

Rôle des protéines SNARE au niveau de la vacuole bactérienne durant les phases précoces de l'infection par Yersinia pseudotuberculosis dans un contexte d'autophagie

Laure-Anne Ligeon

▶ **To cite this version:**

Laure-Anne Ligeon. Rôle des protéines SNARE au niveau de la vacuole bactérienne durant les phases précoces de l'infection par Yersinia pseudotuberculosis dans un contexte d'autophagie. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2013. Français. NNT : 2013LIL2S043 . tel-01252226v2

HAL Id: tel-01252226

https://theses.hal.science/tel-01252226v2

Submitted on 8 Jan 2016

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 DROIT ET SANTE – LILLE 2

Ecole Doctorale Biologie Santé

Année 2013

THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LILLE 2

Spécialité : Biologie cellulaire

Présentée et soutenue publiquement le 3 décembre 2013 par

Laure-Anne LIGEON

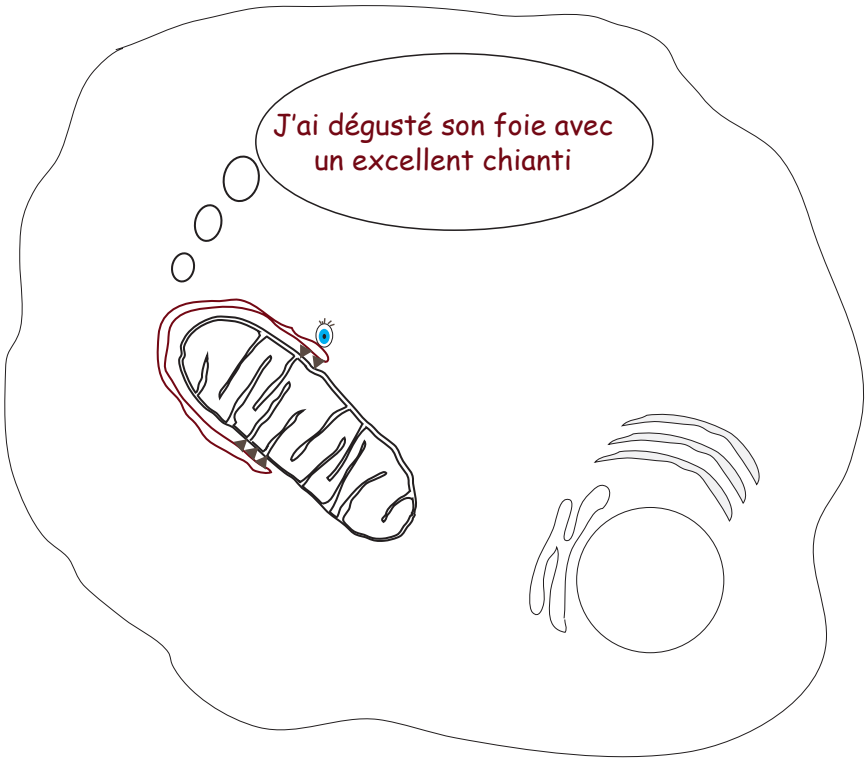
Rôle des protéines SNARE au niveau de la vacuole bactérienne durant les phases précoces de l'infection par *Yersinia pseudotuberculosis* dans un contexte d'autophagie

Devant le jury :

M le Professeur	Michel Simonet	Président
Mme le Docteur	Isabelle Vergne	Rapporteur
M le Professeur	Mathias Faure	Rapporteur
M le Docteur	Thierry Galli	Examinateur
M le Docteur	Patrice Codogno	Examinateur
M le Docteur	Frank Lafont	Directeur de thèse

Laboratoire de Microbiologie Cellulaire et Pathogénie Infectieuse – CNRS UMR 8161 Institut Pasteur de Lille – 1, rue du Professeur Calmette 59000 LILLE Adresse électronique du laboratoire : http://www.cmip.cnrs.fr/

Autophagie : se manger soi-même



Hannibal lecteur, *Le silence des agneaux*

Remerciements

Cette étude a été financé par la Région Nord-Pas de Calais et le Centre National de la Recherche Scientifique.

J'adresse mes sincères remerciements aux différents membres du jury : Monsieur le Professeur M. Simonet pour avoir accepté la présidence, Madame le Docteur I. Vergne et Monsieur le Professeur M. Faure pour avoir accepté d'être rapporteurs de ce travail, Monsieur le Docteur P. Codogno et Monsieur le Docteur T. Gally pour me faire l'honneur d'être examinateur de ce travail.

Je remercie également Monsieur le Professeur M. Simonet et Monsieur le Docteur P. Codogno pour avoir accepté de faire partie de mon jury de comité de suivi thèse et merci pour vos précieux conseils procurés au cours de ces trois CST.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Docteur Frank Lafont, pour m'avoir initié aux mystères de l'autophagie et m'avoir fait découvrir le trafic membranaire et apprécier leur subtilité. J'ai énormément appris à vos côtés ! Merci de m'avoir transmis votre passion pour la recherche. Je vous remercie de la confiance que vous m'avez accordée durant ces trois années.

Une thèse est un travail personnel mais qui n'aurait jamais été possible sans l'aide et le soutien du laboratoire de Microbiologie Cellulaire et Pathogénie Infectieuse (MCPI) et de la plateforme BioImaging Center Lille-Nord de France, dirigés par le Docteur Frank Lafont. Je tiens à remercier l'ensemble des membres de l'équipe qui ont contribué à la bonne ambiance qui y règne. Je remercierai d'abord les trois « filles » du labo, Jöelle pour sa gentillesse et pour le passage des cellules qui m'ont été bien utiles durant ces trois années. Merci à Elisabeth pour ta bonne humeur et surtout pour tes macros ImageJ. Je tiens à remercier Delphine, pour la patience dont tu as fait preuve d'une part lors de la quantification du recrutement des protéines, Merci, et d'autre part pour la chasse aux fautes d'orthographe ! J'en arrive aux « Gars ». Tout d'abord Merci à vous de m'avoir donné les *iConnaissances* essentielles pour survivre 24h dans le labo. Je remercie Nicolas pour ta patience avec mes échantillons et ton expertise en microscopie électronique. Je remercie Les « *Afmistes »* : les petits nouveaux Vincent et Simone. Sébastien pour ta bonne humeur et ta gentillesse, Yann pour tes précieux conseils et ton aide tout au long de ces trois ans. J'en arrive à mon acolyte de thèse Michka avec qui j'ai partagé les manips réussies et ratées, pour lesquelles nous avons souvent incriminé Murphy ! Merci pour tes nombreuses blagues plus douteuses les unes que les autres. Je te souhaite bonne chance et bon courage pour la suite.
Je remercie le plateau de cytométrie et de microscopie photonique : Emeric et Gaspard pour votre disponibilité et vos conseils dans vos domaines d'expertise. J'en arrive à Antonino, que dire sinon l'essentiel : Merci pour ton amitié, ton soutien et pour m'avoir enseigné l'alignement au pixel près. Je te souhaite plein de bonnes choses pour ton avenir. Je vous remercie tous de la patience dont vous avez fait preuve envers moi lors de mes nombreux problèmes informatiques, d'imprimantes, ainsi que pour votre bonne humeur et pour votre joie de vivre qui ont rendu cette thèse agréable.

Je remercie l'équipe d'à coté, les CGIM, qui ont contribué par leur présence et leur soutien aux bons moments passés durant cette thèse. Je remercie Priscille, Nathalie, Valérie, Maria, Ok-Ruyl, Romain, Samuel, Vincent pour leurs encouragements, leur soutien et les apéros partagés à la sortie du labo. Je tiens à remercier plus particulièrement Raffaella : Merci pour ta joie de vivre, ton amitié et tous ces « *Crazy Saturday Night »...* J'en arrive à mon ami Christophe : Alors là, je pourrais en écrire des pages… donc je te dis juste Merci pour tout !

Je remercie également toutes les personnes du bâtiment qui m'ont aidée au cours de ces trois années de près ou de loin, et auxquelles j'ai pu demander des conseils et/ou des réactifs.

Je tiens à remercier tout particulièrement mes amis d'Angers, Longué, Lille et Tours qui m'ont toujours soutenue, encouragée, supportée pendant ces trois années (voire même depuis plus longtemps….). Merci à Anaïs Rieux pour ces 1095 h (enfin sans compter les sms) passées au téléphone, au cours desquelles tu m'as si souvent remonté le moral, et pour ta présence sans faille à des moments où j'en avais le plus besoin ! Un Grand Merci à mes deux amies de longue date Caroline et Sophie pour votre amitié qui dure depuis le Lycée !

J'en arrive à ma famille : Merci pour votre soutien et vos encouragements. Mes remerciements les plus profonds vont à *La familly :* Merci à mes parents d'avoir été et d'être toujours là pour moi, Merci pour votre soutien, et pour tout ce que vous m'avez apporté et dont vous n'avez que très peu conscience.
Merci à mes frères et sœur : Nicolas, Gerald et Sophie pour tout ce que vous avez fait pour votre petite sœur, j'en serai toujours reconnaissante ! Merci pour votre présence et de m'avoir supportée (ce qui ne fut pas une mince affaire) tout au long de ces années d'études et même si je vous ai délaissés au profit du labo. Merci. Enfin, *La familly Ligeon* ne serait pas ce qu'elle est sans les valeurs ajoutées : Patricia, Sara et Julien : Merci pour tous les bons moments passés en votre compagnie durant les week-ends en famille.

Mes derniers remerciements vont à Nathaël, Soïa, Auxanne, Côme et Isis pour leur amour d'enfant qui m'a si souvent remonté le moral ! Merci pour vos dessins et autres créations !

Table des matières

RÉSUMÉ 11

SUMMARY 12

TABLE DES ILLUSTRATIONS ET ABRÉVIATIONS 13

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE 19

Chapitre I : *Les Yersiniae* 21

I. Les Yersiniae pathogènes 21

I.1. *Yersinia enterocolitica* 21

I.2. *Yersinia pestis* 22

I.3. *Yersinia pseudotuberculosis* 24

II. Physiopathologie et traitement 25

III. Facteurs de virulence 26

III.1. Les plasmides de virulence chez Y. pestis, Y. pseudotuberculosis et Y. enterocolitica 26

III.2. Le système de sécrétion de type III 27

III.3. Les facteurs d'invasion cellulaire et traversée de l'épithélium intestinal 30

III.3.1. Ail 30

III.3.2. pH6 Antigène 31

III.3.3. YadA 31

III.3.4. Invasin 32

IV. Réplication des Yersiniae 34

IV.1. Phase intracellulaire de réplication 34

IV.2. Régulation génétique de la réplication intracellulaire de Yersinia 35

IV.3. Trafic intracellulaire de Yersinia 35

Chapitre II : Les voies de dégradations : Autophagie et Endosome 37

I. Autophagie 37

I.1. La macro-autophagie 39

I.1.1. Mécanisme de formation de l'autophagosome 40

I.2.2.1 L'origine du phagophore 40

I.2.2.2 L'initiation 42

I.2.2.3 Nucléation 43
I.2.2.4 Élongation 44
I.2.2.5 Fusion avec lysosome 45
I.1.2. Régulation de l'autophagie 46
I.2. Xénophagie 46
I.2.1. Virus 47
I.2.2. Bactéries 48
I.2.2.1 Reconnaissance sélective des bactéries 48
I.2.2.1.1 Ubiquitine 48
I.2.2.1.2 Protéine adaptatrice de l'autophagie 50
I.2.2.2 Manipulation de l'autophagie par les bactéries 51
I.2.2.3 Importance des voies alternatives de l'autophagie 54
I.2.2.3.1 Voie alternative de la macro-autophagie 54
I.2.2.3.2 LC3-Associated Phagocytosis (LAP) 55
II. Autophagie et Endocytose 56
II.1 L'endocytose 56
II.2 Les endosomes 58
II.3 Fusion endosome- autophagosome 60
Chapitre III : Le trafic membranaire 63
I. SNARE 65
I.1 SNARE et Trafic membranaire 66
I.1.1 Mode d'action général 66
I.1.2. Localisation et fonction de quelques complexes SNARE 68
I.2.SNARE et Autophagie 71
I.2.1 Initiation et maturation de l'autophagosome 71
I.2.2 Fusion membranaire entre l'autophagosome et le lysosome 74
I.3 SNARE et pathogènes 75
ARTICLE ET RÉSULTATS 79
Chapitre I : Le rôle de deux protéines SNARE dans le trafic intracellulaire de Y. pseudotuberculosis 81
I. Contexte de scientifique 82
II. Etude préliminaire 83
III. Article 85

IV. Résultats Complémentaires : **115**

V. Discussion **117**

Chapitre II : Interaction de la vacuole de Y. pseudotuberculosis avec l'autophagie et la voie de l'endocytose **119**

I. Contexte de scientifique **120**

II. Résultats **120**

III. Discussion **126**

DISCUSSION GÉNÉRALE ET PERSPECTIVES **129**

I. Quelle est l'origine des membranes constituants la formation de la vacuole bactérienne ? **132**

II. Les SNARE point de liaison entre les voies de l'autophagie et des endosomes ? **133**

III. Identification des partenaires des protéines SNARE **135**

IV. Quel est le rôle de la bactérie dans la modulation de ces voies ? **136**

MATÉRIELS ET MÉTHODES **137**

I. Bactériologie **139**

I.1. Souches : 139

I.2. Culture bactérienne : 139

I.3. Infection des cellules 139

I.4. Dénombrement par CFU 139

II. Culture Cellulaire **140**

II.1. Lignées cellulaires : 140

II.1.1. Les lignées épithéliales : 140

II.1.2. Les macrophages 140

II.2. Culture cellulaire : 141

III. Transfection et traitement cellulaire **141**

III.1. Transfection cellulaire 141

III.1.1. Lipofection de vecteurs plasmidiques et des ARN interférants 141

III.1.2. Électroporation 141

III.2. Modulation de l'autophagie 141

IV. Biologie cellulaire 142

IV.1. Plasmides **142**

IV.2. ARN interférants (siRNA) 142

IV.3. Anticorps et réactifs 143
IV.3.1. Anticorps primaires 143
IV.3.2. Anticorps secondaires 143
IV.3.3. Réactifs et produits chimiques 144
VI. Extraction des protéines et Western blot 144
VII. Microscopie 144
VII.1. Microscopie photonique 144
VII.1.1. Immunofluorescence 144
VII.1.2. Microscopie confocale 145
VII.1.3. Microscopie de Super-Résolution (SIM : Structured Illumination Microscopy 145
VII.1.4. Vidéo-microscopie 145
VII.2. Microscopie à force atomique (AFM) 146
VII.3. Microscopie électronique à transmission (MET) 146
VII.3.1. Morphologie 146
VII.3.2. Microscopie corrélative entre photonique et électronique 146
VII.3.3. Microscope électronique 147
ANNEXES 149
BIBLIOGRAPHIE 158

Résumé

Yersinia pseudotuberculosis appartient à la famille des *Enterobacteriaceae* et peut être responsable de syndromes articulaires et digestifs. Au cours de la colonisation de l'hôte, une minorité des bactéries va, en plus de l'étape de multiplication extracellulaire présenter une phase de réplication intracellulaire dans les macrophages. Une partie des *Y. pseudotuberculosis* va se répliquer dans les macrophages en usurpant la voie de l'autophagie, afin de créer une niche réplicative au sein des autophagosomes bloqués dans leur maturation. Le trafic membranaire associé à l'infection de *Y. pseudotuberculosis* reste à ce jour peu caractérisé. Dans un premier temps, nous avons observé que lors de l'infection d'une cellule épithéliale par *Y. pseudotuberculosis*, la vacuole bactérienne est associée avec le marqueur des autophagosomes, la protéine LC3. De façon surprenante, cette vacuole ne présente pas deux mais une membrane unique. Par ailleurs, nous avons montré que les protéines SNARE jouent un rôle majeur au cours du trafic intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis.* VAMP3 et VAMP7 sont recrutées de manière séquentielle au niveau de la vacuole de *Y. pseudotuberculosis.* VAMP7 va participer au recrutement de LC3 au niveau de la vacuole bactérienne, et nous proposons que VAMP3 est un des constituants du check-point permettant l'adressage de la bactérie vers des vacuoles présentant une ou de multiples membranes positives pour LC3. Par la suite, nous nous sommes intéressés à la caractérisation des protéines de la voie autophagique et des endosomes, recrutées au niveau de la vacuole bactérienne à membrane unique et positive pour LC3. Nous avons mis en évidence que les protéines impliquées dans la formation de l'autophagosome et les marqueurs des endosomes précoces sont recrutées au niveau de la vacuole contenant *Y. pseudotuberculosis*. Cette vacuole positive pour LC3 va en suite acquérir les marqueurs des endosomes tardifs et du lysosome mais n'est pas acidifiée. En outre, nous avons initié des travaux sur un criblage en haut contenu afin d'identifier les partenaires des protéines SNARE et leurs rôles dans le trafic intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis*.

Ces travaux démontrent l'importance de l'analyse de l'ultrastructure des compartiments positifs pour LC3. Ils illustrent la manière dont la bactérie s'adapte à son environnement pour établir sa niche réplicative. Ils présentent enfin l'importance de la régulation de l'autophagie avec la première mise en évidence d'un check-point entre deux voies de compartimentation positives pour LC3, mais morphologiquement différentes.

Mots clés: *Yersinia pseudotuberculosis*, autophagie, LC3-associated-phagocytosis, SNARE, trafic membranaire

Summary

Yersinia pseudotuberculosis is a member of the *Enterobacteriaceae* family. In human, *Y. pseudotuberculosis* infection is responsible for enteric and, in rare cases, erythema nodosum. During host colonization, a minor part of *Y. pseudotuberculosis* presents an intracellular replication step. *Y. pseudotuberculosis* can replicate inside macrophages by hijacking the autophagy pathway. The bacteria are able to block autophagosome maturation by acidification impairment, which allows to create a replicative niche. The membrane traffic during internalization of *Yersinia* remains poorly characterized. First, we highlighted that in epithelial cells, *Y. pseudotuberculosis* replicates mainly in vacuoles positive for LC3, a hallmark of autophagy. Surprisingly, this LC3-positive-vacuole presents only single limiting membrane. Second, we showed that SNARE proteins play a role in *Y. pseudotuberculosis* intracellular traffic. VAMP3 and VAMP7 are sequentially recruited to *Yersinia*-containing vacuoles (YCVs). VAMP7 is involved in the LC3 recruitment to YCVs with single- and double-membrane. We proposed that VAMP3 is a component of the molecular checkpoint for bacterial commitment to either single- or double-membrane LC3-positive pathway. Third, we characterized the traffic of endosomal proteins recruited to LC3-positive-YCV with single membrane in epithelial cells. We showed that markers of early endosome and proteins involved in autophagosome formation, are recruited to YCVs during the early stage of infection. Then, the vacuole acquire late endosomal and lysosomal proteins but acidification is not observed. Finally, we initiated a high-content screening approach for the identification of SNARE partners.

Overall this work illustrates the importance of LC3-positive compartment ultrastructure analysis. Our result demonstrate how bacterial subvert the molecular machinery of the host in order to create a replicative niche. Finally, we present the importance of autophagy regulation by highlighting for the first times the existence of a molecular checkpoint between two LC3-positive vacuoles with different morphologies.

