.J.** (2004). The Atg1-Atg13 Complex Regulates Atg9 and Atg23 Retrieval Transport from the Pre-Autophagosomal Structure. *Developmental Cell* **6**, 79-90.
- Reggiori, F., Monastyrska, I., Shintani, T., and Klionsky, D.J.** (2005a). The Actin Cytoskeleton Is Required for Selective Types of Autophagy, but Not Nonspecific Autophagy, in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell* **16**, 5843-5856.
- Reggiori, F., Shintani, T., Chong, H., Nair, U., and Klionski, D.J.** (2005b). Atg9 Cycles Between Mitochondria and the Pre-Autophagosomal Structure in Yeasts. *Autophagy* **1**, 101-109.
- Robinson, D.G.** (2006). *The Plant Endoplasmic Reticulum*. (Springer).
- Romanov, J., Walczak, M., Ibiricu, I., Schüchner, S., Ogris, E., Kraft, C., and Martens, S.** (2012). Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *The EMBO Journal*.
- Roux, A., and Antonny, B.** (2008). The Long and Short of Membrane Fission. *Cell* **135**, 1163-1165.
- Rubinsztein, David C., Shpilka, T., and Elazar, Z.** (2012). Mechanisms of Autophagosome Biogenesis. *Current Biology* **22**, R29-R34.
- Rusten, T.E., and Stenmark, H.** (2009). How do ESCRT proteins control autophagy? *J Cell Sci* **122**, 2179-2183.
- Saito, C., Ueda, T., Abe, H., Wada, Y., Kuroiwa, T., Hisada, A., Furuya, M., and Nakano, A.** (2002). A complex and mobile structure forms a distinct subregion within the continuous vacuolar membrane in young cotyledons of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **29**, 245-255.
- Sakoh-Nakatogawa, M., Matoba, K., Asai, E., Kirisako, H., Ishii, J., Noda, N.N., Inagaki, F., Nakatogawa, H., and Ohsumi, Y.** (2013). Atg12-Atg5 conjugate enhances E2 activity of Atg3 by rearranging its catalytic site. *Nat. Struct. Mol. Biol.*
- Sanderfoot, A.** (2007). Increases in the Number of SNARE Genes Parallels the Rise of Multicellularity among the Green Plants. *Plant Physiology* **144**, 6-17.
- Sattler, T., and Mayer, A.** (2000). Cell-Free Reconstitution of Microautophagic Vacuole Invagination and Vesicle Formation. *The Journal of Cell Biology* **151**.

- Schreiber, A., and Peter, M.** (2013). Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin–proteasome system. *Biochim. Biophys. Acta*.
- Seaman, M.N.J.** (2012). The retromer complex – endosomal protein recycling and beyond. *Journal of Cell Science* **125**, 4693-4702.
- Sekito, T., Kawamata, T., Ichikawa, R., Suzuki, K., and Ohsumi, Y.** (2009). Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal structure. *Genes to Cells* **14**, 525-538.
- Sheetz, M.P., and Singer, S.J.** (1974). Biological Membranes as Bilayer Couples. A Molecular Mechanism of Drug-Erythrocyte Interactions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **71**, 4457-4461.
- Shen, H., Pirruccello, M., and De Camilli, P.** (2012). SnapShot: Membrane Curvature Sensors and Generators. *Cell* **150**, 1300-1300.e1302.
- Shimmen, T.** (2007). The sliding theory of cytoplasmic streaming: fifty years of progress. *J. Plant Res.* **120**, 31-43.
- Shishkova, S., and Dubrovsky, J.G.** (2005). Developmental programmed cell death in primary roots of Sonoran Desert Cactaceae. *Am. J. Bot.* **92**, 1590-1594.
- Shpilka, T., Weidberg, H., Pietrokovski, S., and Elazar, Z.** (2011). Atg8: an autophagy-related ubiquitin-like protein family. *Genome Biology* **12**.
- Simons, K., and Toomre, D.** (2000). Lipid rafts and signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **1**, 31-39.
- Singer, S.J., and Nicolson, G.L.** (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**, 720-731.
- Sláviková, S., Shy, G., Yao, Y., Glozman, R., Levanony, H., Pietrokovski, S., Elazar, Z., and Galili, G.** (2005). The autophagy-associated Atg8 gene family operates both under favourable growth conditions and under starvation stresses in Arabidopsis plants. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2839-2849.
- Sormani, R., Yao, L., Menand, B., Ennar, N., Lecampion, C., Meyer, C., and Robaglia, C.** (2007). *Saccharomyces cerevisiae* FKBP12 binds Arabidopsis thaliana TOR and its expression in plants leads to rapamycin susceptibility. *BMC Plant Biology* **7**.
- Sparkes, I., Runions, J., Hawes, C., and Griffing, L.** (2009). Movement and Remodeling of the Endoplasmic Reticulum in Nondividing Cells of Tobacco Leaves. *The Plant Cell Online* **21**, 3937-3949.
- Spudich, G., Chibalina, M.V., Au, J.S.-Y., Arden, S.D., Buss, F., and Kendrick-Jones, J.** (2007). Myosin VI targeting to clathrin-coated structures and dimerization is mediated by binding to Disabled-2 and PtdIns(4,5)P₂. *Nat Cell Biol* **9**, 176-183.
- Staehelin, L.A.** (1997). The plant ER: a dynamic organelle composed of a large number of discrete functional domains. *The Plant Journal* **11**, 1151-1165.
- Staehelin, L.A., and Moore, I.** (1995). The Plant Golgi Apparatus: Structure, Functional Organization and Trafficking Mechanisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **46**, 261-288.

- Staelin, L.A., and Kang, B.-H.** (2008). Nanoscale Architecture of Endoplasmic Reticulum Export Sites and of Golgi Membranes as Determined by Electron Tomography. *Plant Physiology* **147**, 1454-1468.
- Stanley, R.E., Ragusa, M.J., and Hurley, J.H.** (2013). The beginning of the end: how scaffolds nucleate autophagosome biogenesis. *Trends in Cell Biology*.
- Südhof, T.C.** (2007). Membrane fusion as a team effort. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 13541-13542.
- Südhof, T.C., and Rothman, J.E.** (2009). Membrane Fusion: Grappling with SNARE and SM Proteins. *Science* **323**, 474-477.
- Suetsugu, S.** (2010). The proposed functions of membrane curvatures mediated by the BAR domain superfamily proteins. *J Biochem* **148**, 1-12.
- Suttangkakul, A., Li, F., Chung, T., and Vierstra, R.D.** (2011). The ATG1/ATG13 Protein Kinase Complex Is Both a Regulator and a Target of Autophagic Recycling in Arabidopsis. *The Plant Cell*.
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., and Ohsumi, Y.** (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *The EMBO Journal* **20**, 5971-5981.
- Suzuki, S.W., Onodera, J., and Ohsumi, Y.** (2011). Starvation Induced Cell Death in Autophagy-Defective Yeast Mutants Is Caused by Mitochondria Dysfunction. *PLoS ONE* **6**.
- Svenning, S., Lamark, T., Krause, K., and Johansen, T.** (2011). Plant NBR1 is a selective autophagy substrate and a functional hybrid of the mammalian autophagic adapters NBR1 and p62/SQSTM1. *Autophagy* **7**, 993-1010.
- Sweitzer, S.M., and Hinshaw, J.E.** (1998). Dynamin Undergoes a GTP-Dependent Conformational Change Causing Vesiculation. *Cell* **93**, 1021-1029.
- Takatsuka, C., Inoue, Y., Matsuoka, K., and Moriyasu, Y.** (2004). 3-Methyladenine Inhibits Autophagy in Tobacco Culture Cells under Sucrose Starvation Conditions. *Plant and Cell Physiology* **45**, 265-274.
- Takei, K., McPherson*, P.S., Schmid, S.L., and Camilli, P.D.** (1995). Tubular membrane invaginations coated by dynamin rings are induced by GTP- γ S in nerve terminals. *Nature* **374**, 186-190.
- 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. *The Journal of Cell Biology* **119**, 301-311.
- Talbot, N.J., and Kershaw, M.J.** (2009). The emerging role of autophagy in plant pathogen attack and host defence. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 444-450.
- Tanaka, H., Kitakura, S., Rakusová, H., Uemura, T., Feraru, M.I., De Rycke, R., Robert, S., Kakimoto, T., and Friml, J.** (2013). Cell Polarity and Patterning by PIN Trafficking through Early Endosomal Compartments in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet* **9**.