Key words: *Yersinia pseudotuberculosis,* autophagie, LC3-associated-phagocytosis, SNARE, membrane traffic

Table des illustrations

Et

Abréviations

Tableau des illustrations

Revue bibliographique

Figure 1	:	Nombre de cas de peste humaine dans le monde entre 1987 et 2009	23
Figure 2	:	Cycle de transmission de *Yersinia pseudotuberculosis*	24
Figure 3	:	Incidence des yersinioses répertoriées dans différentes parties de l'Europe, en Amérique du nord et en Océanie entre les années 2000 et 2009	25
Figure 4	:	Schéma de la structure du système de sécrétion de type III	28
Figure 5	:	Modèle de l'expression des gènes et de la réponse immunitaire induite par l'insertion du T3SS dans la membrane cellulaire infectée par Yersinia	29
Figure 6	:	Cristallographie de la protéine AIL de *Y. pestis*	30
Figure 7	:	La protéine YadA	32
Figure 8	:	Architecture moléculaire de l'invasine de *Yersinia pseudotuberculosis*	33
Figure 9	:	Quatorze formes d'autophagie	38
Figure 10	:	Représentation schématique des différentes étapes de la macro-autophagie chez les mammifères	39
Figure 11	:	Les différentes sources possibles de membranes nécessaire pour la formation du phagophore.	42
Figure 12	:	Régulation du complexe ULK1/2 par la protéine mTOR	43
Figure 13	:	Formation de l'autophagosome	44
Figure 14	:	Signal "eat-me"	49
Figure 15	:	Les différents adaptateurs protéiques impliqués dans l'autophagie sélective	50
Figure 16	:	Les différents mécanismes d'échappement des bactéries à la xénophagie	52
Figure 17	:	Exploitation des voies alternatives de l'autophagie par les bactéries	55
Figure 18	:	Les différentes voies d'internalisation utilisées par une cellule eucaryote	57
Figure 19	:	Le système endo-lysosome	58
Figure 20	:	Maturation de l'endosome précoce en endosome tardif	59
Figure 21	:	Interaction entre la voie de l'endocytose et celle de l'autophagie	60
Figure 22	:	Bourgeonnement et fusion d'une vacuole de transport	64
Figure 23	:	Trafic vacuolaire en fonction des Rab	65
Figure 24	:	Structure des différentes familles de protéines SNARE	66
Tableau 1	:	Classification des protéines SNARE	66
Figure 25	:	Trafic membranaire régulé par un complexe SNARE	67
Figure 26	:	Fusion des membranes sous la direction du complexe SNARE	68
Figure 27	:	Voie de transport intracellulaire et SNARE associées	70
Tableau 2	:	Les SNARE de levure impliquées dans différentes étapes de la voie de l'autophagie	72

Tableau 3 : Les SNARE de mammifères impliquées dans différentes étapes de la voie de l'autophagie 73
Figure 28 : Implication des SNARE dans la voie de l'autophagie 74

Article et Résultats

Figure 29 : VAMP7 est recrutée au niveau de la vacuole bactérienne 84
Figure Article
Figure 30 : Schéma de la mise en contact d'une bactérie et d'une cellule à l'aide d'un levier AFM 115
Figure 31 : Le contact bactérie/cellule permet le recrutement de VAMP3 au niveau du site de contact 116
Film 3 : Recrutement de VAMP3 au niveau du site de contact bactérie/ cellule
Figure 32 : Ubiquitine et p62 sont présentes au niveau de la vacuole de *Y. pseudotuberculosis* positive pour LC3 121
Figure 33 : Les protéines intervenant dans la formation de l'autophagosome sont recrutées au niveau de YCV 122
Figure 34 : Les protéines intervenant dans la formation de l'autophagosome sont recrutées au niveau de YCV 123
Figure 35 : Rab7 , CD63 et LAMP1 sont recrutées au niveau de YCV pour LC3 125
Figure 36 : Schéma des protéines décorant YCV au cours de l'infection 126

Discussion et perspective

Figure 37 : Schématisation des protéines impliquées au cours de l'infection des cellules HeLa par *Y. pseudotuberculosis* 134

Annexe I

Figure 38 : Modélisation de la segmentation des cellules et des bactéries par une macro ImageJ 153
Figure 339 : Quantification automatisée du nombre de bactéries extracellulaires, intracellulaires et colocalisées avec le Lysotracker 154

Abréviations

A

aBCV	Vacuole *Brucella abortus*
ADN	Acide désoxyribonucléique
AFM	Microscopie à force atomique
AMPK	AMP-activated protein Kinase
ARN	Acide ribonucléique
ATG	Autophagy related genes

B

BMDM	Bone marrow-derived macrophages

C

CFU	Colony-forming unit
CLEM	Correlative light-electron microscopy
CLSM	Confocal laser scanning microscopy
CMA	Chaperone-mediated autophagy
CRV	Coxellia replicative vacuoles

D

DAG	Diacylglycerol
DAPI	4'-6-diamidino-2-phenylindole
DFCP1	Double FYVZ domain containing Protein1

E

EE	Endosome précoce
eIF2	Eukaryotic initiation factor 2

F

FBS	Fetal bovine serum

G

GABARAP	Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein
GAS	*Streptococcus* du groupe A
GATE-16	Golgi-associated ATPase enhancer of 16kDa
GFP	Green fluorescent protein

H

HCV	Virus de l'hépatite C

I

IP3R	Inositol tri-phosphate receptor
IPTG	Isopropyl-Beta-Thio-Galactoside
IRE-A	Inositol requiring enzyme-1

J

JNK-1	C-jun-N-terminal-kinase1

L

LAMP	Lysosome-associated membrane protein type
LAP	LC3-Associated-Phagocytosisociated phagocytosis
LC3	microtubule-associated protein 1 light chain 3
LE	Endosome tardif
LRR	Leucin rich repeat

M

MHV	Virus de l'hépatite murine
MT	Microtubule

N

NBR1	Neighbor of BRCA1 gene 1
NDP52	Nuclear dot protein 52, également nommée CALCOCO2
NSF	N-ethylmaleimide sensitive factor protein

O

OPTN	Optineurine

P

p62	Sequestosome 1
PAS	Site d'assemblage pour le phagophore
PBS	Phosphate buffer saline
PDK1	Phosphoinositide-dependent kinase 1
PE	Phosphotidylethanolamine
PI3K-III	Class III phosphoinoside 3-kinase
PIP3-K	Phosphatidylinositol 3-kinase de type III
PRR	Pattern recognition receptor

R

RFP	Red fluorescent protein

S

SIM	Structured illumination microscopy
siRNA	Small interfering RNA
SLAP	Spacious Listeria-containing vacuoles
SNAP	Soluble NSF attachment proteins
SNARE	Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor

T

TEM	Transmission electron microscopy
TIRF	Microscopie à onde évanescente/ Total Internal Reflection Fluorescence
TOR	Target of rapamycin

U

Ub	Ubiquitine
ULK	UnC-51-Like Kinase

V

VAMP	Vesicular-associated membrane protein

W

WIPI	WD-repeat protein interacting with phophoinositides

Y

YCV	*Yersinia*-containing vacuole

Revue Bibliographique

« Vivez comme si vous deviez mourir demain.
Apprenez comme si vous devrez vivre éternellement »
Gandhi

Chapitre I : Les Yersiniae

Les *Yersiniae* sont des bacilles à Gram négatif de la famille des *Enterobacteriaceae,* répartis en onze espèces et pouvant être classés en fonction de leur pathogénicité. La première catégorie rassemble *Y. mollaretti, Y. bercovieri, Y. aldovae, Y. rodhei, Y. intermedia*, *Y. ruckeri* (pathogène de poissons*), Y. fredriksenii,* et *Y. kristensenii*. L'ensemble de ces espèces est largement répandu dans l'environnement et n'est habituellement pas associé à des maladies, même si les trois dernières espèces sont suspectées d'être des pathogènes. Le second groupe constitué de *Y. enterocolitica, Y. pseudotuberculosis* et *Y. pestis* est à l'origine de pathologies chez l'animal et l'homme (Smego et al., 1999). Le réservoir des *Yersiniae* est très large. Les bactéries sont aussi bien retrouvées dans le sol que dans l'eau, mais également sur les végétaux à partir desquels les animaux se contaminent (Galindo et al., 2011) .

Différentes études phylogénétiques ont révélé que *Y. enterocolitica* est la plus éloignée des espèces pathogènes, avec une divergence datée de 42-187 millions d'années*,* tandis que *Y. pseudotuberculosis* et *Y. pestis* sont fortement apparentées (Ibrahim 1993)*.* En effet, leur étroite ressemblance génétique résulte de l'émergence récente (1500-20 000 ans) de *Y. pestis* à partir de *Y. pseudotuberculosis,* juste avant la première épidémie de peste humaine connue. (Achtman et al., 1999; Morelli et al., 2010a).

Les *Yersiniae* sont des coccobacilles qui, à l'exception de *Y. pestis*, sont mobiles à 25°C (Brubaker, 1972). Les trois espèces pathogènes pour l'homme se multiplient dans une large gamme de températures allant de 4°C à 42°C, avec une température optimale de croissance de 28°C, et à des valeurs de pH comprises entre 5 à 9,6 (Brubaker, 1972). *Y. pestis* se distingue des deux autres espèces par un temps de génération plus long et par ses nombreuses auxotrophies. Après la description des trois principales espèces pathogènes de *Yersinia,* la physiopathologie ainsi que les facteurs de virulence seront présentés.

I. Les *Yersiniae* pathogènes

I.1. *Yersinia enterocolitica*

C'est en 1939 que pour la première fois *Y. enterocolitica* est isolée aux Etats-Unis et décrite par Schleifstein et Coleman, qui la nomment, en 1943, *Bacterium enterocoliticum* (Carniel et al., 2006). Par la suite, plusieurs noms successifs lui sont donnés, jusqu'en 1964 où l'organisme obtient son nom définitif, *Y. enterocolitica*. L'espèce *enterocolitica* est isolée dans un grand nombre de pays situés sur les cinq continents compte tenu de la diversité des niches écologiques pouvant l'abriter. En effet, cette bactérie est aussi bien retrouvée dans l'environnement (sol et

eau) que dans le réservoir animal, comprenant autant d'espèces domestiques que sauvages. En fonction de la grande diversité métabolique des souches, l'espèce *Y. enterocolitica* est subdivisée en cinq biotypes, le biotype 1 est lui-même scindé en deux biotypes 1A et 1B (Bottone, 1997). Les souches pathogènes pour l'homme sont principalement rassemblées dans le biotype 1B et sont essentiellement isolées du porc (Fredriksson-Ahomaa et al., 2006; Drummond et al., 2012). L'homme s'infecte habituellement par voie orale, par ingestion d'aliments contaminés par la bactérie (Bottone, 1997). Il est intéressant de noter que l'explosion des cas de yersinioses dans les années 1950 coïncide avec le développement de l'utilisation du réfrigérateur pour conserver les aliments. L'aptitude de la bactérie à se développer à 4°C peut être un facteur facilitant la contamination humaine, mais son incidence est moindre par rapport à celle de *Listeria monocytogenes.*

Y. enterocolitica est responsable des deux tiers des cas mondiaux d'entérites du nourrisson et de l'enfant de moins de cinq ans (Abdel-Haq NM, 2000). Chez les enfants et les jeunes adultes, l'infection par *Y. enterocolitica* peut être associée avec une adénite mésentérique se manifestant par un symptôme de pseudo-appendicite (douleur dans la fosse iliaque, vomissement et fièvre). L'érythème noueux est la complication dermatologique des yersinioses la plus fréquente, et affecte surtout la femme (Butler, 1994). Plus rarement, *Y. enterocolitica* est associée avec des cas de septicémie et des formes d'arthrite (décrits principalement dans les pays scandinaves).

I.2. ***Yersinia pestis***

Yersinia pestis est l'agent étiologique de la peste. Bien que cette maladie soit connue depuis l'antiquité, ce n'est qu'en 1894, au cours de l'épidémie qui sévit à Hong-Kong, qu'Alexandre Yersin isole pour la première fois cette bactérie et la nomme *Pasteurella pestis*. La bactérie est renommée en 1967 *Yersinia pestis* en hommage à son découvreur. Les trois épidémies de peste sont à l'origine de millions de décès au cours des 15 derniers siècles. La première épidémie, dite peste Justinienne, a débuté en Afrique de l'Est et s'est propagée à tout le bassin méditerranéen de 540 à 760. La seconde épidémie (1347-1350), dite de la peste noire, fut la plus meurtrière en décimant jusqu'à un tiers de la population européenne en cinq ans. La troisième grande épidémie de peste a eu lieu dans la deuxième partie du XIXème siècle en Asie (Wren, 2003; Williamson and Oyston, 2012). À partir de ces épidémies, l'espèce *pestis* a été subdivisée en trois biotypes : Antiquita, Medievalis et Orientalis (Achtman et al., 1999; Morelli et al., 2010b). La peste sévit à l'heure actuelle de manière sporadique, occasionnant quelques cas par an répertoriés principalement sur trois continents : Amérique, Asie et Afrique, qui présentent l'incidence la plus élevée de la peste (97,4% des cas de peste humaine) (Butler, 2009) (OMS 2010) (Fig. 1).

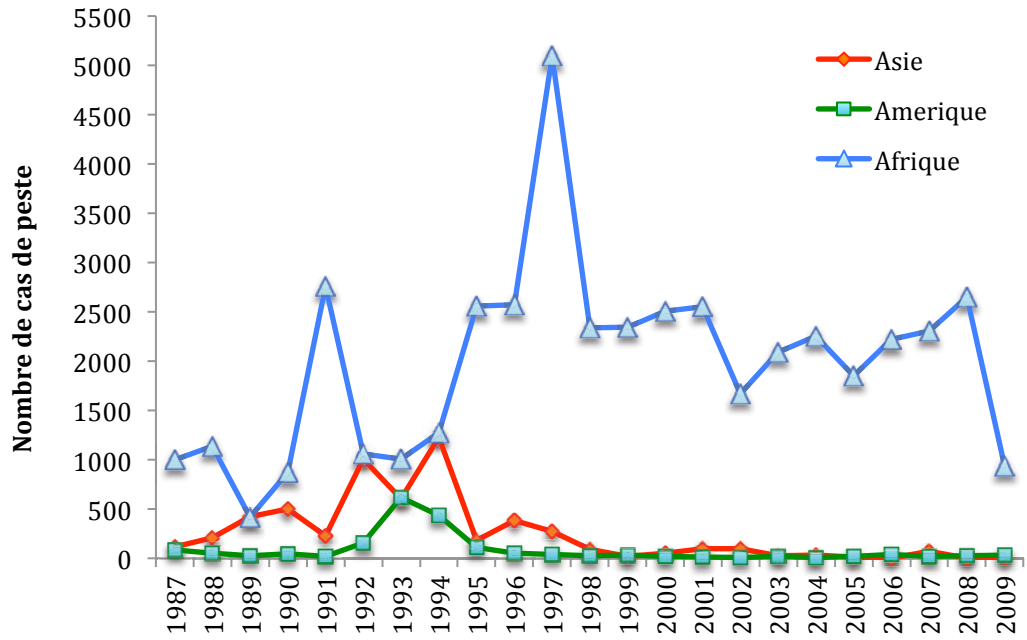


Figure 1: Nombre de cas de peste humaine dans le monde entre 1987 et 2009. D'après L'O.M.S 2010.

La peste est une zoonose qui n'est qu'accidentellement transmise à l'homme, et dont le principal réservoir de l'agent éthologique sont les rongeurs (Wren, 2003). La bactérie est transmise entre les animaux soit directement, par l'ingestion d'aliments contaminés ou l'inhalation d'aérosols, soit par l'intermédiaire d'un vecteur, la puce, souvent responsable de la contamination de l'homme. La peste s'exprime sous trois formes cliniques différentes selon la source de contamination. La peste bubonique est la forme classique de la maladie. Elle fait suite à une piqûre de puce *Xenopsylla cheopsis.* Le bacille se multiplie au point d'entrée, aboutissant à la formation d'un bubon caractéristique, suppuré et œdémateux, souvent situé à l'aine et aux aisselles. Après une semaine, l'hôte infecté présente une fièvre, des frissons, des céphalées pouvant conduire à la mort en l'absence de traitement précoce. La peste septicémique fait suite à une complication de la forme bubonique. La dernière forme, qui est la plus rare de la maladie mais de loin la plus grave du fait de son extrême contagiosité est la peste pulmonaire. Elle correspond à une atteinte des poumons consécutive à l'inhalation de projection d'expectoration purulente contenant le bacille. Après une période d'incubation extrêmement courte (de quelques heures à deux jours), le malade présente une pneumonie aigüe et sévère. En l'absence de traitement dans les premières heures de l'infection, cela évolue vers un coma dont l'issue est généralement la mort.

I.3. *Yersinia pseudotuberculosis*

Yersinia pseudotuberculosis fut décrite en 1883 par Malassez et Vignal. Plusieurs noms lui seront attribués, tels que le bacille de la tuberculose zoologique ou encore *Bacillus pseudotuberculosis*. C'est en 1974 que le bacille obtient son nom définitif : *Y. pseudotuberculosis.* L'espèce *pseudotuberculosis* est subdivisée en vingt et un sérogroupes de type O, qui sont largement distribués dans l'environnement des continents présentant un climat froid. Le réservoir animal de *Y. pseudotuberculosis* est très étendu. Le bacille est retrouvé principalement chez les rongeurs et les oiseaux. À l'inverse de *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* n'est pas vectorisée, la contamination des animaux et des humains se fait par contact direct avec un animal infecté ou par l'ingestion d'aliments ou d'eau contaminés (Fig. 2) (Carniel et al., 2006). Chez les animaux, *Y. pseudotuberculosis* est responsable d'adénites mésentériques dont la guérison est le plus souvent spontanée. Chez l'homme, la bactérie est responsable de maladies digestives aiguës dont les symptômes sont des douleurs abdominales associées à une fièvre pouvant évoluer vers une diarrhée et des vomissements (Knapp 1958 ; Van Noyer 1991). Les atteintes dermatologiques, moins rencontrées qu'avec l'espèce *enterocolitica,* sont le plus souvent des érythèmes noueux localisés au niveau des membres inférieurs, et touchant principalement les sujets masculins. L'espèce *pseudotuberculosis* est associée avec la fièvre scarlatiniforme dans les régions d'Extrême-Orient et de Russie. Les signes cliniques sont une fébrilité accompagnée de lésions cutanéo-muqueuses de type scarlatiniforme, une fièvre, une céphalée et une desquamation de la peau furfuracée se produisant entre le 8ème et le 16éme jour. À ces syndromes sont souvent associés une maladie digestive avec vomissements, diarrhée et douleurs abdominales. Chez les sujets présentant un diabète, une cirrhose, des disfonctionnements hépatiques, ou encore une immunodéficience, l'infection par *Y. pseudotuberculosis* peut se généraliser et entraîner une septicémie.

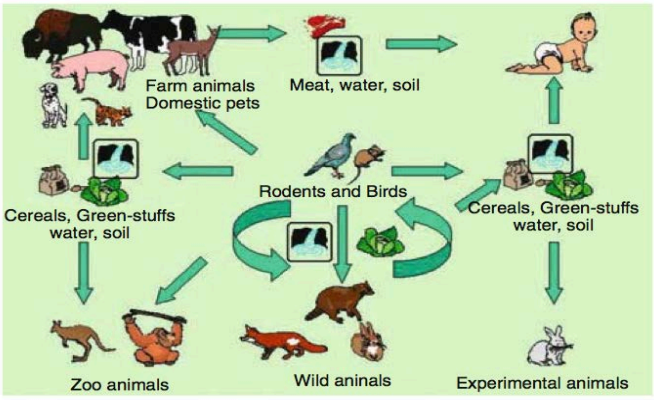


Figure 2 : Cycle de transmission de *Yersinia pseudotuberculosis* (Carniel et al., 2006)

La surveillance épidémiologique de *Y. pseudotuberculosis* n'est pas effectuée de manière routinière. Ce sont les cas de yersinioses (incluant *Y. pseudotuberculosis et Y. enterocolitica)* qui sont référencés au niveau des centres nationaux de surveillance. De plus, les yersinioses sont principalement retrouvées dans les pays en développement où les maladies entériques sont les principales causes de la mortalité infantile. Le nombre de cas d'entérites dues à une infection par une *Yersinia* entéro-pathogène reste difficile à estimer car ces cas ne sont pas inclus dans les premières cibles de surveillance (Galindo et al., 2011). La surveillance menée entre les années 2000 et 2009 a mis en évidence la présence de cas sporadiques d'infection par les espèces de *Yersiniae* enteropathogènes chez l'homme et répertoriées dans différents pays (Fig. 3)(Galindo et al., 2011) .