- Tang, B.L., Wang, Y., Ong, Y.S., and Hong, W.** (2005). COPII and exit from the endoplasmic reticulum. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* **1744**, 293-303.
- Tanida, I.** (2011). Autophagy basics. *Microbiology and Immunology* **55**, 1-11.
- Teis, D., Saksena, S., and Emr, S.D.** (2009). SnapShot: The ESCRT Machinery. *Cell* **137**, 182-182.e181.
- Thompson, A.R., Doelling, J.H., Suttangkakul, A., and Vierstra, R.D.** (2005). Autophagic Nutrient Recycling in Arabidopsis Directed by the ATG8 and ATG12 Conjugation Pathways. *Plant Physiology* **138**, 2097-2110.
- 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 Letters* **349**, 275-280.
- Tokuyasu, K.T.** (1973). A Technique for Ultracryotomy of Cell Suspensions and Tissues. *The Journal of Cell Biology* **57**, 551-565.
- Tolley, N., Sparkes, I.A., Hunter, P.R., Craddock, C.P., Nuttall, J., Roberts, L.M., Hawes, C., Pedrazzini, E., and Frigerio, L.** (2008). Overexpression of a Plant Reticulon Remodels the Lumen of the Cortical Endoplasmic Reticulum but Does not Perturb Protein Transport. *Traffic* **9**, 94-102.
- Tsukada, M., and Ohsumi, Y.** (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters* **333**, 169-174.
- Tung, Y.-T., Hsu, W.-M., Lee, H., Huang, W.-P., and Liao, Y.-F.** (2010). The Evolutionarily Conserved Interaction Between LC3 and p62 Selectively Mediates Autophagy-Dependent Degradation of Mutant Huntingtin. *Cell Mol Neurobiol* **30**, 795-806.
- Ueda, H., Yokota, E., Kutsuna, N., Shimada, T., Tamura, K., Shimmen, T., Hasezawa, S., Dolja, V.V., and Hara-Nishimura, I.** (2010). Myosin-dependent endoplasmic reticulum motility and F-actin organization in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 6894-6899.
- Uemura, T., Ueda, T., Ohniwa, R.L., Nakano, A., Takeyasu, K., and Sato, M.H.** (2004). Systematic analysis of SNARE molecules in Arabidopsis: dissection of the post-Golgi network in plant cells. *Cell Structure and Function* **29**, 49-65.
- Ungewickell, E.J., and Hinrichsen, L.** (2007). Endocytosis: clathrin-mediated membrane budding. *Current Opinion in Cell Biology* **19**, 417-425.
- Vanhaesebroeck, B., Guillermet-Guibert, J., Graupera, M., and Bilanges, B.** (2010). The emerging mechanisms of isoform-specific PI3K signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **11**, 329-341.
- Vernoud, V., Horton, A.C., Yang, Z., and Nielsen, E.** (2003). Analysis of the Small GTPase Gene Superfamily of Arabidopsis. *Plant Physiology* **131**, 1191-1208.
- Viotti, C., Krüger, F., Krebs, M., Neubert, C., Fink, F., Lupanga, U., Scheuring, D., Boutté, Y., Frescatada-Rosa, M., Wolfenstetter, S., Sauer, N., Hillmer, S., Grebe, M., and Schumacher, K.** (2013). The Endoplasmic Reticulum Is the Main Membrane Source for Biogenesis of the Lytic Vacuole in Arabidopsis. *The Plant Cell Online*.