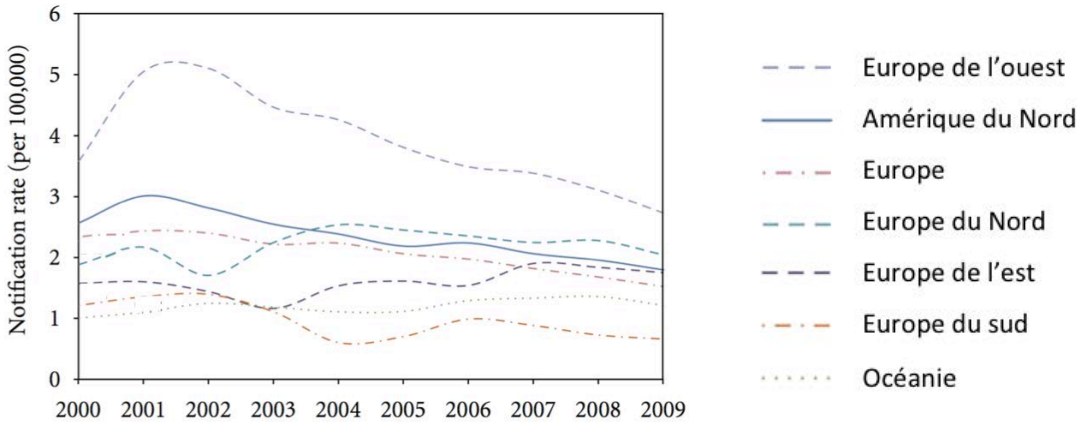


Figure 3: Incidence des yersinioses répertoriées dans différentes parties de l'Europe, en Amérique du Nord et en Océanie entre les années de 2000 et 2009. D'après Galindo et al, 2011

C'est trois espèces pathogènes de *Yersinia* présentent une physiopathologie et des traitements spécifiques à chacune d'entre elles.

II. Physiopathologie et traitement

Yersinia pestis est transmise par piqûre d'insecte ; ainsi la porte d'entrée principale pour infecter l'hôte est la voie sous-cutanée. *Y. enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* infectent l'hôte par voie digestive, souvent suite à une contamination oro-fécale. Après traversée de l'estomac, les *Yersiniae* enteropathogènes entrent dans l'intestin grêle et s'attachent au mucus. L'infection se limite généralement à l'intestin grêle, les plaques de Peyer et les ganglions mésentériques. Attachée aux cellules intestinales, *Y. enterocolitica* sécrète une entérotoxine responsable en partie de la diarrhée. Reconnaissant des récepteurs à la surface de l'épithélium intestinal, l'espèce *pseudotuberculosis* envahit les plaques de Peyer, et semble cibler particulièrement les cellules M associées aux follicules lymphoïdes pour traverser la muqueuse intestinale. Après

l'internalisation et le passage de l'épithélium intestinal, la bactérie se retrouve en contact avec les cellules immunitaires (cellules dendritiques, macrophages, lymphocytes). Les *Yersiniae* rejoignent les ganglions mésentériques par les voies lymphatiques, ainsi que la rate et le foie par la voie hématogène.

Il n'existe ni prophylaxie, ni vaccination contre les *Yersiniae* (sauf un vaccin contre *Y. pseudotuberculosis* utilisé en applications vétérinaires). Seuls des traitements curatifs peuvent être proposés aux personnes contaminées. Il n'existe qu'une gamme limitée d'antibiotiques pouvant être utilisés contre l'agent de la peste : spectinomycine, gentamicine, chloramphénicol et trétracytline (doxycycline)(Smego et al., 1999). En 1995, des isolats de *Y. pestis* provenant de Madagascar présentaient une forte résistance aux antibiotiques préconisés en thérapie et en prophylaxie (*ex* : ampicilline, chloramphénicol,…). L'ensemble de ces résistances est dû à l'acquisition d'un plasmide de conjugaison, nommé pIP2002 (Galimand et al., 1997; 2006). Les chances de survie des patients sont à relier directement à la précocité de l'administration de l'antibiothérapie, et spécialement en présence des formes sévères de pestes (pneumonique et septicémique). Le traitement classique contre les *Yersiniae* entéropathogènes en pathologie humaine est constitué par des antibiotiques (*ex* : aminoglycosides, doxycycline, fluoroquinolones, amoxicilline/acide clavulanique, ciprofloxacine). Il faut toutefois noter que *Y. enterocolitica* présente une résistance naturelle au β-lactamine (ampicilline) par la production d'une pénicillinase chromosomique (ß-lactamase A) et d'une céphalosporinase inductible (ß-lactamase B) (Smego et al., 1999). La physiopathologie et la résistance aux antibiotiques des souches sont dues à l'expression de leur pouvoir pathogénique ainsi qu'à leurs facteurs de virulence.

III. Facteurs de virulence

Le génome des *Yersiniae* pathogènes est identique à 97 %. Cependant chaque espèce présente des voies d'infection, des sévérités et des pathologies humaines différentes. Cela est dû à leur distribution dans l'environnement, mais surtout à la grande diversité des facteurs de virulence.

III.1. Les plasmides de virulence chez *Y. pestis*, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica*

Les plasmides de virulence sont au nombre de trois, caractérisés en fonction de leur taille, 10 kb, 70kb et 100kb, mais seule l'espèce *pestis* les présente tous. Le plasmide de 10 kb ou Pst (plesticine) est impliqué dans la dissémination de la bactérie au niveau du site d'infection et code pour des bactériocines et des pesticines. Le second, le plasmide Tox de 100 kb code pour une exotoxine et l'antigène de capsule. Le plasmide de 70kb est le seul présent chez l'ensemble

des espèces, notamment chez *Y. pseudotuberculosis.* Ce plasmide pYV de 70kb est connu pour être exprimé de façon spontanée lorsque les souches sauvages sont cultivées à 37°C en absence de Ca^{2+}. La réponse dépendante du Calcium et la virulence des souches sont toutes deux codées par ce plasmide, qui joue un rôle important dans l'établissement et le devenir de l'infection. Le plasmide pYV code pour un système de sécrétion de type III (T3SS ou *injectisomes*), un appareil de translocation, ses régulateurs et des effecteurs nommés Yop pour *Yersinia* outer protein (Ferber and Brubaker, 1981).

III.2. Le système de sécrétion de type III

Le système de sécrétion de type III permet aux espèces bactériennes telles que *Salmonella, Pseudomonas, Yersinia spp* d'adhérer à la surface des cellules eucaryotes et d'injecter leurs protéines à travers les membranes bactériennes et cellulaire, ceci afin de détruire et de manipuler la réponse cellulaire de l'hôte. Le T3SS est un système de sécrétion constitué de plusieurs protéines impliquées tout aussi bien directement dans sa structure que dans sa régulation ou sont simplement sécrétées à travers lui.

Le T3SS, homologue des flagelles bactériens, est codé par le plasmide pYV dont l'expression est contrôlée par la température et la concentration en Ca^{2+} dans l'environnement. Le T3SS est codé par une vingtaine de gènes répartis en quatre loci virC (yscABCDEFGHIJKLM), virG (yscW), virB (yscNOPQRSTU) et virA (yscV, yscX, yscY sycN, tyeA, lcrR et yopN) (Cornelis and Van Gijsegem, 2000; Iriarte and Cornelis, 1999). Les protéines YscC, YscD et YscJ vont former des pores dans la membrane de la bactérie (Fig. 4). La protéine YscN est une ATPase nécessaire à la translocation des protéines effectrices. L'activité ATPase est contrôlée négativement par YscL (Sorg et al., 2006). Les protéines YopBD, LcrV et les Yop créent un pore dans la membrane de la cellule cible. LcrV est localisée à la pointe du T3SS, avant le contact de la cellule hôte (Fig. 4). La liaison entre les protéines YsvC et YoBD/LcrV est réalisée via YscF, qui forme l'aiguille (Fig. 4)(Dewoody et al., 2013a). La translocation des protéines Yop est effectuée à travers le T3SS, de manière polarisée et contrôlée puisqu'elles sont délivrées uniquement au moment et au niveau de la zone de contact entre la bactérie et la cellule (Dewoody et al., 2013a).

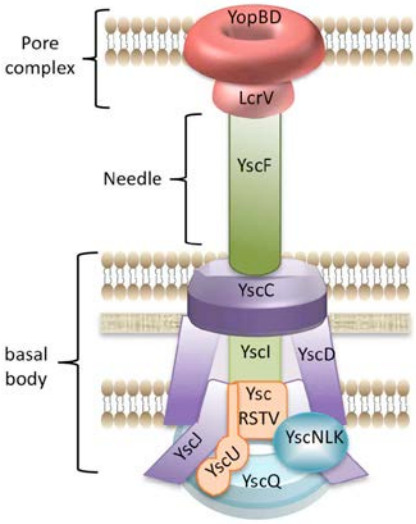


Figure 4: **Schéma de la structure du système de sécrétion de type III** (Dewoody et al., 2013a)

L'ensemble de ces protéines requiert, dans le cytoplasme bactérien, la présence de leurs protéines chaperonnes appelées Syc (Specific *Yersinia* Chaperon). Par exemple, le couple YopN-SycN, empêche ainsi des associations prématurées et leur destruction. Les protéines chaperonnes permettraient de délivrer de manière séquentielle les effecteurs Yop dans la cellule cible. De façon intéressante, les protéines associées avec les Syc sont importantes dans les étapes précoces de l'infection tandis que les Yop, n'étant pas liées à des protéines chaperonnes, sont sécrétées plus tardivement et sont impliquées dans les fonctions de régulation de la réponse immunitaire.

Les protéines Yop impliquées dans la modulation de la réponse immunitaire et le réarrangement du cytosquelette d'actine de l'hôte sont au nombre de six (Cornelis, 2002; Bliska et al., 2013; Viboud and Bliska, 2005). YopH, YopE, YopR et YpkA sont impliquées pour contrecarrer la phagocytose.

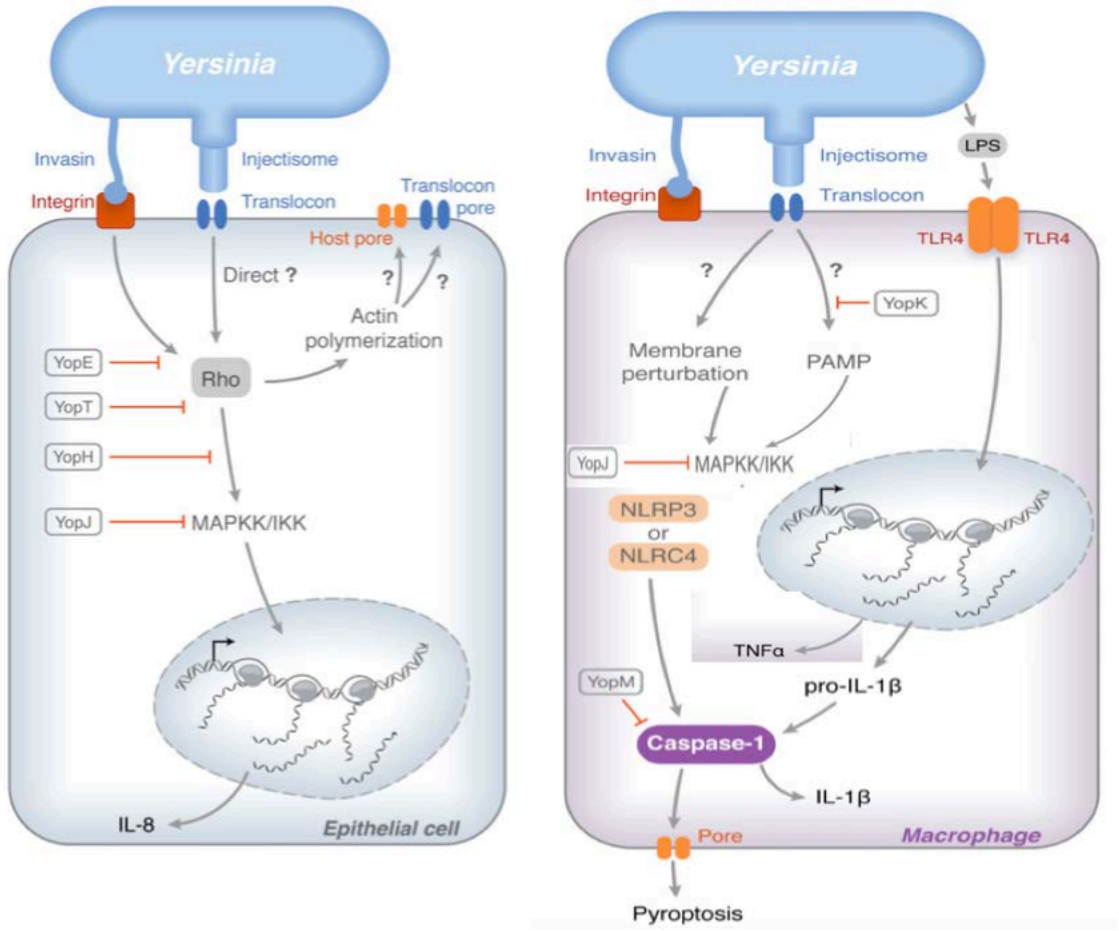


Figure 5: Modèle de l'expression des gènes et de la réponse induite par l'insertion du T3SS dans la membrane cellulaire infectée par *Yersinia*. (A) Cellule épithéliale avec l'activation Rho, qui est la voie la plus modulée par les Yop. **(B)** Localisation de l'action des Yop et les conséquences sur l'immunité innée dans les macrophages (Bliska et al., 2013).

La protéine YopH est une phosphotyrosine phosphatase qui va induire la déphosphorylation d'une partie des protéines tyrosine phosphorylées de la cellule (Fällman et al., 2002). YpkA (YopO chez *Y. enterocolitica*) autophosphorylée induit la déphosphorylation de l'actine (Juris et al., 2000). YopM inhibe l'assemblement du complexe inflammasome en agissant sur la caspase-1 et va également induire la synthèse de l'IL-10 (McPhee et al., 2012; LaRock and Cookson, 2012). Deux d'entre elles sont impliquées dans le détachement de la cellule de son substrat, en agissant sur la fragmentation de l'actine, et vont jouer également un rôle d'inhibiteur sur Rho (YopE) (Cornelis, 2002; Rosqvist et al., 1991), ou en clivant la protéine RhoA entraînant la destruction des fibres de stress et des points d'adhésions (YopT). L'effecteur YopJ est impliqué dans l'inhibition de la réponse immunitaire innée car il possède un puissant effet inhibiteur des protéines MAPK. YopJ intervient sur la signalisation NF*k*B et dans l'activation de la caspase-1 dans la cellule hôte (Zheng et al., 2012; Paquette et al., 2012; Lilo et al., 2008). YopK agit avec le translocon pour réguler la sécrétion des effecteurs et prévient sa reconnaissance par le système de l'inflammasome (Fig. 5) (Dewoody et al., 2013a; 2013b; Brodsky et al., 2010). En plus du T3SS

qui permet à la bactérie de moduler la réponse immunitaire et d'adhérer à la surface de la cellule eucaryote, les *Yersiniae* possèdent une variété de facteurs d'invasion.

III.3. Les facteurs d'invasion cellulaire et traversée de l'épithélium intestinal

Comme pour tout entéropathogène, la première porte d'entrée des espèces *enterocolitica* et *pseudotuberculosis* est l'intestin. Ces deux espèces colonisent et passent l'épithélium intestinal, accédant ainsi aux ganglions lymphatiques. Pour ceci, *Y. pseudotuberculosis* et *Y. enterocolitica* utilisent trois principales invasines/adhésines : (i) la protéine Ail (attachment invasion locus), (ii) *Yersinia* Adhesine A (YadA) et (iii) invasine (inv). Au cours de l'infection, les *Yersiniae* ont préférentiellement une vie extracellulaire. YadA et Ail agissent de concert pour aider à leur protection contre les défenses de l'immunité innée mises en place par l'hôte.

III.3.1. Ail

Ail pour Attachment Invasion Locus, une protéine de 17 kDa, est fortement exprimée en phase exponentielle de croissance à 37°C et en condition aérobie (Miller and Falkow, 1988). Les trois espèces de *Yersinia* pathogènes expriment Ail, et sa structure vient d'être décrite pour *Y. pestis* (Fig. 6) (Yamashita et al., 2011). Elle prend part dans la résistance contre le sérum pour les trois espèces, et est impliquée dans l'adhérence de *Y. pestis* et *Y. enterocolitica* aux cellules épithéliales (Mikula et al., 2012). Cependant, chez *Y. pseudotuberculosis,* Ail ne présente pas d'activité d'adhésion (Yang et al., 1996) et n'a pas été montrée comme impliquée dans la virulence de *Y. entercolitica* au cours de l'infection chez la souris (Wachtel and Miller, 1995). De part sa capacité à se lier à la laminine et à la fibronectine, Ail est impliquée de manière indirecte dans la sécrétion des effecteurs YOP par le système de sécrétion de type 3 (T3SS) (Mikula et al., 2012).

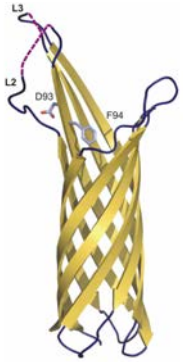


Figure 6: Cristallographie de la protéine Ail de *Y. pestis*.(Mikula et al., 2012)

III.3.2. pH6 Antigène

L'antigène pH6 (pH6-Ag) doit son nom à l'observation suivante : l'antigène est produit à la surface de *Y. pestis,* après culture de celle-ci à 36°C dans un milieu ayant un pH inférieur à 6,7 (Ben-Efraim and Bichowsky-Slomnichi, 1961). Cet antigène, également produit chez *Y. pseudotuberculosis,* apparaît être fortement conservé d'un point de vue génétique et immunologique entre ces deux espèces (Lindler et al., 1990; Ben-Efraim and Bichowsky-Slomnichi, 1964). Chez *Y. pestis*, l'antigène pH6-Ag est cytotoxique pour les monocytes et induit une réaction inflammatoire de la peau (Bichowsky-Slomnicki and Ben-Efraim, 1963). Une étude d'infection murine avec une souche de *Y. pestis* mutée pour pH6-AG a mis en évidence une diminution de la virulence du bacille (Lindler et al., 1990). L'antigène de *Y. pseudotuberculosis* présente une propriété d'hémagglutination, une capacité à se lier aux récepteurs Fc des macrophages qui induit l'adhésion des bactéries à la surface des cellules (Bichowsky-Slomnicki and Ben-Efraim, 1963)

III.3.3. YadA

La protéine *Yersinia* adhesin A, YadA (Fig. 7), un homodimère de 45 kDa codé par le plasmide de virulence pYV, est un facteur de virulence impliqué dans de multiples fonctions. L'activation de VirF/LcrF à 37°C permet l'expression de YadA qui s'insère dans la membrane externe de la bactérie, formant des fibrilles recouvrant le bacille (Skurnik and Toivanen, 1992) (Fig. 7). L'adhésine est présente chez les *Yersiniae* enteropathogènes mais n'est pas exprimée chez *Y. pestis,* étant donné que son gène homologue est inactif (Mikula et al., 2012). De plus, YadA est essentielle pour la virulence de *Y. enterocolitica* mais n'est pas nécessaire pour la virulence de *Y. pseudotuberculosis* (Tahir and Skurnik, 2001).

YadA est responsable du phénotype d'adhésion par la capacité qu'elle confère à la bactérie de se lier à la matrice extracellulaire, au collagène, à la laminine (des glycoprotéines qui forment le constituant majeur de la lame basale), et à la fibronectine. YadA joue une rôle dans l'attachement des bacilles aux cellules épithéliales ainsi que dans l'attachement et l'invasion des tissus de l'hôte (Eitel and Dersch, 2002; Kapperud et al., 1987). Dans le cas de *Y. pseudotuberculosis*, YadA permet l'invasion des cellules hôtes grâce à son domaine N-terminal (acide aminés de 53-83) par liaison avec l'intégrine β1 des cellules M (Heise and Dersch, 2006; Yang and Isberg, 1993; Tahir and Skurnik, 2001). L'adhésine contribue également à la réponse inflammatoire associée à l'infection. L'interaction de YadA avec l'intégrine β1 entraîne la production d' IL-18 par les cellules épithéliales de l'intestin (Eitel et al., 2005).

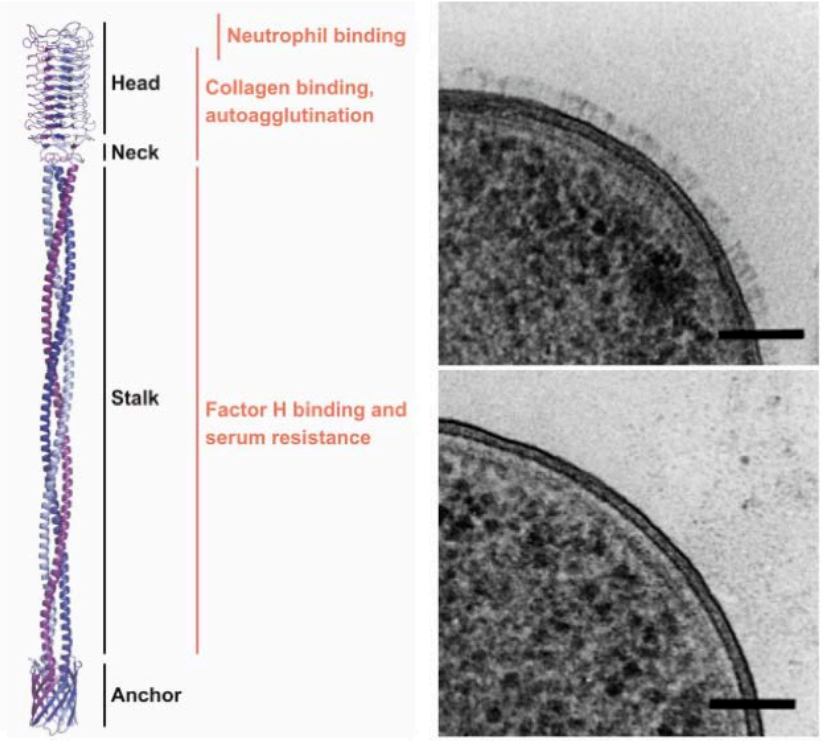


Figure 7: **La protéine YadA (A)** Modèle général de la topologie de la protéine YadA (Mikula et al., 2012) **(B)** La photo du haut : souche sauvage de *Y. enterocolitica* recouverte de la protéine YadA formant des fibrilles. Image du bas : souche de *Y. enterocolitica* privée du plasmide, et qui ne présente plus YadA à sa surface. Barre d'échelle : 100nm (Hoiczyk et al., 2000).

Plus récemment, deux nouvelles adhésines, YadB et YadC, ont été découvertes et caractérisées chez *Y. pestis et Y. pseudotuberculosis*. Comme pour YadA, l'expression de ces deux adhésines est maximale durant la phase exponentielle de croissance à 37°C (Forman et al., 2008).

III.3.4. Invasine

Le gène *inv* est présent chez toutes les espèces pathogènes du genre *Yersinia* (Miller and Falkow, 1988) (Isberg et al., 1987). Ce gène code une protéine de 92 kDa chez *Y. pseudotuberculosis* et de 103 kDa au sein du biotype 1B de *Y. enterocolitica* (Miller et al., 1989; Pierson and Falkow, 1990). À l'inverse, *inv* de *Y. pestis* est transcrit, mais le gène ne produit pas une invasine entière car il est interrompu par une copie de la séquence d'insertion IS1541 (Simonet et al., 1996). L'expression maximale de cette protéine survient à 26°C à pH 8 en début de phase stationnaire de culture. La protéine est également exprimée à 37°C à pH 5,5 suggérant ainsi une expression stomacale et intestinale de l'invasine. L'invasine va jouer un rôle dans les phases précoces de l'infection en se liant à son récepteur cellulaire, la famille des intégrines β1 (α3β1, α4β1, α5β1, α6β1 et αvβ3) situées sur les cellules M (Isberg and Leong, 1990; Simonet and Falkow, 1992). L'interaction de l'invasine et de l'intégrine β1 permet l'internalisation de la bactérie par la cellule hôte et participe ainsi à la colonisation des plaques de Peyer (Isberg et al., 2000; 1987). L'expression de cette protéine est suffisante pour conférer le phénotype d'invasion à des

bactéries non pathogènes, et pour permettre l'internalisation par des cellules de billes de latex présentant l'invasine à leur surface. (Tran Van Nhieu and Isberg, 1993). La région qui permet à la protéine d'adhérer puis d'entrer dans la cellule épithéliale est située en position C-terminale de la protéine. Cette région est constituée de quatre domaines chez *Y. enterocolitica* et de cinq domaines chez *Y. pseudotuberculosis*, disposés en perles, de structure proche de celle de la super famille des immunoglobulines (Dersch and Isberg, 2000) (Fig. 8). Les deux domaines D4 et D5 comprennent les acides aminés indispensables à la reconnaissance de l'intégrine (Fig. 8) : deux aspartates en positions 811 et 911, ainsi que les deux cystéines en positions 907 et 982 qui, en formant un pont disulfure, créent une boucle dans la région C-terminale (Saltman et al., 1996; Mikula et al., 2012; Dersch and Isberg, 1999). Le domaine D2 est responsable de la dimérisation de l'invasine, étape nécessaire pour l'internalisation de la bactérie lorsque la concentration de l'invasine est faible (Dersch and Isberg, 2000). Il est intéressant de noter que ce domaine D2 n'est présent que chez *Y. pseudotuberculosis* (Dersch and Isberg, 2000). Ces résultats ont conduit à l'élaboration d'un modèle dans lequel le regroupement des intégrines, suite à l'interaction avec l'invasine, induit un signal d'internalisation de la bactérie (Wong and Isberg, 2005).

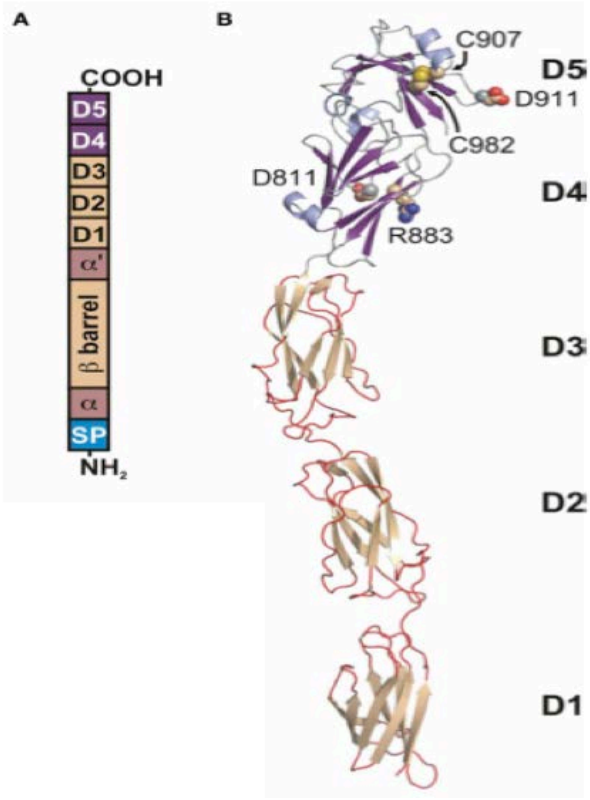


Figure 8: Architecture moléculaire de l'invasine de *Y. pseudotuberculosis*. (A) Représentation schématique de la topologie de la protéine. **(B)** structure des domaines D1-5. (Mikula et al., 2012)

IV. Réplication des *Yersiniae*

Les stratégies d'invasion entre les souches pathogènes de *Yersinia* sont différentes (Pujol and Bliska, 2003). *Y. pestis* est considérée depuis longtemps comme un pathogène intracellulaire facultatif pouvant se multiplier dans les macrophages, mais est rapidement tué par les neutrophiles (Bacon and Burrows, 1956; Cavanaugh and Randall, 1959; Silva and Pestana, 2013). Quant aux deux autres *Yersiniae* enteropathogènes, il a été mis en évidence que les bactéries pouvaient être sous forme d'agrégats extracellulaires aux niveaux d'abcès, 12 h après l'infection de rongeurs (Lian et al., 1987; Simonet et al., 1990).

IV.1. Phase intracellulaire de réplication

Les travaux menés *in vivo* par infection d'animaux par des aérosols ont mis en évidence l'aptitude des *Yersiniae* à survivre et à se multiplier dans les macrophages. Ainsi, *Yersinia pestis* est présente au sein des macrophages alvéolaires de singe (Finegold, 1969), *Y. enterocolitica* dans les monocytes des plaques de Peyer après trois heures d'infection (Une, 1977), et *Y. pseudotuberculosis* dans les macrophages situés aux niveaux des follicules lymphoïdes (Fujimura et al., 1992). Il apparaît évident que *Y. pseudotuberculosis,* comme *Y. pestis,* présente une phase intracellulaire au cours de l'infection et une aptitude à se répliquer dans les macrophages de souris durant la première phase d'infection (Pujol and Bliska, 2003). Dans les phases plus tardives de l'infection, *Yersinia* peut être retrouvée à l'intérieur des cellules mais est principalement extracellulaire, sous forme d'agrégats les protégeant de la phagocytose (Pujol and Bliska, 2005). De façon intéressante, l'infection des animaux par voie intra-péritonéale et l'étude des macrophages prélevés au niveau du péritoine ont révélé que les souches préalablement cultivées à 28°C étaient phagocytées, tandis que les bactéries cultivées à 37°C sont résistantes à la phagocytose. Ce phénotype de résistance à la phagocytose est conféré par la présence du plasmide de virulence pYV au sein des souches de *Yersiniae.*

Les travaux *in vitro* menés par Straley et Harmon ont mis en évidence que *Y. pestis* se réplique dans un compartiment vacuolaire, décrit comme un phagosome, et que le plasmide de virulence n'est pas requis pour la réplication de *Y. pestis* au sein des macrophages du péritoine de souris (Straley and Harmon, 1984). Les études sur l'aptitude de *Y. pseudotuberculosis* à se répliquer dans les macrophages de souris *in vitro* ont révélé que, mise à part la souche YPIII qui se dirige vers un compartiment de dégradation nommé phagolysosome, toutes les autres souches testées ont été capables de se répliquer (Mills and Finlay, 1998; Pujol and Bliska, 2003).

IV.2. Régulation génétique de la réplication intracellulaire de *Yersinia*

La réplication de *Yersinia* dans les macrophages est indépendante du système de sécrétion de type III et du locus de pigmentation *pgm* contenu dans l'ilot de pathogénicité (HPI) (Straley and Harmon, 1984) . Ainsi, la survie de *Y. enterocolitica* dans les macrophages est sous le contrôle de deux gènes, *ompR* et *gsrA.* Les deux gènes codent pour deux régulateurs impliqués dans l'adaptation au changement d'osmolarité et aux différentes conditions de stress au niveau du phagosome (Yamamoto et al., 1996; Brzostek et al 2003). Le régulateur PhoP est nécessaire à la réplication bactérienne (Oyston et al., 2000). PhoP, qui appartient au système à deux composants PhoP/PhoQ, mécanisme de signalisation cellulaire, de perception et de réponse à l'environnement bactérien, est un régulateur de nombreux gènes nécessaires à la réplication de *Y. pestis* et *Y. pseudotuberculosis* dans les macrophages (Ernst et al., 1999; Oyston et al., 2000; Grabenstein et al., 2004; 2006) . PhoP est aussi un régulateur de plusieurs facteurs de virulence qui est induit au cours de l'infection de la puce permettant une infection transmissible de la bactérie (Ernst et al., 1999; Groisman, 2001; Rebeil et al., 2013). De plus, plusieurs systèmes à deux composants, notamment PhoPQ, ont été identifiés comme régulant la survie de *Y. pestis* dans les neutrophiles humains (O'Loughlin et al., 2010).

Les macrophages activés par l'interféron γ (INFγ) montrent une activité bactéricide augmentée par la production de réactif oxygéné (ROS) et d'oxyde nitrique (NO). Certains pathogènes comme *Y. pestis* ont adapté leur métabolisme afin de survivre et continuer à se répliquer dans les macrophages activés par INFγ (Pujol et al., 2005). L'opéron chromosomique *rip* code pour trois protéines (RipC, RipB et RipA) prédites pour former une enzyme qui ajuste le métabolisme de *Y. pestis* en réponse à l'activation des macrophages par détoxification du NO intracellulaire (Pujol et al., 2005).

IV.3. Trafic intracellulaire de *Yersinia*

Les premiers travaux sur le trafic intracellulaire de la vacuole contenant les *Yersiniae* (nommée dans le texte *Yersinia-containing vacuoles* : YCV) dans les macrophages primaires ont mis en évidence sa fusion avec les lysosomes et la survie de la bactérie à l'intérieur du phagolysosome (Straley and Harmon, 1984; Charnetzky and Shuford, 1985). Par la suite, il a été mis en évidence que YCV co-distribue avec les marqueurs spécifiques des endosomes tardifs ou lysosomes (LAMP1 et cathepsine D) dans la lignée de macrophages murins J774A.1 (Grabenstein et al., 2006). Ces trois études révèlent l'aptitude de *Yersinia* à se répliquer à l'intérieur d'un compartiment ayant acquis les marqueurs de la voie de dégradation. Ces études ne décrivent pas si le pH du phagolysosome est devenu acide, et donc la capacité du bacille à se répliquer en présence d'un pH acide ou à bloquer l'acidification de ce compartiment. Plus récemment, Pujol et

al ont mis en évidence que *Y. pestis* peut résider dans un autophagosome (vacuole à double membrane qui est une caractéristique de l'autophagie, voie de dégradation cellulaire) et est donc capable de prévenir l'acidification de YCV, suggérant que la bactérie échappe à la destruction par la voie lysosomale ou la xénophagie (autophagie spécifique de la dégradation de pathogène intracellulaire)(Pujol et al., 2009).

Le laboratoire a montré que dans les cellules défectives pour l'autophagie (ATG5-/-), la capacité de réplication intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis* est affectée, ce qui suggère que l'autophagie est une voie importante du trafic intracellulaire de la bactérie. En effet, l'étude du trafic intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis* dans les macrophages primaires murins (BMDM) a mis en évidence que la bactérie est contenue dans un compartiment présentant le marqueur de l'autophagie LC3 et une double membrane qui constituent les caractéristiques d'un autophagosome (Moreau et al., 2010). La bactérie se réplique dans les BMDM au sein d'un autophagosome non mature, bloqué dans son acidification (Moreau et al., 2010).

La manière dont *Y. pseudotuberculosis* contrôle le trafic membranaire au niveau de sa vacuole, mais également l'interaction de YCV avec d'autres compartiments intracellulaires n'est pas encore totalement comprise, motivant une partie des travaux présentés dans ce manuscrit.

Chapitre II : Les voies de dégradations : Autophagie et Endosome

I. Autophagie

L'autophagie, du grec αυτο (soi-même) et φαγειν (manger) est largement décrite comme un processus catabolique cellulaire, dans lequel une partie du cytoplasme est transportée vers le lysosome pour être dégradée. En 1974, Christian De Duve obtient le prix Nobel de médecine ou de physiologie pour ses travaux sur le lysosome ainsi que ceux décrivant l' *Autophagie* (de Duve, 1983). Ce terme est utilisé pour décrire le phénomène associé à la séquestration du cytoplasme dans une vacuole avec une ou deux membranes (De Duve and Wattiaux, 1966). Plusieurs études de cette époque ont présenté des images de microscopie électronique montrant des vacuoles avec deux membranes, appelées autophagosomes (Elliott and Bak, 1964; Clark, 1957; Ashford and Porter, 1962; de Duve, 1983). Déjà, l'origine des membranes donnait lieu à de nombreuses spéculations. La formation *de novo* des membranes a été considérée par quelques auteurs (Ashford and Porter, 1962), tandis que De Duve et plusieurs collaborateurs ont suggéré qu'elle provenait d'une membrane préalablement formée dans le réticulum endoplasmique lisse (de Duve, 1983). L'autophagie, processus catabolique conservé chez les cellules eucaryotes, est initialement décrite comme une voie de dégradation classique. Aujourd'hui, l'autophagie apparaît être impliquée dans de nombreux processus cellulaires, comme le maintien de l'homéostasie ou encore l'immunité innée.

Les études menées chez la levure ont permis de mettre en évidence les gènes de l'autophagie *ATG* , (pour Autophagy-Related Genes) codant pour des protéines impliquées dans la régulation et la formation de l'autophagosome (Takeshige et al., 1992). L'identification des homologues des *ATG* chez les mammifères, ainsi que la découverte de la protéine Beclin1 furent déterminantes pour la caractérisation du mécanisme moléculaire impliqué au cours de l'autophagie (Mizushima et al., 2011; Liang et al., 1999). L'implication de l'ensemble ou seulement d'une partie des protéines ATG a permis de définir deux types d'autophagies : l'autophagie dite non-canonique et celle canonique. L'autophagie non-canonique, particulièrement mise en évidence par Patrice Codogno, présente un autophagosome à double membrane mais dont la formation ne requiert pas la totalité des protéines ATG. L'autophagie canonique, la plus étudiée, requiert, pour la formation de l'autophagosome, l'intervention de manière hiérarchisée de l'ensemble des ATG (Codogno et al., 2012).

L'autophagie canonique peut être subdivisée en trois voies principales : la micro-autophagie et la macro-autophagie, présentes chez tous les eucaryotes, et l'autophagie coordonnée par des

protéines chaperonnes (*CMA Chaperone-Mediated Autophagy*) qui est retrouvée uniquement chez les eucaryotes évolués (Fig. 9)(Klionsky, 2005; Massey et al., 2006).

La micro-autophagie désigne le phénomène par lequel une partie de la membrane du lysosome s'invagine afin de se différencier en une structure tubulaire nommée « *tube autophagique* », permettant la séquestration et la dégradation d'une partie du cytosol de la cellule (Li et al., 2012). Il existe plusieurs formes de micro-autophagie sélectives : la mitophagie (élimination des mitochondries endommagées), la micropexophagie (dégradation du péroxisome), l'autophagie de portions du noyau, appelée *piecemeal microautophagy of the nucleus* (Suzuki, 2013) et la micro-autophagie par voie endosomale plus récemment décrite (Fig. 9) (Kawamura et al., 2012; Sahu et al., 2011). La micro–autophagie, comme la macro-autophagie, va favoriser la survie de la cellule dans des conditions de privation de nutriments et est associée à des pathologies humaines (Li et al., 2012).

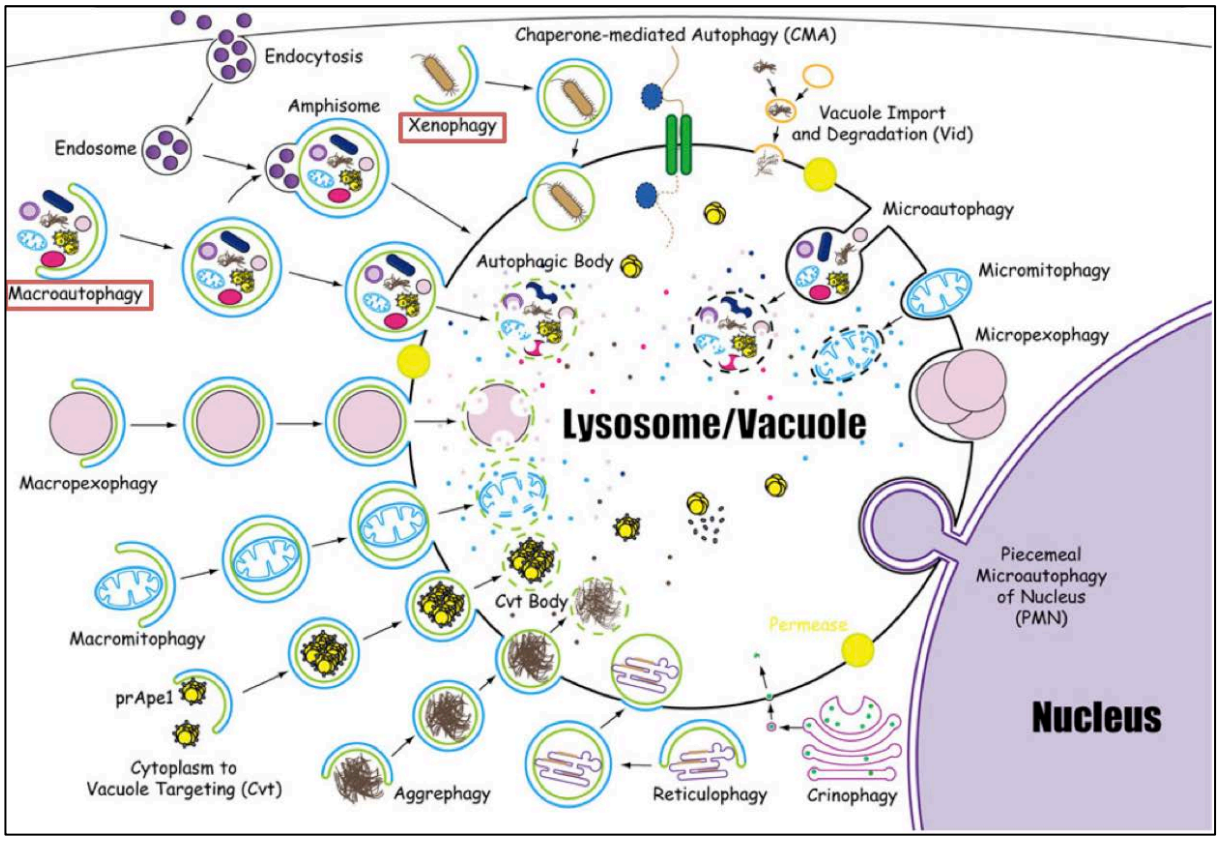


Figure 9: Quatorze formes d'autophagie. Les étapes principales des 14 formes de l'autophagie incluant la micro-autophagie, la CMA et la macro-autophagie avec notamment la xénophagie (Li et al., 2012)

L'autophagie dépendante des protéines chaperonnes (Fig. 9) est une forme relativement sélective de dégradation qui est retrouvée uniquement chez les mammifères. Seules les protéines cytosoliques présentant un motif peptidique spécifique dans leur séquence, KEFRQ (*CMA-targeting motif*), vont être dégradées à travers la voie CMA. La séquence KEFRQ et les motifs KEFRQ-like sont reconnus par un groupe de protéines chaperonnes ou co-chaperonnes, dont le membre prédominant est la protéine Hsc70, de la famille des *heat shock proteins*,

permettant leur dégradation par le lysosome. Le complexe formé se lie ensuite à la queue cytoplasmique de la protéine LAMP2A (*Lysosomal-associated membrane protein type2A*), située le long de la membrane du lysosome, conduisant ainsi à l'internalisation de la protéine à dégrader dans le lysosome (Orenstein and Cuervo, 2010; Massey et al., 2006).