- Voeltz, G.K., Prinz, W.A., Shibata, Y., Rist, J.M., and Rapoport, T.A.** (2006). A Class of Membrane Proteins Shaping the Tubular Endoplasmic Reticulum. *Cell* **124**, 573-586.
- Wada, Y.** (2013). Vacuoles in mammals: A subcellular structure indispensable for early embryogenesis. *BioArchitecture* **3**, 13-19.
- Wang, J., Ding, Y., Wang, J., Hillmer, S., Miao, Y., Lo, S.W., Wang, X., Robinson, D.G., and Jiang, L.** (2010). EXPO, an Exocyst-Positive Organelle Distinct from Multivesicular Endosomes and Autophagosomes, Mediates Cytosol to Cell Wall Exocytosis in Arabidopsis and Tobacco Cells. *The Plant Cell Online* **22**, 4009-4030.
- Weidberg, H., Shvets, E., Shpilka, T., Shimron, F., Shinder, V., and Elazar, Z.** (2010). LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO Journal* **29**, 1792-1802.
- Weidberg, H., Shpilka, T., Shvets, E., Abada, A., Shimron, F., and Elazar, Z.** (2011). LC3 and GATE-16 N Termini Mediate Membrane Fusion Processes Required for Autophagosome Biogenesis. *Developmental Cell* **20**, 444-454.
- Wollert, T., and Hurley, J.H.** (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature* **464**, 864-869.
- Wong, E., and Cuervo, A.M.** (2010). Integration of Clearance Mechanisms: The Proteasome and Autophagy. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**.
- Wong, P.-M., Puente, C., Ganley, I.G., and Jiang, X.** (2013). The ULK1 complex: Sensing nutrient signals for autophagy activation. *Autophagy* **9**, 124-137.
- Wu, Y.-T., Tan, H.-L., Shui, G., Bauvy, C., Huang, Q., Wenk, M.R., Ong, C.-N., Codogno, P., and Shen, H.-M.** (2010). Dual Role of 3-Methyladenine in Modulation of Autophagy via Different Temporal Patterns of Inhibition on Class I and III Phosphoinositide 3-Kinase. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 10850-10861.
- Wullschlegel, S., Loewith, R., and Hall, M.N.** (2006). TOR Signaling in Growth and Metabolism. *Cell* **124**, 471-484.
- Xie, Z., and Klionsky, D.J.** (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol* **9**, 1102-1109.
- Xie, Z., Nair, U., and Klionsky, D.J.** (2008). Atg8 Controls Phagophore Expansion during Autophagosome Formation. *Mol. Biol. Cell* **19**, 3290-3298.
- Xiong, Y., Contento, A.L., Nguyen, P.Q., and Bassham, D.C.** (2007). Degradation of Oxidized Proteins by Autophagy during Oxidative Stress in Arabidopsis. *Plant Physiol.* **143**, 291-299.
- Yamada, K., Fuji, K., Shimada, T., Nishimura, M., and Hara-Nishimura, I.** (2005). Endosomal proteases facilitate the fusion of endosomes with vacuoles at the final step of the endocytotic pathway. *The Plant Journal* **41**, 888-898.
- Yamamoto, A., Masaki, R., Fukui, Y., and Tashiro, Y.** (1990). Absence of cytochrome P-450 and presence of autolysosomal membrane antigens on the isolation membranes and autophagosomal membranes in rat hepatocytes. *J. Histochem. Cytochem.* **38**, 1571-1581.