Enfin, la macro-autophagie (Fig. 9) est la forme majeure de l'autophagie. Elle est présente à un niveau basal dans la plupart des cellules eucaryotes, permettant ainsi le maintien de l'homéostasie cellulaire.

I.1. La macro-autophagie

La macro-autophagie (appelée autophagie dans la suite du manuscrit) est impliquée dans la formation d'une vésicule à double membrane, l'autophagosome, séquestrant une portion du cytoplasme et qui fusionne avec le lysosome (Fig. 10). L'autophagie est présente à un niveau basal en conditions « normales », permettant la dégradation des protéines à longue durée de vie.

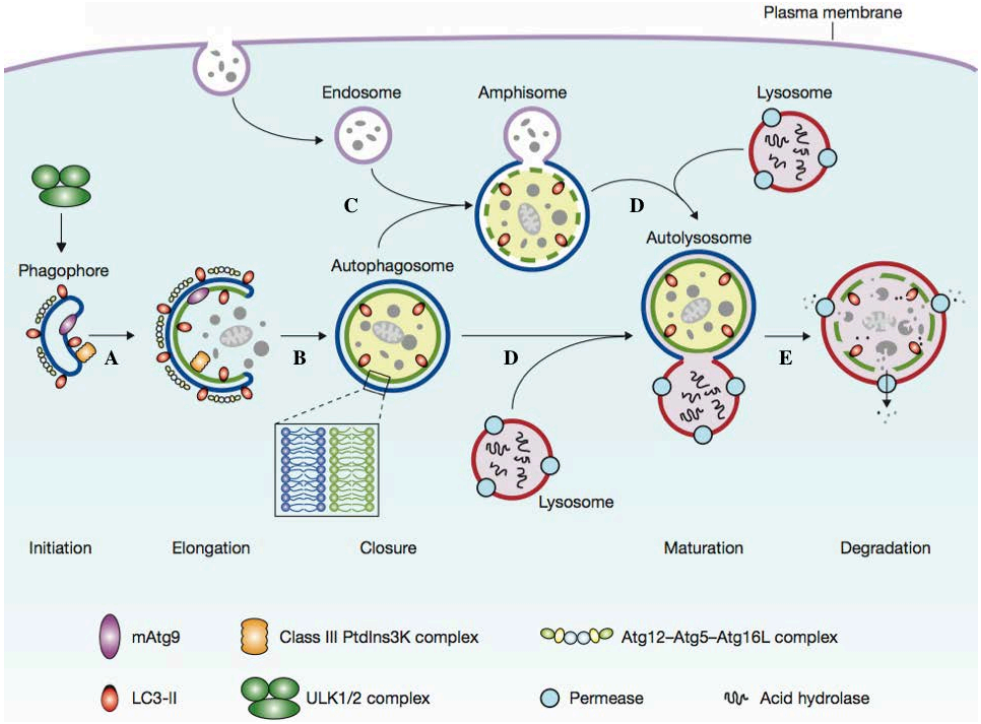


Figure 10 : Représentation schématique des différentes étapes de la macro-autophagie chez les mammifères. **(A)** Les protéines et constituants cytosoliques sont séquestrés par une membrane en extension, le phagophore. **(B)** Fermeture du phagophore, créant une vacuole à double membrane, l'autophagosome. **(C)** L'autophagosome peut interagir avec la voie endosomale par sa fusion avec un endosome, formant une vacuole à simple membrane, l'amphisome. **(D)** La fusion de l'amphisome ou de l'autophagosome avec le lysosome donne naissance à l'autolysosome. **(E)** La libération des enzymes lysosomales permet la dégradation des substrats cellulaires. (Yang and Klionsky, 2010)

L'activation de l'autophagie en condition de stress cellulaire, telles que la privation de nutriments, va permettre la dégradation des constituants cellulaires séquestrés (macromolécule, agrégats protéiques, organites altérés ou pathogènes), soit en vue de leur recyclage, soit en vue de leur élimination définitive de la cellule (Meijer and Codogno, 2004). Il existe une autophagie

dite peu ou pas sélective qui est activée en réponse à la privation de nutriments, tandis qu'une autophagie très sélective va permettre l'élimination d'organites endommagés ou de pathogènes intracellulaires indépendamment des conditions environnementales. Le contrôle de l'infection et l'élimination des pathogènes intracellulaires au travers de la voie de l'autophagie est appelé xénophagie, et sera présenté dans la suite de ce manuscrit (Levine, 2005). Environ une quarantaine de gènes *ATG* régulant l'autophagie ont été identifiés et jouent des rôles clé à différentes étapes de cette voie catabolique : initiation, élongation, maturation et fusion avec le lysosome (Fig. 10).

I.1.1. Mécanisme de formation de l'autophagosome

I.2.2.1 L'origine du phagophore

Depuis la découverte de l'autophagie, une question clé reste en suspend et donne lieu à de nombreuses discussions : quelle est l'origine des membranes formant le phagophore ? Il semblerait que ces membranes ne soient pas synthétisées *de novo* mais proviennent d'organites préexistants. Diverses études ont indiqué que le réticulum endoplasmique (RE), la mitochondrie, le Golgi, les endosomes ou la membrane plasmique pourraient être des sources potentielles de membranes nécessaires à la formation de l'autophagosome (Chang and Tang, 2013). Les études morphologiques ont mis en évidence que le phagophore apparaît intimement associé et connecté au RE (Hayashi-Nishino et al., 2009; Ylä-Anttila et al., 2009). La liaison entre une protéine du réticulum endoplasmique DFCP1 (*double FYVE domain-containing protein1*) avec la protéine PI3P au travers de son domaine FYVE, est un marqueur du site d'assemblage de l'autophagosome au niveau du réticulum endoplasmique (Axe et al, 2008). L'activation de l'autophagie suite à une privation de nutriment entraine la translocation de la protéine DFCP1 et de son domaine FYVE au niveau de structure riche en PI3P, co-localisant partiellement avec des marqueurs de l'autophagosome (Axe et al, 2008). Les auteurs ont appelé omégasome ces structures riches en PI3P et en protéines du RE. Les omégasomes sont une source de membranes pour l'accumulation des protéines autophagiques et sont impliqués dans la biogénèse de l'autophagosome (Fig. 12). Cependant, les auteurs n'observent pas une co-localisation totale entre les autophagosomes et les omégasomes, suggérant l'existence d'autres sources de membranes donneuses (Axe et al., 2008).

L'étude de Hailey et al, a démontré que la mitochondrie pouvait contribuer à l'apport de membranes et lipides necessaires à la formation de l'autophagosome (Hailey et al, 2010). Les auteurs montrent que suite à l'induction de l'autophagie par privation de nutriments, les protéines autophagiques ATG5 et LC3 sont séquentiellement recrutées au niveau de la mitochondrie, et que des lipides mitochondriaux sont transférés vers l'autophagosome (Fig. 12) (Hailey et al, 2010). De plus, cette étude est la première à suggérer l'implication du site de

contact RE-mitochondrie dans la formation de l'autophagosome. Les récents travaux de Hamasaki montrent la liaison entre la protéine SNARE syntaxine 17 et ATG14 et leurs recrutement au niveau du site de contact RE-mitochondrie, confirmant ainsi l'importance de ce site de contact dans la biogénèse de l'autophaogosome (Hamasaki et al, 2013).

L'appareil de Golgi et les endosomes pourraient être des sources de membranes pour la formation de l'autophagosome, par la génération de vacuoles contenant ATG9. Chez la levure, la protéine ATG9 peut résider dans le cytoplasme à l'intérieur de vacuoles dérivant de l'appareil de Golgi, et peut être intégré de manière transitoire aux membranes de l'autophagosome (Fig. 12) (Yamamoto et al., 2012). Chez les mammifères, l'homoloque d'ATG9 (mATG9) a été montré associé à des structures tubulaires, lesquelles sont identifiées comme des *endosomes-like* dus à la présence d'un des marqueurs des endosomes, le récepteur à la transferine (Orsi et al., 2012). De plus, les structures positives pour mATG9 interagissent de manière transitoire avec le phagophore permettant l'expansion des membranes (Orsi et al., 2012).

Enfin, la membrane plasmique est également une source de membranes impliquée au cours de la formation de l'autophagosome. En effet, le mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine est impliqué dans la formation des précurseurs d'autophagosome associés avec ATG16L1, au travers de l'interaction entre cette protéine autophagique et la clathrine (Fig. 12) (Ravikumar et al, 2010). Il semblerait donc qu'il y ait différentes sources possibles de membranes impliquées dans la formation de l'autophagosome, lesquelles pourraient être sollicitées en fonction des stimuli et du type d'autophagie.

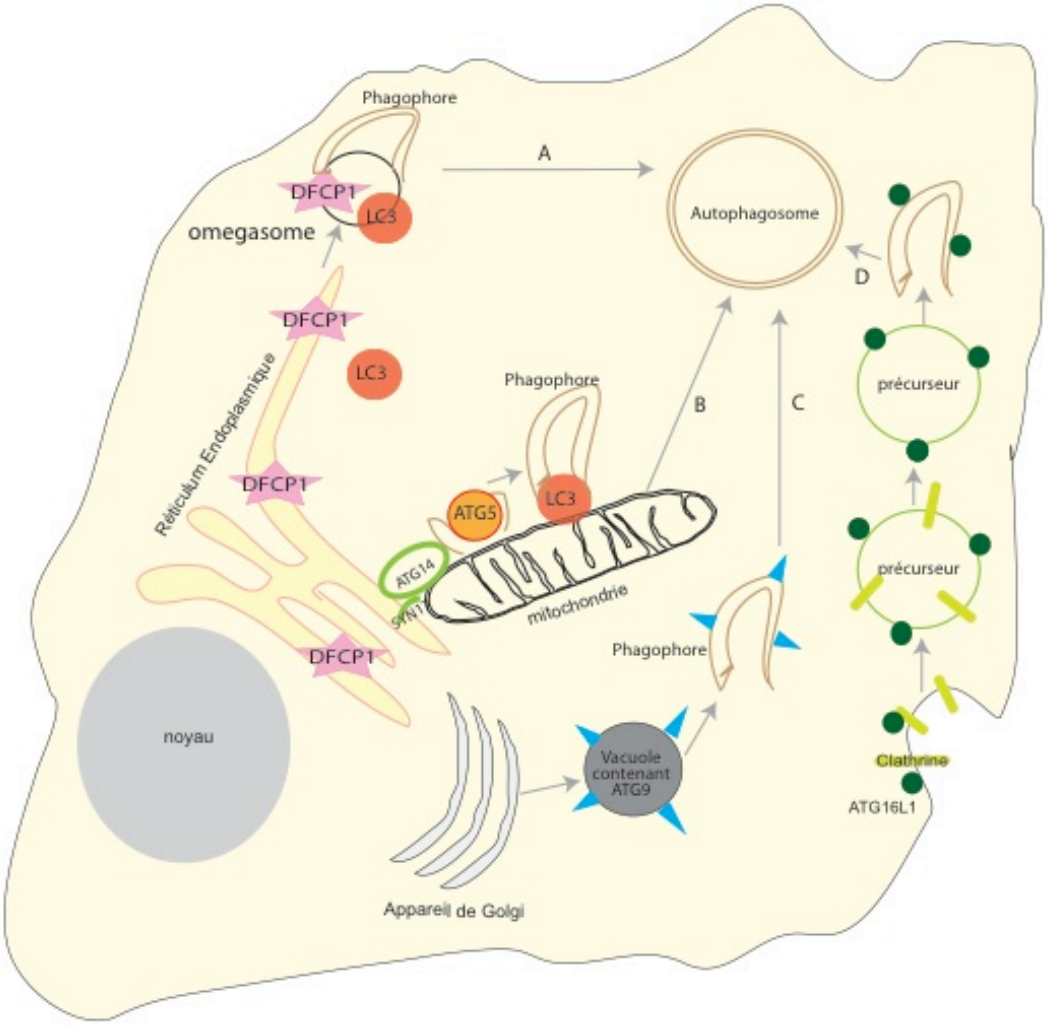


Figure 11: Les différentes sources possibles de membranes nécessaires pour la formation du phagophore. Sources des membranes : (A) provenant du RE, avec l'omégasome qui est une strucuture riche en DFCP1 et PI3P. (B) De la mitochondrie, avec la formation de l'autophagosome le long de la mitochondrie et l'importance du site de contact RE-mitochondrie. (C) Les vacuoles contenant ATG9 formées à partir du Gogli et des endosomes présentent une interaction dynamique avec le phagophore permettant l'expansion des membranes. (D) La membrane plasmique participe à la formation des précurseurs d'autophagosomes par l'interaction de ATG16L1 avec la clathrine dans un mécanisme d'endocytose dépendant de la clathrine.

I.2.2.2 L'initiation

L'autophagie est une voie inductible lors de conditions de stress et dont le principal régulateur est la sérine/thréonine kinase mTOR (pour *mammalian Target of rapamycin*). En présence de nutriments, la protéine mTOR hyper-phosphoryle les protéines ULK1/2 et ATG13, permettant la liaison du complexe ULK (ULK1/2-Atg13 -FIP200-ATG101) avec la kinase mTOR, et inhibe ainsi l'autophagie (Fig. 12). L'inhibition de la kinase mTOR, en conditions de stress (privation de nutriments, pathogènes intracellulaires) ou sous l'effet de drogues comme la rapamycine, entraîne sa dissociation du complexe ULK, ce qui permet la déphosphorylation partielle des protéines ATG13 et ULK1/2. L'activité kinase ULK1/2 permet la phosphorylation des protéines FIP200 et ATG13, entraînant le recrutement du complexe ULK à la membrane du phagophore

(Fig. 12) (Chang and Neufeld, 2010; He and Klionsky, 2009; Chen and Klionsky, 2011). La protéine ATG101 permet la stabilisation du complexe ULK par son interaction avec ATG13.

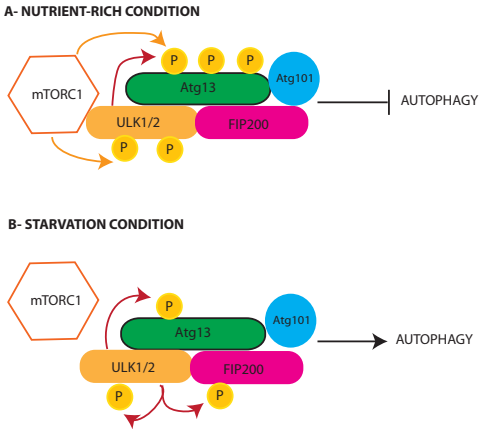


Figure 12: Régulation du complexe ULK1/2 par la protéine mTOR. En présence de nutriments, la protéine mTOR est associée avec les protéines du complexe ULK, constituées des protéines ATG13, ULK1/2 et FIP200. mTOR phosphoryle ATG13 et ULK1/2 (Flèche orange). Cette dernière s'autophosphoryle et phosphoryle ATG13, inhibant la voie de l'autophagie (A). En conditions de privation de nutriments, mTOR se dissocie du complexe ULK, entraînant une diminution de la phosphorylation d'ATG13 et induisant celle de FIP200 par ULK1/2, avec pour conséquence l'activation de l'autophagie (B).

L'initiation de l'autophagie n'est pas uniquement sous le contrôle du complexe ULK ou induite en réponse à une variété de stimuli, puisque la cascade de l'autophagie peut-être régulée par d'autres protéines telles que l'AMPK (*AMP-activated protein kinase)*, eIF2α (*eukaryotic initiation factor 2*α), p53, IP3R (*inositol tri-phosphate receptor*) , le calcium intracellulaire, IRE-1 (*inositol requiring enzyme-1)* ou encore JNK-1 (*c-jun- N-terminal-kinase 1)* (Levine and Kroemer, 2008).

I.2.2.3 Nucléation

Dans cette étape initiale, les protéines et lipides nécessaires à la formation de l'autophagosome sont recrutés au niveau du site d'assemblage pour le phagophore (*PAS*), dont le concept dérive des observations effectuées chez la levure (Suzuki et al., 2001). Dans les cellules de mammifères, il n'existe pas un mais de multiple sites PAS au sein du cytoplasme (Weidberg et al., 2011). De nombreuses protéines ATG participent à la formation de l'autophagosome, ce qui nécessite une fine régulation de la coordination et l'intervention séquentielle de ces protéines. La formation du phagophore est initiée par le complexe phosphatidylinositol 3-kinase de type III (PI3K-III), constitué des sous-unités Vps34, Vps15 et Bécline-1 (Fig. 13). L'activation de ce complexe permet le recrutement au phagophore des protéines WIPI-α et ATG9, nécessaires à l'apport de membranes à l'autophagosome en croissance (Fig. 13). Les protéines ATG sont sous une forme inactive libre dans le cytoplasme, sauf la protéine ATG9, une protéine transmembranaire localisée dans le réseau trans-Golgien et qui échange du matériel avec le système endosomal (Noda et al., 2000). ATG9 est un régulateur de l'induction de l'autophagie et intervient dans les

étapes précoces de formation de l'autophagosome (Fig. 13) (Yamamoto et al., 2012; Mari et al., 2010). Chez la levure, les protéines Atg23 et Atg27 sont requises pour le transport d'Atg9 du Golgi vers le PAS (Legakis et al., 2007). Quant à la protéine GTPase Ypt1 (homologue de Rab1 chez l'humain), elle interagit avec Atg11, qui est requise pour l'adressage et la liaison de ATG9 avec le PAS (He et al., 2006; Lipatova et al., 2012). Le trafic d'ATG9 est sous le contrôle d'ATG1, ATG2, ATG18 et ATG17, qui permettent le détachement d'ATG9 des membranes de l'autophagosome formé (Reggiori et al., 2004; Cheong et al., 2005).

De plus, la transduction du signal de la PI3K se fait grâce à des effecteurs, tels que la famille de protéines WIPI (*WD-40 repeat containing protein that interacts with PtdIns,* homolgues de *Atg18* chez la levure). Les protéines WIPI vont faciliter la formation de l'autophagosome par leurs interactions avec la PI3P, permettant alors le recrutement des deux systèmes de conjugaison responsables de l'élongation du phagophore (Fig. 13) (Mauthe et al., 2011).

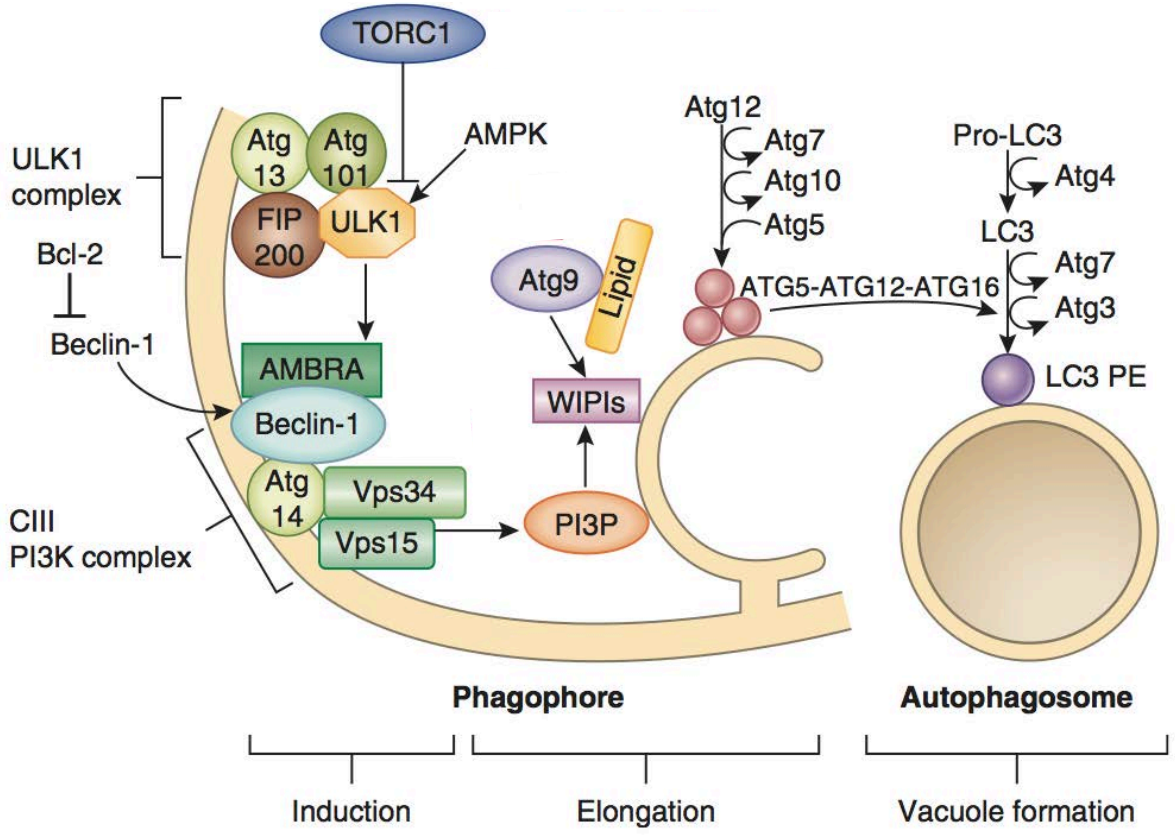


Figure 13 : Formation de l'autophagosome : Les complexes ULK et PI3KIII initient la formation du phagophore. Puis les protéines ATG9 et WIPI sont recrutées pour permettre l'expansion des membranes. Le premier système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16 s'associe à la membrane externe du phagophore et contrôle la liaison entre LC3 et le PE, permettant la formation de l'autophagosome. Modifié d'après Nixon (Nixon, 2013).

I.2.2.4 Élongation

Deux systèmes de conjugaison impliquant les *Ubiquitin-like* protéines ATG12 et ATG8 sont indispensables à l'étape d'élongation du phagophore. La protéine ATG12 est conjuguée de manière covalente et irréversible avec ATG5. La formation du complexe ATG12–ATG5 est

régulée par les ATG7 et ATG10 (Fig. 13), qui sont deux enzymes respectivement *E1-like* et *E2-like* (Mizushima et al., 1998). En plus de sa liaison avec ATG12, ATG5 se fixe au domaine *coiled coil* d'ATG16 de façon non covalente. Le complexe macromoléculaire ATG12-ATG5-ATG16 est présent au niveau de la membrane externe du phagophore en expansion (Fig. 13) (Romanov et al., 2012). Ce complexe va contrôler la liaison entre ATG8 et la phosphotidylethanolamine (PE), créant ainsi la forme associée aux membranes de l'autophagosome ATG8-PE (Fig. 13). La première étape de la conjugaison d'ATG8 est la protéolyse de son résidu arginine en C-terminal par la cystéine protéase ATG4, exposant ainsi un résidu glycine accessible à ATG7. Ceci active ATG8, induisant ainsi son transfert sur ATG3 et sa conjugaison avec la PE par une liaison amide. Le complexe macromoléculaire ATG12-ATG5-ATG16 contrôle ensuite l'incorporation d'ATG8-PE dans la membrane du phagophore (Fig. 13) (Noda et al., 2008). La conjugaison d'ATG8-PE est réversible puisqu'ATG4 peut de nouveau cliver ATG8 après le résidu glycine, et libérer ainsi le PE. Il existe plusieurs homologues d'ATG8 chez les mammifères, dont les plus connus sont GATE16, GABARAP et MAP1LC3 (*microtubule associated protein light chain 3 ou LC3*). Ces protéines sont modifiées de la même manière qu'Atg8 et sont, tout comme celle-ci, retrouvées au niveau de l'autophagosome mature (Kabeya et al., 2000; 2004). Les protéines ATG5, ATG12, et ATG16 se dissocient des membranes juste après formation complète de l'autophagosome, tandis que LC3, conjugué avec le PE, reste associée aux autophagosomes matures. La protéine LC3B est le marqueur le plus communément utilisé pour identifier les autophagosomes matures (Klionsky et al., 2012).

Il existe une voie alternative de l'autophagie, qui ne requiert ni la protéine ATG9 pour l'initiation de la formation de l'autophagosome, ni même l'ensemble des protéines des systèmes de conjugaison (ATG5, ATG7 et ATG8) pour l'élongation du phagosome. La progression de cette voie autophagique est dépendante de la protéine Rab9 (Nishida et al., 2009a; Codogno et al., 2012; Shimizu et al., 2010).

I.2.2.5 Fusion avec lysosome

La fusion de l'autophagosome et du lysosome donne naissance à l'autolysosome. L'autolysosome est le lieu de dégradation par les enzymes lysosomales des constituants cellulaires séquestrés par l'autophagie. La fusion entre le lysosome et l'autophagosome est régulée par l'association de la protéine UVRAG avec le complexe Beclin1-VPS34-VPS15. À l'inverse, la liaison d'UVRAG avec la protéine RUBICON et le complexe Beclin1-VPS34-VPS15 inhibe la maturation de l'autophagosome (Liang et al., 2008). Les protéines de membrane du lysosome LAMP2 et LAMP1 seraient également impliquées dans la fusion de l'autophagosome avec le lysosome (Liang et al., 2008; Tanaka et al., 2000). Les protéines SNARE constituant la machinerie de fusion vacuolaire sont impliquées elles aussi dans la fusion de l'autophagosome et du lysosome (l'implication des

SNARE dans la voie de l'autophagie sera plus longuement discutée dans le Chapitre III)(Moreau et al., 2013).

L'ensemble des étapes de formation de l'autophagosome et l'activation ou l'inhibition de l'autophagie nécessite une régulation fine.

I.1.2. Régulation de l'autophagie

L'autophagie est caractérisée par sa sensibilité à de nombreux stimuli pouvant être transmis par différentes voies de signalisations moléculaires, impliquant ainsi une fine régulation de son activation ou, *a contrario,* de son inhibition. La protéine mTOR, exprimée aussi bien chez la levure que chez les mammifères, est un bon candidat pour être un régulateur clé de l'autophagie, d'une part car il s'agit d'un senseur des acides aminées et de l'ATP, mais aussi par sa capacité à intégrer les stimuli hormonaux à travers la voie PI3K (Meijer and Codogno, 2004).

Après la caractérisation de l'autophagie, le glucagon fut rapidement mis en évidence comme un inducteur de cette voie, tandis que l'effet inhibiteur de l'insuline n'a été démontré que dix ans plus tard (Deter and de Duve, 1967; Pfeifer 1977). L'implication de ces deux hormones dans le métabolisme corrobore le rôle catabolique de l'autophagie. L'un des produits finaux de la voie de dégradation de l'autophagie, les acides aminés, a été mis en évidence comme ayant un effet inhibiteur sur cette voie (Mitchener et al., 1976). En effet, la disponibilité d'acides aminés va entraîner l'inhibition de la formation de l'autophagosome, étape contrôlée par la protéine mTOR. L'utilisation de la rapamycine, inhibiteur de mTOR, va conduire à l'induction de l'autophagie, donnant ainsi la preuve de l'importance de cette protéine dans la régulation de l'autophagie (Blommaart et al., 1995). Plusieurs études ont mis en évidence l'effet inhibiteur d'un certain nombre de composés pharmacologiques tels que la bafilomycine A1 (Yamamoto et al., 1998), la 3-methyladenine ou la wortmanine, agissant à différente étapes de la voie de l'autophagie. Ces deux derniers composés ne régulent pas la voie autophagique par un effet sur mTOR mais en inhibant la protéine kinase PI3K (Blommaart et al., 1997). Au contraire, la bafilomycine A1 est un inhibiteur de la V-ATPase, bloquant l'acidification et donc la fusion de l'autophagosome avec le lysosome et empêchant ainsi la formation de l'autolysosome (Klionsky et al., 2011). L'autolysosome est le lieu de la dégradation des constituants cellulaires séquestrés. C'est pour cette raison que l'autophagie joue un rôle essentiel dans de multiples processus physiologiques, incluant survie, différentiation, homéostasie de la cellule mais également l'élimination de pathogènes intracellulaires. On parle alors de xénophagie (Levine and Kroemer, 2008; Deretic and Levine, 2009).

I.2. Xénophagie

L'importance de l'autophagie dans la dégradation de constituants du cytosol implique qu'elle joue de nombreux rôles dans la réponse immunitaire innée et adaptative (Deretic and Levine, 2009). Dans certains cas, l'autophagie est un mécanisme de dégradation directe des pathogènes intracellulaires (bactéries, protozoaire, virus) ou de l'un de leurs composés présents dans le cytosol. En effet, les membranes de l'autophagosome séquestrent le pathogène du cytosol et l'acheminent vers la voie de dégradation lysosomale. Les protéines adaptatrices de l'autophagie permettent la reconnaissance spécifique de pathogènes intracellulaires par cette voie. Au contact des constituants de la machinerie de l'autophagie, ces derniers ont développé un grand nombre de stratégies pour contrecarrer cette voie de dégradation, voire même la détourner à leur avantage.

I.2.1. Virus

La relation entre la voie de l'autophagie et les virus a été étudiée dans plus de cinquante espèces de virus appartenant aussi bien à la famille des virus à ADN qu'à ARN (Dong and Levine, 2013). La voie de l'autophagie et/ou les composants de sa machinerie vont jouer un rôle antiviral et participer à la restriction de la virulence de quelques virus. Néanmoins, la présence d'une particule virale séquestrée à l'intérieur de l'autophagosome a été peu observée. Le *Sindbis virus* peut être spécifiquement éliminé par l'autophagie (Dong and Levine, 2013). En effet, l'autophagie dépendante d'ATG5 permet de protéger le système nerveux central de souris de l'infection par *Sindbis virus* (Dong and Levine, 2013). La reconnaissance du micro-organisme par les récepteurs cellulaires va induire l'internalisation du virus et peut également directement induire l'autophagie, étape importante pour le contrôle de l'infection. Pour éviter cette voie de dégradation, de nombreux virus ont développé des stratégies d'échappement à l'autophagie. Par exemple, le virus de l'herpes simplex de type 1 produit une protéine neuro-virulente, ICP34.5, qui interagit avec la protéine Beclin1 pour inhiber l'autophagie (Orvedahl et al., 2007). *A contrario,* et afin d'augmenter leur réplication virale, certains virus n'inhibent pas l'autophagie mais l'exploitent voire la stimulent. L'induction de l'autophagie est importante pour le cycle viral de l'hépatite C (HCV), notamment pour initier sa réplication (Dreux et al., 2009). De plus, l'infection par HCV déclenche une réponse autophagique incomplète par son aptitude à inhiber la fusion entre l'autophagosome et le lysosome, bloquant ainsi leur dégradation (Dong and Levine, 2013). Le virus de la rougeole atténué induit successivement différentes phases d'autophagie associées à des voies de signalisation différentes. La première phase de l'autophagie est rapidement mise en place et est dépendante de l'interaction de ses récepteurs

cellulaires, CD46 et GOPC, et du complexe Beclin1-VSP34. La seconde phase est induite suite à l'expression de la protéine non structurale C du virus de la rougeole ; elle est soutenue. Enfin, la formation de syncytia au cours de l'infection par le virus de la rougeole jouerait un rôle important dans cette phase de l'autophagie. De plus, les auteurs ont également mis en évidence que cette seconde phase retardée mais prolongée de l'autophagie est induite au cours de l'infection par une souche virulente du virus de la rougeole (Joubert et al., 2009; Richetta et al., 2013). Certain virus exploitent les protéines ATG dans un processus indépendant de l'autophagie. Une étude a révélé que le coronavirus MHV (virus de l'hépatite murine) utilise la forme non lipidée de LC3/Atg8 dans un mécanisme indépendant de la voie de l'autophagie, afin de générer la vacuole à double membrane (DMV) requise pour sa réplication (Reggiori et al., 2010).

Certains mécanismes utilisés par les virus pour échapper à l'autophagie sont également mis en œuvre par les bactéries.

I.2.2. Bactéries

Une des premières réponses cellulaires de défense contre les bactéries pathogènes mise en place quelques minutes ou quelques heures après leur entrée dans la cellule hôte est la xénophagie, qui va emprisonner et délivrer la bactérie intracellulaire à la voie de dégradation lysosomale. L'autophagie a longtemps été considérée comme une voie de dégradation non sélective, mais de nombreux types d'autophagie sélective ont été récemment décrits. Par exemple, l'autophagosome peut séquestrer de manière sélective les pathogènes intracellulaires (Jo et al., 2013).

I.2.2.1 Reconnaissance sélective des bactéries

L'autophagie joue un rôle spécifique dans la reconnaissance sélective des bactéries intracellulaires au travers de l'accumulation de l'ubiquitine, de la galectine ou/et des adaptateurs de l'autophagie.

I.2.2.1.1 Ubiquitine (Review, Ligeon et al 2010, Annexe 1)

L'ubiquitine est une petite protéine de 76 acides aminés se conjuguant à un substrat dans un mécanisme appelé ubiquitination, créant ainsi un signal « eat-me »(Boyle and Randow, 2013). Chez les eucaryotes supérieurs, l'ubiquitination est une condition *sine qua non* pour la reconnaissance du substrat et son adressage vers une autophagie sélective. L'influence de l'ubiquitine dans la xénophagie, et ce dans un contexte d'invasion bactérienne, a clairement été décrite dans plusieurs études (Perrin et al., 2004; Shahnazari and Brumell, 2011; Dupont et al., 2010). Similairement aux agrégasomes de protéines qui sont ubiquitinés avant d'être engloutis

par l'autophagosome, les bactéries qui ont détruit leur vacuole et se retrouvent libres dans le cytosol peuvent être ciblées et conjuguées avec une dense chaîne de polyubiquitine (Perrin et al., 2004). La polyubiquitination des protéines observées autour des *Salmonella* cytoplasmiques constitue un signal de reconnaissance et d'adressage vers la voie autophagique (Fig. 14) (Veiga and Cossart, 2005; Birmingham et al., 2006). À l'heure actuelle, la nature des protéines de surface des salmonelles et/ ou des protéines de l'hôte situées à proximité de la bactérie qui vont être ubiquitinées n'est pas connue. La formation du manteau d'ubiquitine des bactéries nécessite une *E3 ligase* pouvant également jouer le rôle de PRR (*pattern recognition receptor*) (Randow and Münz, 2012). La protéine LRSAM1 est la première ubiquitine *E3 ligase* identifiée comme pouvant jouer le rôle de PRR et reconnaître des bactéries cytosoliques au travers de son domaine LRR (*Leucine rich repeat)* (Celli, 2012). De plus, LRSAM1 a surtout été montrée comme la première *E3 ligase* pouvant déclencher la ligation de chaîne d'ubiquitine sur *Salmonella enterotica* serovar Typhimurium, contribuant à sa capture par l'autophagie et à la restriction de sa prolifération (Huett et al., 2012; Celli, 2012). L'association de l'ubiquitine avec la bactérie intracellulaire se fait selon l'hypothèse que l'autophagie antimicrobienne requiert un mécanisme dépendant de l'ubiquitine pour la reconnaissance et la dégradation du cargo autophagique. Une étude menée chez *S. Typhimurium* a mis en évidence que seulement cinquante pour cent des bactéries présentent un manteau d'ubiquitine, suggérant la possible existence d'une seconde voie permettant l'autophagie (Shahnazari et al., 2011). Il a été observé que les *Salmonella* positives pour LC3 colocalisent soit avec l'ubiquitine soit avec le diacylglycerol (DAG), indiquant le rôle de ce dernier dans la régulation de la xénophagie de *Salmonella* (Shahnazari et al., 2010)

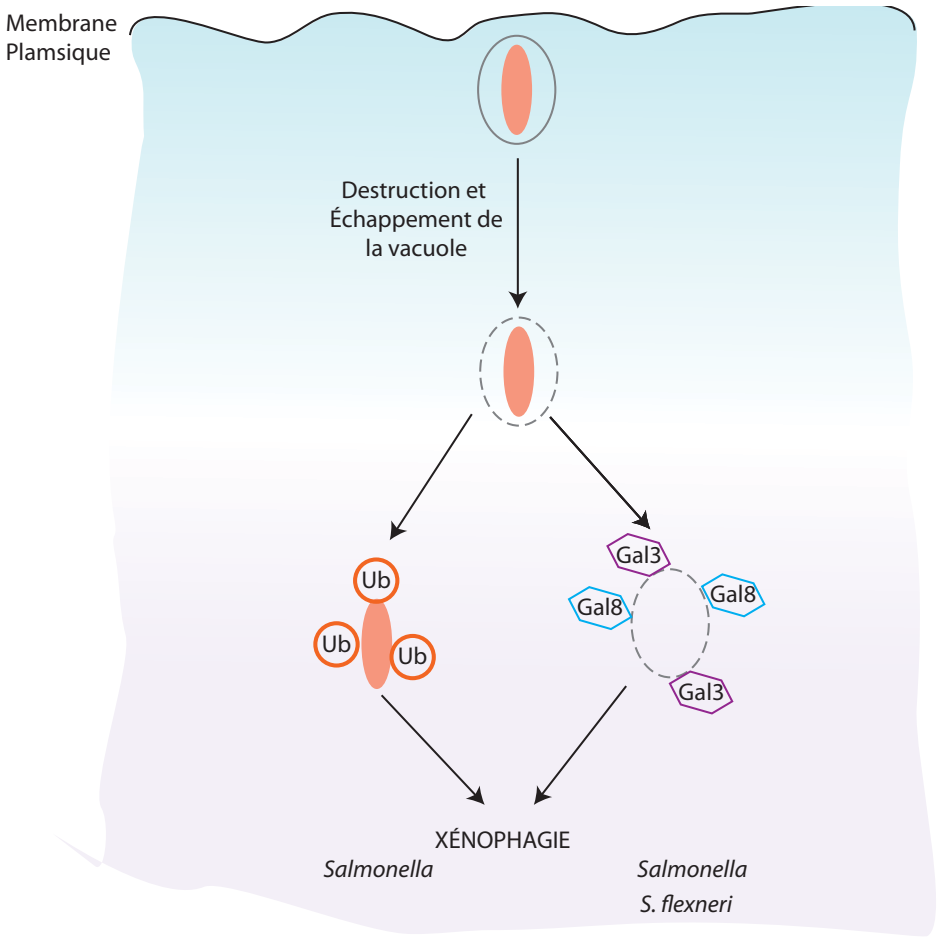


Figure 14 : Signal "eat-me": Après échappement de leur vacuole, les bactéries cytosoliques comme *Salmonella* peuvent être ciblées par l'ubiquitine (Ub) qui joue le rôle de messager et permet leur dégradation par la xénophagie. Les vestiges membranaires vont être reconnus par la galectine 3 (Gal3) et/ou la galectine 8 (Gal8) pour être adressés vers la voie de l'autophagie.