- Yamamoto, H., Kakuta, S., Watanabe, T.M., Kitamura, A., Sekito, T., Kondo-Kakuta, C., Ichikawa, R., Kinjo, M., and Ohsumi, Y.** (2012). Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *The Journal of Cell Biology* **198**, 219-233.
- Yano, K., Takao, S., and Yuji, M.** (2007). Constitutive Autophagy in Plant Root Cells. *Autophagy* **3**, 360-362.
- Ylä-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., and Eskelinen, E.-L.** (2009). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy* **5**, 1180-1185.
- Yoshimoto, K.** (2012). Beginning to Understand Autophagy, an Intracellular Self-Degradation System in Plants. *Plant and Cell Physiology* **53**, 1355-1365.
- Yoshimoto, K., Hanaoka, H., Sato, S., Kato, T., Tabata, S., Noda, T., and Ohsumi, Y.** (2004). Processing of ATG8s, Ubiquitin-Like Proteins, and Their Deconjugation by ATG4s Are Essential for Plant Autophagy. *Plant Cell* **16**, 2967-2983.
- Yoshimoto, K., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Kusano, M., Consonni, C., Panstruga, R., Ohsumi, Y., and Shirasu, K.** (2009). Autophagy negatively regulates cell death by controlling NPR1-dependent salicylic acid signaling during senescence and the innate immune response in Arabidopsis. *The Plant Cell* **21**, 2914-2927.
- Young, A.R.J., Chan, E.Y.W., Hu, X.W., Kochl, R., Crawshaw, S.G., High, S., Hailey, D.W., Lippincott-Schwartz, J., and Tooze, S.A.** (2006). Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci* **119**, 3888-3900.
- Zhang, H., Zhang, L., Gao, B., Fan, H., Jin, J., Botella, M.A., Jiang, L., and Lin, J.** (2011). Golgi Apparatus-Localized Synaptotagmin 2 Is Required for Unconventional Secretion in Arabidopsis. *PLoS ONE* **6**.
- Zhao, H., Pykäläinen, A., and Lappalainen, P.** (2011). I-BAR domain proteins: linking actin and plasma membrane dynamics. *Current Opinion in Cell Biology* **23**, 14-21.
- Zhou, J., Wang, J., Cheng, Y., Chi, Y.-J., Fan, B., Yu, J.-Q., and Chen, Z.** (2013). NBR1-Mediated Selective Autophagy Targets Insoluble Ubiquitinated Protein Aggregates in Plant Stress Responses. *PLoS Genet* **9**.
- Zimmerberg, J., and McLaughlin, S.** (2004). Membrane Curvature: How BAR Domains Bend Bilayers. *Current Biology* **14**, R250-R252.
- Zimmerberg, J., and Kozlov, M.M.** (2006). How proteins produce cellular membrane curvature. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **7**, 9-19.
- Zurek, N., Sparks, L., and Voeltz, G.** (2011). Reticulon Short Hairpin Transmembrane Domains Are Used to Shape ER Tubules. *Traffic* **12**, 28-41.

Résumé

L'autophagie est un processus permettant la dégradation de constituants cytosoliques dans un compartiment lytique, par leur séquestration au sein d'une vésicule à double membrane : l'autophagosome. L'autophagie est, avec la voie ubiquitine-protéasome, l'une des deux grandes voies de dégradation présente de manière fortement conservée chez les cellules eucaryotes. Présente à un niveau basal, elle peut être stimulée afin de permettre la remobilisation de ressources cellulaires, ou d'assurer des fonctions cytoprotectrices et de détoxification. La formation d'autophagosomes traduit alors la capacité du système endomembranaire à s'adapter aux besoins cellulaires. Cependant, la mécanique membranaire et moléculaire de ce phénomène reste mal comprise. L'objectif de ce travail de thèse était de mieux comprendre la formation de ce compartiment dans la cellule végétale. Pour cela, nous avons tout d'abord mis au point les conditions propices à l'étude de l'autophagie dans la racine d'*Arabidopsis thaliana*, puis nous avons entrepris l'identification de marqueurs des étapes de formation de l'autophagosome. L'étude par imagerie en temps réel et 3D de la protéine ATG5, impliquée dans l'expansion membranaire, nous a permis de mettre en évidence son recrutement transitoire sur un domaine particulier de l'autophagosome en formation, son ouverture. De plus, l'étude de différents acteurs du système endomembranaire, nous a permis de mettre en évidence et de caractériser l'implication du réticulum endoplasmique et de ATG9, pour aboutir à un modèle de la formation de l'autophagosome chez les plantes.

Summary

Autophagy is a catabolic process targeting cytosolic compounds to the lytic compartment after sequestration within a double membrane bound vesicle: the autophagosome. Along with the ubiquitin-proteasome pathway, autophagy is one of the main catabolic processes conserved among eukaryotic cells. Present at a basal level, it can be stimulated to allow: remobilization of cell resources, cytoprotective functions, and detoxification. Autophagosome formation demonstrates the capacity of the endomembrane system to adapt dynamically to the cell's environment. However, the membranar and molecular processes involved are still poorly understood. This work aimed to advance understanding of autophagosome formation in plant cells. First of all, we set up suitable conditions for the study of autophagy in the *Arabidopsis* root, then we identified markers of the autophagosome formation steps. Live and 3D imaging of the ATG5 protein, involved in membrane expansion, demonstrated its transient recruitment to a specific domain of the forming autophagosome, its aperture. Furthermore, studying different actors of the endomembrane system has allowed us to implicate the endoplasmic reticulum and ATG9, and to establish a model for autophagosome formation in plants.