Un autre signal de « eat-me » indépendant de l'ubiquitine et conduisant à la capture du pathogène ou des vestiges membranaires de sa vacuole a été mis en évidence (Fig. 14). En effet, les galectines 3 et 8 sont respectivement impliquées dans la reconnaissance des vestiges membranaires des vacuoles de *Shigella flexneri* et *S. Typhimurium* permettant leur capture par l'autophagie (Fig. 14) (Dupont et al., 2009; Thurston et al., 2012). L'ubiquitine et les galectines sont des signaux « *eat-me* » qui peuvent être reconnus par les protéines adaptatrices de l'autophagie.

I.2.2.1.2 Protéine adaptatrice de l'autophagie

Les principales protéines adaptatrices de l'autophagie ou récepteurs connus pour être engagés dans l'autophagie sélective sont NDP52 (nuclear dot protein52), p62 (SQSTM1 sequestosome1), NBR1 (neighbor of BRCA1 gene 1), optineurine (OPTN) (Fig. 15)(Jo et al., 2013) . Ces récepteurs permettent le lien entre l'ubiquitine ou la galectine et la protéine LC3, facilitant la dégradation des substrats par la voie de l'autophagie (Shaid et al., 2012).

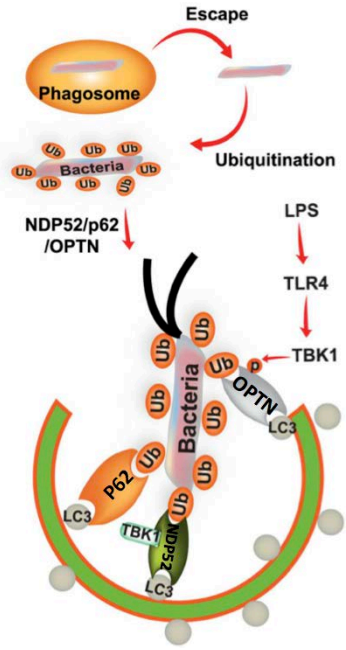


Figure 15 : Les différents adaptateurs protéiques impliqués dans l'autophagie sélective. Xénophagie induite par une bactérie ubiquitinée. L'ubiquitine est reconnue et permet le recrutement des protéines adaptatrices, telles que NDP52, p62 et OPTN. Ce recrutement résulte en leur translocation vers l'autophagosome en formation. Les protéines adaptatrices interagissent avec l'ubiquitine et LC3 (Jo et al., 2013).

La protéine p62 est l'adaptateur le plus étudié et est impliquée dans la sélection d'une variété de substrats ubiquitinés tels que les mitochondries endommagées ou des bactéries (Johansen and Lamark, 2011; Zheng et al., 2009). Le domaine UBA de p62 reconnaît la mono-ubiquitine K48 ou les chaînes de polyubiquitine K63. La protéine p62 est recrutée et s'associe avec l'ubiquitine située à la surface de *Salmonella* qui est par la suite ciblée par l'autophagie (Fig. 15) (Zheng et al., 2009). Les adaptateurs NDP52 et OPTN vont également reconnaître les *Salmonella* ubiquitinées et permettre leur localisation à l'intérieur de l'autophagosome en formation (Fig. 15) (Thurston et al., 2009; Wild et al., 2011). Les trois adaptateurs sont recrutés de manière indépendante et sont impliqués dans la restriction de la croissance de *Salmonella,* mais dans un mécanisme non redondant puisque la déplétion de l'un d'entre eux a pour conséquence une hyper prolifération de la bactérie (Thurston et al., 2009; Wild et al., 2011; Zheng et al., 2009). NDP52 participe à l'immunité innée contre les pathogènes intracellulaires, en reliant la voie de signalisation TBK1 (sérine/thréonine kinase ayant une activité antibactérienne) et celle de l'autophagie (Fig. 15) (Thurston et al., 2009). De plus, le recrutement de TBK1 entraîne la liaison de LC3 avec OPTN en fonction de la phosphorylation d'une sérine du domaine LIR de la protéine OPTN (Fig. 15) (Wild et al., 2011). *S. Typhimurium*, en plus d'être ciblée par l'ubiquitine, est également associée avec la galectine 8 qui se lie directement avec NDP52, elle même liée de manière spécifique avec la forme LC3C, ce qui permet ainsi la xénophagie (Thurston et al., 2012) (Muhlinen et al., 2012). D'autres bactéries vont détruire leur vacuole et se retrouver libres dans le cytoplasme comme *S. flexneri* et *Listeria monocytogenes.* De manière intéressante, les deux adaptateurs de

l'autophagie, NDP52 et p62, engagent *S. flexneri* et le mutant *ActA* de *L. moncytogenes* vers la voie de l'autophagie en utilisant des mécanismes différents (Mostowy et al., 2011). Les vestiges membranaires de la vacuole de *S. flexneri* polyubiquitinés sont reconnus par p62 et adressés à la voie de l'autophagie pour la dégradation (Dupont et al., 2009). Nous avons également montré que ces vestiges sont associés avec l'adaptateur NDP52 qui co-localise à la fois avec le marqueur des vestiges membranaires, la galectine 3, mais aussi l'ubiquitine et p62, permettant ainsi leur adressage du complexe vers la voie autophagique (Ligeon et al., 2011).

I.2.2.2 Manipulation de l'autophagie par les bactéries

L'autophagie limite la réplication de certaines bactéries pouvant être situées dans des compartiments différents. L'autophagie cible *S. Typhimurium* localisée dans sa vacuole « endommagée », comme le montre la colocalisation des marqueurs vacuolaires avec la protéine de l'autophagie LC3 (Birmingham et al., 2006). Directement après l'échappement de leur vacuole grâce à la lyse des membranes par la stréptolysine O, les *Streptococcus* du groupe A (GAS) sont libres dans le cytoplasme où les bactéries seront ciblées par l'autophagie. Les GAS sont séquestrés à l'intérieur d'un autophagosome fusionnant par la suite avec le lysosome pour dégrader les bactéries (Fig. 16) (Nakagawa et al., 2004). Des fibroblastes ATG $5^{-/-}$ sont permissibles à la réplication de GAS, démontrant ainsi le rôle de l'autophagie dans la dégradation de la bactérie (Nakagawa et al., 2004). Les mécanismes par lesquels l'autophagie est apte à sentir les pathogènes dans différents compartiments cellulaires ne sont pas encore tout à fait compris et connus. Au contact de cette voie de dégradation, plusieurs bactéries pathogènes intracellulaires ont évolué et mis en place différentes stratégies pour échapper à cette voie. À l'heure actuelle, seulement une petite partie de la mécanistique d'échappement est connue. Après la rupture de leur vacuole, les pathogènes circulant dans le cytoplasme se retrouvent la cible de l'autophagie. Afin d'éviter cette voie, *Shigella* inhibe directement certaines protéines autophagiques et *Listeria* masque sa reconnaissance en recrutant des protéines hôtes. En effet, directement après l'échappement de sa vacuole, *S. flexneri* crée une comète d'actine en polymérisant l'actine à l'aide de sa protéine VirG (IscA). VirG est reconnue par la protéine autophagique de l'hôte, ATG5, qui se lie au complexe Tecpr1-Wipi2, permettant la liaison avec l'autophagosome (Fig. 16) (Ogawa, 2005; Ogawa et al., 2011). La bactérie contrecarre l'attaque de l'autophagie au moyen d'une protéine sécrétée par son appareil de type III (T3SS), IcsB, se liant à VirG et bloquant ainsi sa reconnaissance par ATG5 (Ogawa, 2005). Dans le cas de *L. monocytogenes* la protéine ActA analogue de VirG recrute le système de polymérisation de l'actine de l'hôte, constitué du complexe protéique Arp2/3, actine et VASP, tandis que l'internaline InlK recrute les protéines *major vault protein* (constituants des ribonucléoprotéines) (Fig. 16) (Yoshikawa et al., 2009; Dortet et al., 2011).

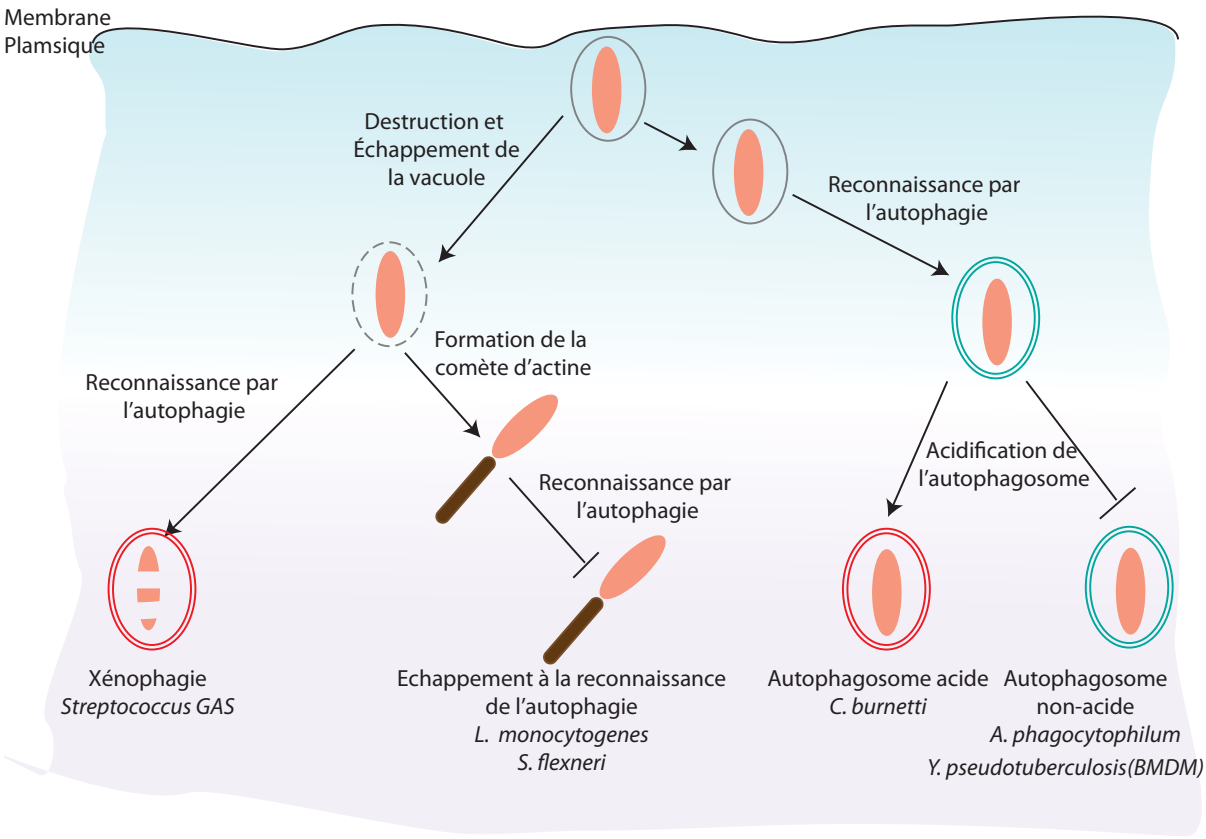


Figure 16 : Les différents mécanismes d'échappement des bactéries à la xénophagie. Après échappement de leur vacuole, les *Streptococcus* du groupe A sont séquestrés dans un autophagosome et dégradés, alors que *S. flexneri et L. monocytogenes* polymérisent l'actine afin de créer une queue d'actine leur permettant d'être mobiles dans la cellule, et ainsi d'échapper à la reconnaissance par l'autophagie. Les bactéries vacuolaires sont ciblées par l'autophagie et séquestrées dans un autophagosome. Certaines bactéries ont développé une résistance à l'acidité, comme *C. burnetti*, tandis que d'autres bloquent la maturation de l'autophagosome. C'est le cas d'*A phagocytophilum et Y. pseudotuberculosis* (dans les BMDM).

Une autre stratégie mise en place par les bactéries est de "pirater" l'un des compartiments de l'autophagie pour y établir une niche de réplication. Quelques bactéries ont développé une résistance à l'acidité leur permettant de résider et de se répliquer à l'intérieur de l'autophagolysosome. Par exemple, *Coxiella burnetii* se réplique au sein d'une large vacuole acide et riche en hydrolases, où les marqueurs de l'autophagie tels que Beclin1 et LC3 sont présents (Fig. 16). La modulation de l'autophagie par des drogues inhibitrices ou activatrices a un effet direct sur la réplication de la bactérie. En effet, l'induction de l'autophagie permet d'augmenter le nombre et la taille des vacuoles contenant la bactérie, ce qui confirme l'importance du détournement de cette voie par *C. burnetii* (Romano et al., 2007; Vázquez and Colombo, 2010). Tandis que cette espèce bactérienne a développé une résistance à l'acidité, d'autres pathogènes intracellulaires bloquent la fusion entre le lysosome et l'autophagosome (Fig. 16). *Anaplasma phagocytophilum* réside dans une vacuole à double membrane associée avec LC3 mais qui est non acidifiée. Dans les cellules HL-60, la bactérie crée une niche de réplication au sein d'un autophagosome, ne permettant pas sa maturation en autolysosome (Niu et al., 2008). Notre laboratoire a mis en évidence que *Yersinia pseudotuberculosis* pirate la voie de l'autophagie dans

les macrophages murins de moelle osseuse (BMDM) en bloquant la maturation de l'autophagosome. Après quatre heures d'infection, la majorité des *Y. pseudotuberculosis* est observée à l'intérieur d'une vacuole présentant une double ou plusieurs membranes positives pour LC3 (Fig. 16). L'étude menée dans les fibroblastes d'embryon souris (MEF) déficientes pour ATG5 ou ATG4A a révélé que la bactérie est dégradée, et donc que cette voie a un rôle important dans la vie intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis* (Moreau et al., 2010). La manipulation de la voie de l'autophagie par *Y. pseudotuberculosis* n'est pas encore complètement élucidée, notamment les évènements de fusion membranaire qui ont lieu entre la vacuole bactérienne et l'autophagosome.

Il est intéressant de noter que l'autophagie a également été impliquée dans la reconnaissance de protéines sécrétées et directement associées à la virulence de la bactérie. Par exemple, la protéine VacA sécrétée par *Helicobacter pylori* induit la formation de l'autophagosome. L'activation de cette voie peut permettre la dégradation de VacA durant les phases précoces de l'infection, et protéger la cellule de cette toxine (Terebiznik et al., 2009). L'autophagie a un rôle protecteur contre *Vibrio cholerae* par la reconnaissance de la *cytolysine* de *Vibrio cholerae* (VCC) (Gutierrez et al., 2007). La VCC, sécrétée dans la cellule, est ciblée par la protéine LC3, entraînant la formation de structures ponctuées. À forte dose, la toxine induit une vacuolisation qui contient la protéine LC3. L'inhibition de l'autophagie ne permet pas d'observer ces vacuoles et induit la mort de la cellule, conséquence de l'action de la toxine (Gutierrez et al., 2007). Ces résultats indiquent que l'autophagie sert de défense contre des toxines sécrétées par des bactéries extracellulaires.

Quelques pathogènes intracellulaires ne manipulent pas directement la voie canonique de l'autophagie, mais piratent les voies alternatives ou seulement certains constituants de cette voie.

I.2.2.3 Importance des voies alternatives de l'autophagie

I.2.2.3.1 Voie alternative de la macro-autophagie

L'autophagosome peut aussi être formé en l'absence de certains composants de la voie canonique. En effet, la formation de vacuole à double membrane a été démontrée en réponse à l'altération de l'ADN dans un mécanisme indépendant d'ATG5/ATG7, mais dépendant de Rab9 (Nishida et al., 2009b). Il a également été montré que cette voie alternative de l'autophagie est stimulée au cours de l'infection de certaines bactéries cytoplasmiques. En effet, la séquestration de *Mycobaterium marinum* ubiquitinée à l'intérieur d'une vacuole à double membrane (autophagosome-like) et positive pour la protéine associée aux membranes du Lysosome 1 (LAMP1) est indépendante de la voie classique de l'autophagie car elle ne requiert pas la protéine ATG5 pour la formation de la vacuole (Fig. 17) (Collins et al., 2009). Les raisons pour

lesquelles *M. marinum* est séquestrée dans cette vacuole restent à l'heure actuelle non élucidées, tandis que, pour *Brucella abortus* et *Francisella tularensis,* cela apparait comme une étape importante de leur vie intracellulaire (Starr et al., 2012). En effet, *Brucella abortus* est retrouvée à l'intérieur d'une vacuole (aBCV) présentant les caractéristiques d'un autophagosome mais dont la formation est dépendante d'ULK1, Beclin1 et ATG14L, mais indépendante d'ATG16L1, ATG4B, ATG7 et ATG5. La vacuole aBCV est requise pour la vie intracellulaire et la dissémination intercellulaire de *B. abortus* (Fig. 17) (Starr et al., 2012). L'étude menée avec *F. tularensis* met en avant que la bactérie pirate la voie de l'autophagie indépendante d'ATG5 afin de se répliquer. L'induction de la voie alternative cause la dégradation de constituants cellulaires, libérant ainsi des nutriments nécessaires à la réplication de la bactérie (Steele et al., 2013).

À la différence de ces quelques pathogènes qui utilisent une partie seulement de la voie de l'autophagie pour former une vacuole similaire à un autophagosome, d'autres recrutent directement un constituant de la voie au niveau de leur vacuole, dans un mécanisme appelé *LC3-Associated-Phagocytosis* (LAP) (Fig. 17).

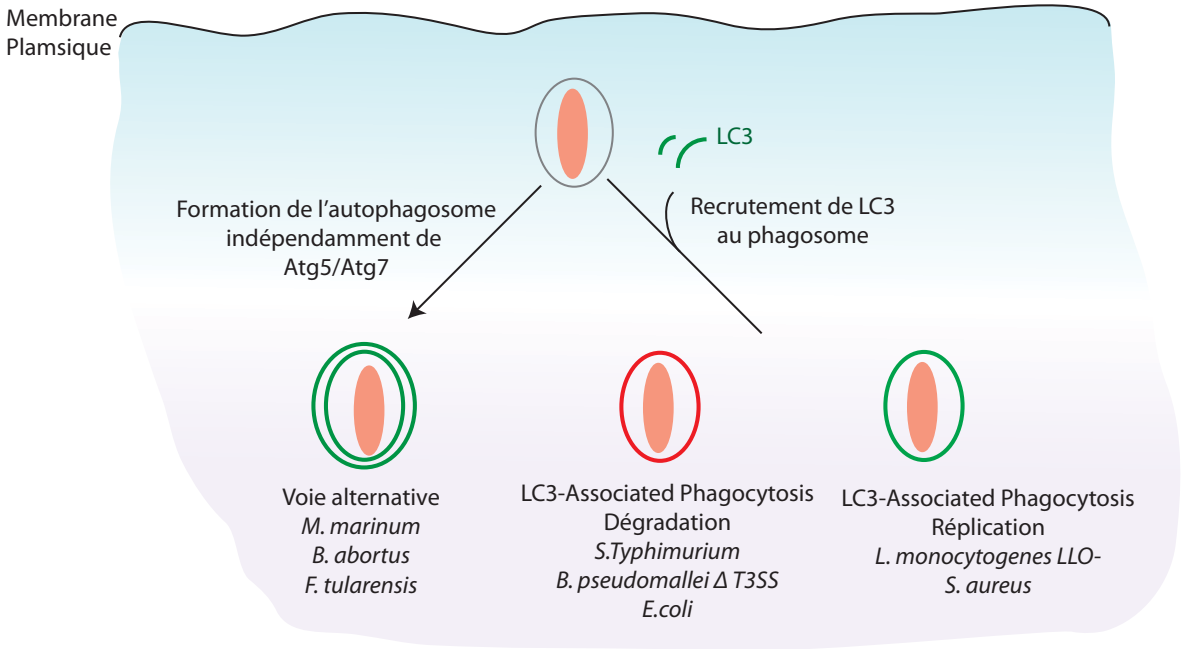


Figure 17 : Exploitation des voies alternatives de l'autophagie par les bactéries. *F. tularensis, B. abortus et M. marinum* semblent former un autophagosome indépendamment des protéines ATG5 et ATG7. *E. coli, B pseudomallei et S.* Typhimurium recrutent la protéine LC3 au niveau de leur vacuole et sont dégradées, tandis que *S. aureus* ou *L. monocytogenes* défectives pour la listeriolysine O vont utiliser la vacuole LAP comme niche de réplication.

I.2.2.3.2 LC3-Associated Phagocytosis (LAP)

La protéine LC3-II, communément utilisée comme marqueur des autophagosomes a été démontrée comme pouvant être directement recrutée au niveau d'un phagosome à simple membrane, processus spécifiquement nommé *LC3-Associated-Phagocytosis* (LAP)(Cemma and Brumell, 2012). Cette nouvelle voie a été découverte au cours de l'étude de la phagocytose de

Tol-Like-Recepteurs, situés sur des macrophages murins, qui stimulent le recrutement rapide de LC3 au niveau du phagosome. Le recrutement de LC3 au niveau du phagosome dépend des protéines ATG5, ATG7, Beclin1 et de l'activité de la kinase phosphoinositide-3-OH. La translocation de Beclin1 et de LC3 au niveau du phagosome n'est pas associée avec l'observation d'une vacuole à double membrane caractéristique de l'autophagosome, mais avec la fusion phagosome-lysosome liée à la rapide acidification de la vacuole (Sanjuan et al., 2007). Le recrutement de LC3 au niveau du phagosome a également été observé au niveau de phagosomes contenant des billes de latex, du zymosan, ou au niveau des corps apoptotiques permettant leur dégradation (Sanjuan et al., 2009; Florey et al., 2011). Cette voie d'internalisation induit la formation d'un compartiment positif pour LC3 capable de délivrer les bactéries séquestrées à la voie lysosomale (Huang et al., 2009). En effet, *Escherichia coli*, *S. Thyphimurium* et *Burkholderia pseudomallei* mutée au niveau de son T3SS sont enfermées dans un phagosome où LC3 est recrutée, permettant ainsi leur dégradation (Fig. 17) (Gong et al., 2011). Il apparaît que la production d'espèces réactives pour l'oxygène (ROS) par l'oxydase NADPH NOX2 est nécessaire au recrutement de LC3 au niveau du phagosome contenant le TLR ainsi qu'à la xénophagie de *S.* Thyphimurium (Huang et al., 2009).

Quelques espèces bactériennes ont mis en place des mécanismes pour détourner cette nouvelle voie, leur procurant ainsi une niche protectrice. L'étude menée chez *L. monocytogenes* infectant des macrophages a révélé qu'une portion des bactéries pouvait être observée à l'intérieur d'une vacuole à simple membrane nommée *Spacious Listeria-containing vacuoles* (SLAP) (Fig. 17) (Birmingham et al., 2007; 2008). La protéine LC3 est recrutée au niveau de SLAP à l'intérieur desquelles les bactéries se multiplient plus lentement (Birmingham et al., 2008; Lam et al., 2013). La formation de LAP dans un contexte infectieux n'a pas seulement été observée dans les macrophages mais aussi dans d'autres types cellulaires. L'étude du trafic intracellulaire de *S. Thyphimurium* a révélé que, dans les MEF, la bactérie est majoritairement contenue à l'intérieur d'un autophagosome, tandis que, dans les cellules MEF ATG9L1$^{-/-}$, la bactérie est présente dans une vacuole à simple membrane positive pour LC3 (Kageyama et al., 2011). Les auteurs ont proposé que le recrutement de LC3 au niveau du phagosome a lieu via un mécanisme indépendant de la machinerie de génération des membranes (Kageyama et al., 2011). De plus, la production de diacyglycerol au niveau de la vacuole de *Salmonella* déclenche le recrutement de LC3, probablement à travers la voie LAP, même si la voie classique de l'autophagie n'est pas formellement exclue (Shahnazari et al., 2010). Il a été proposé que la protéine transmembranaire TMEM59, connue pour réguler la glycosylation des protéines précurseurs de l'amyloïde, peut permettre l'activation de LC3, et le recrutement de cette protéine au niveau du phagosome au travers d'ATG16L1 (Boada-Romero et al., 2013). En effet, en réponse à l'infection

par *S. aureus,* la protéine TMEM59 est activée et semble permettre le recrutement de LC3 au niveau de la vacuole bactérienne à simple membrane (Boada-Romero et al., 2013).

L'une des caractéristiques de l'autophagie est la dynamique de réarrangement des structures membranaires de la cellule via de multiples événements de fusion membranaire, afin de permettre la formation des vacuoles autophagiques. La régulation des étapes de fusion membranaire au cours de l'autophagie fait appel aux protéines SNARE (Moreau et al., 2013).

II. Autophagie et Endocytose

II.1. L'endocytose

L'endocytose permet l'internalisation de fluides, de macromolécules, voire de pathogènes dans la cellule eucaryote, puis le trafic au travers des endosomes qui fusionnent enfin avec le lysosome pour dégrader les constituants endocytés. Les endosomes, par leur aptitude à trier, recycler et favoriser la dégradation les substances entrantes, ainsi que les récepteurs, sont responsables de la régulation d'une variété de voies cellulaires. Il existe plusieurs types d'endocytose : la phagocytose, la macropinocytose, l'endocytose dépendante de la clathrine, ou de la cavéoline ainsi que des endocytoses indépendantes de ces deux protéines (Fig. 18) (Conner and Schmid, 2003). La phagocytose est restreinte aux phagocytes professionnels comme les neutrophiles, les macrophages et les cellules dendritiques, alors que les autres types d'endocytose se déroulent dans tous les types cellulaires.

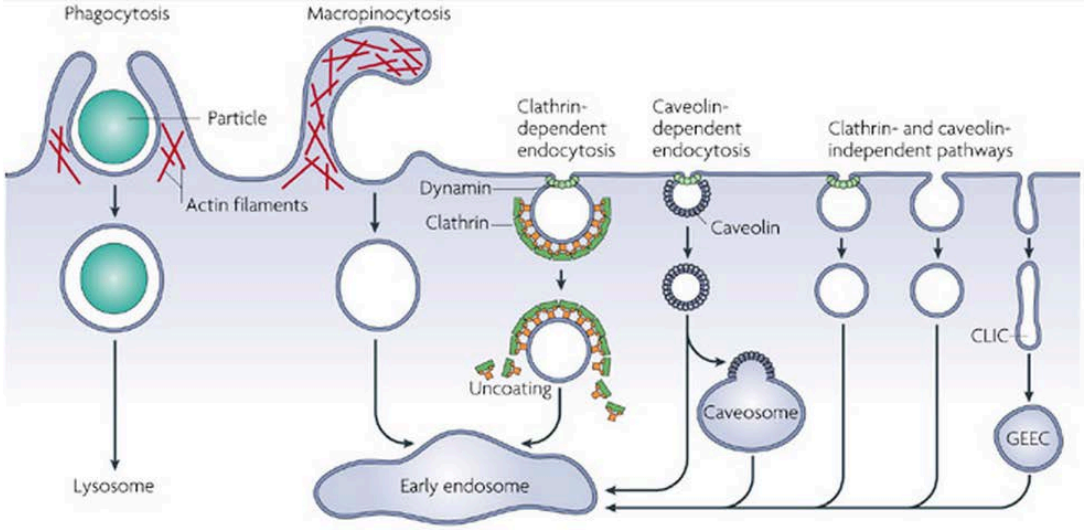


Figure 18: Les différentes voies d'internalisation utilisées par une cellule eucaryote. Les voies d'endocytose diffèrent selon la taille de la vésicule d'endocytose, la nature du cargo (ligands, récepteurs et lipides) et du mécanisme de formation de la vésicule. (Mayor and Pagano, 2007)

La voie d'endocytose a été mise en évidence pour jouer un rôle central dans le cycle cellulaire. Un des points importants de l'endocytose est l'internalisation des récepteurs de surface et de leurs ligands, laquelle est vitale pour la croissance et la communication de la cellule. Par

exemple, la transferrine et son récepteur vont suivre cette voie de dégradation, constituant ainsi un des marqueurs phares de cette voie (Hopkins, 1983). Certains pathogènes entrent dans la cellule par endocytose puis exploitent les endosomes pour pénétrer à l' intérieur du cytosol (Stein et al., 2012). La voie de dégradation d'endocytose débute au niveau de la membrane plasmique et se termine avec la fusion du lysosome (Fig. 18 et 19). Entre ces deux sites, le cargo endocytique passe au travers d'une série de vésicules endosomales intermédiaires caractérisées par leur contenu, leurs fonctions biologiques, leur morphologie, leur pH et leur composition (Fig. 19) (Saftig and Klumperman, 2009).

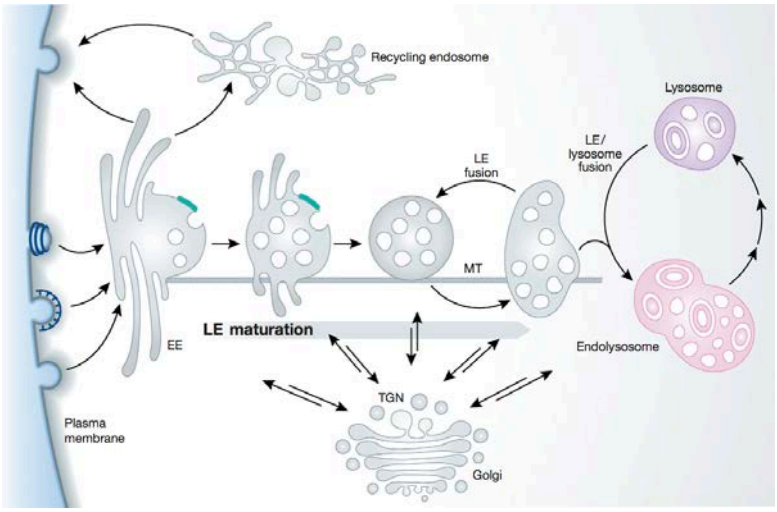


Figure 19: Le système endo-lysosome. Les composés endocytiques fusionnent avec l'endosome précoce (EE) puis transloquent le long des microtubules (MT) et acquièrent les marqueurs des endosomes tardifs (LE). Les LE fusionne par la suite avec le lysosome. (Huotari and Helenius, 2011)

II.2.Les endosomes

Les vacuoles d'endocytose primaire vont délivrer leur contenu et leurs membranes dans les endosomes précoces situés en périphérie du cytoplasme et localisés sur des microtubules (Mellman, 1996; Huotari and Helenius, 2011). L'événement de fusion entre les produits de l'endocytose et l'endosome précoce est régulé par la protéine GTPase Rab5 et ses effecteurs tels que la phosphokinase Vsp34 et la protéine EEA1 (Gorvel et al., 1991; Zerial and McBride, 2001) (Christoforidis et al., 1999). La protéine Rab5 GTPase passe d'une forme inactive (GDP) à une forme active (GTP) ancrée dans la membrane et sous le contrôle de la protéine Rabex5 (Fig. 20) (Christoforidis et al., 1999). L'association de ces protéines cytosoliques avec les membranes de l'endosome précoce aide à l'identification de cet organelle (Huotari and Helenius, 2011). Après une période de 5 à 10 min durant laquelle l'endosome précoce a accumulé les composés endocytiques et permet le recyclage des membranes plasmiques (à travers un recyclage direct ou via les endosomes de recyclage dans les régions péri-nuclaires), il transloque le long des microtubules (Fig. 19) (Mellman, 1996). Durant sa translocation, l'endosome précoce, ayant un pH luminal de départ d'environ pH 6, va acquérir des hydrolases et devenir de plus en plus acide

afin d'obtenir les propriétés de l'endosome tardif. Ce processus est appelé la maturation (Fig. 19) (Maxfield and McGraw 2004).

D'un point de vue moléculaire, la conversion de l'endosome précoce en endosome tardif est contrôlée par un échange des protéines Rab GTPase associées aux membranes (Fig. 20) (Cabrera and Ungermann, 2010). En effet, la formation de l'endosome tardif

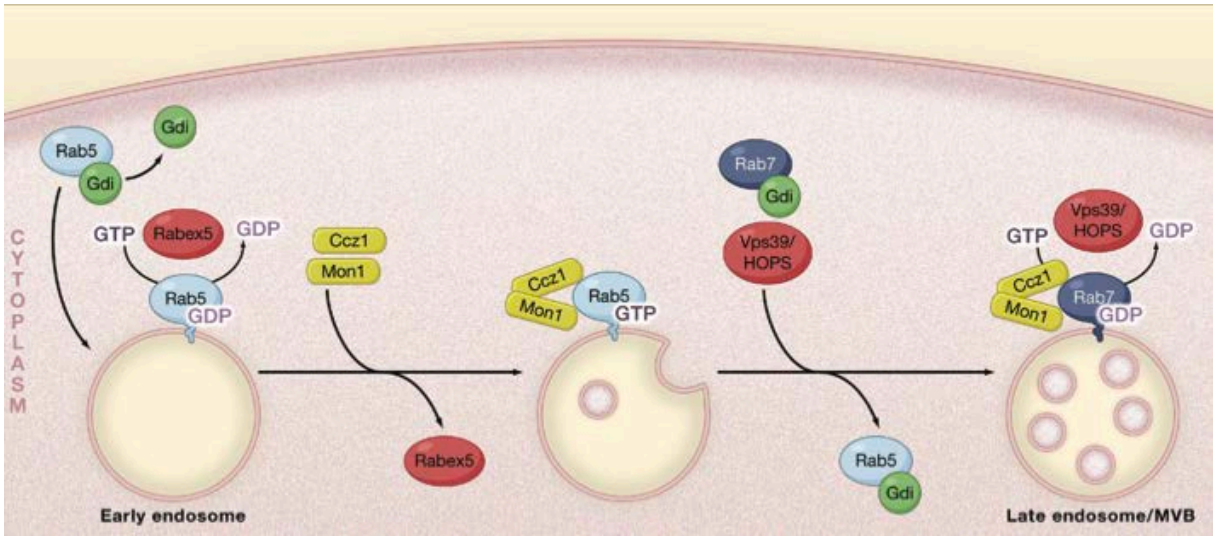


Figure 20 : Maturation de l'endosome précoce en endosome tardif. La conversion de la forme inactive vers la forme active de la protéine Rab5 est sous le contrôle de son effecteur Rabex5. La protéine Rab5-GDP est attachée à la membrane de l'endosome précoce. Ccz1 et Mon1 dissocient Rabex 5 de Rab5, conduisant à l'arrêt de son recrutement au profit de Rab7. L'endosome ainsi associé avec Rab7 constitue l'endosome tardif (Cabrera and Ungermann, 2010).

s'accompagne de la perte de Rab5 au profit de Rab7 (Rink et al., 2005). Il a été identifié que les protéines Mon1-Ccz1 sont importantes pour la conversion des protéines Rab dans *Caenorhabditis elegans*, en stoppant le recrutement de Rab5 et en facilitant le recrutement de Rab7 au niveau de l'endosome tardif (Fig. 20) (Poteryaev et al., 2010). D'autres protéines Rab, telles que Rab11, Rab33, sont également dissociées de l'endosome tandis que Rab9 va être incorporée à la membrane de l'endosome tardif (Huotari and Helenius, 2011). L'endosome fusionne avec le lysosome qui délivre ses hydrolases intra-luminales, conduisant à la dégradation du contenu de l'endolysosome.

Le lysosome est ubiquitaire dans les cellules eucaryotes, et constitue le compartiment de dégradation. Le lysosome reçoit ses substrats de différentes voies, notamment la voie de l'endocytose et celle de l'autophagie. Deux classes de protéines sont essentielles pour le bon fonctionnement du lysosome : les acides hydrolases (aussi appelés *soluble lysosomal hydrolases*) et les *lysosomal membrane proteins* (LMP). Les LMP les plus abondantes sont les *Lysosomal associated membrane protéines* 1 (LAMP1) et LAMP2, les LIMP2 (pour *Lysosomal associated integral membrane protéines*) et la trétraspanine CD63 (Saftig and Klumperman, 2009). Ces protéines sont des marqueurs permettant la reconnaissance des organites ayant fusionné avec le lysosome. Les membranes de l'endosome tardif ayant fusionné avec le lysosome sont résistantes aux hydrolases grâce à l'inclusion des protéines LAMP (Huotari and Helenius, 2011).

Au lieu de fusionner avec les lysosomes, les endosomes tardifs et précoces vont pouvoir interagir avec l'autophagie.

II.3.Fusion endosome- autophagosome

Il existe une relation étroite entre les deux voies cataboliques, autophagie et endocytose, qui vont partager leurs constituants à dégrader en fusionnant avec le lysosome. En effet, l'autophagosome est capable de fusionner avec le lysosome. Similairement, la vacuole autophagique est capable de fusionner avec l'endosome précoce ou l'endosome tardif avant de fusionner avec le lysosome, afin de créer un organite intermédiaire appelé amphisome (Fig. 21) (Berg et al., 1998; Fader and Colombo, 2008). Les marqueurs des endosomes peuvent être aussi retrouvés au niveau des autophagosomes (Fig. 21).

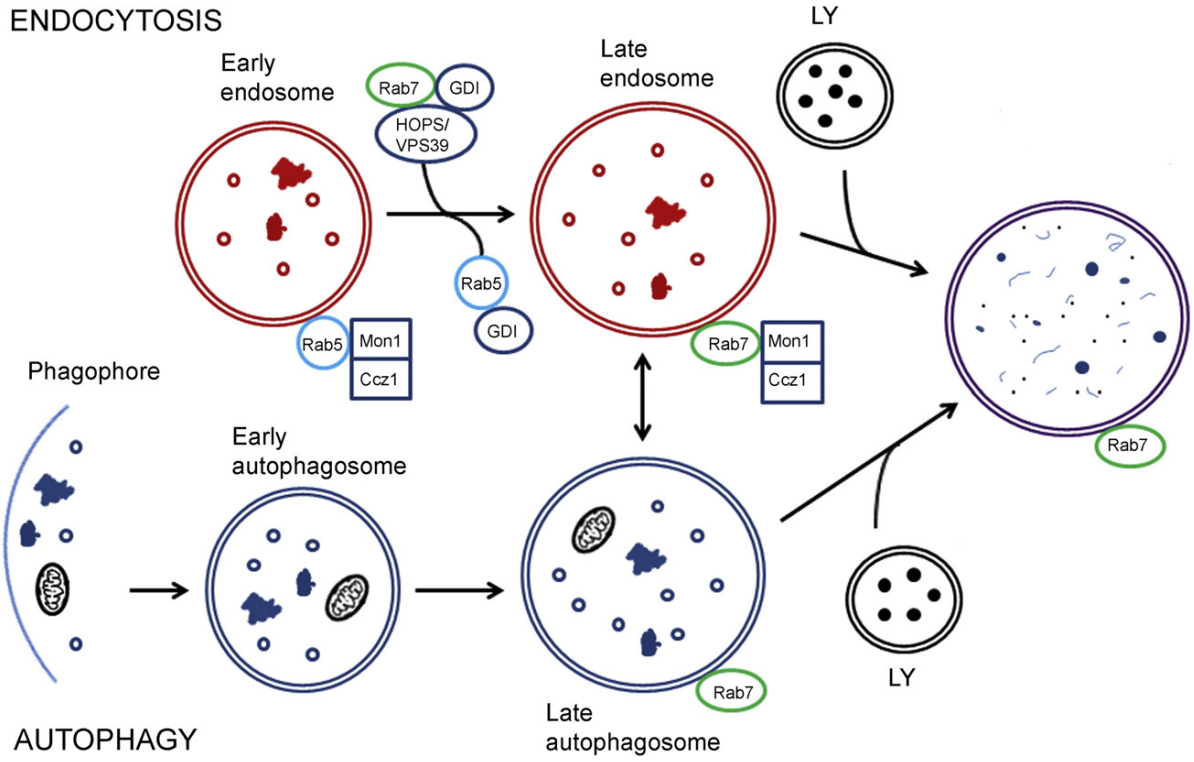


Figure 21 : Interaction entre la voie de l'endocytose et celle de l'autophagie. L'endosome précoce mature en endosome tardif, caractérisé par le changement de la protéine Rab5 pour Rab7 (voie rouge), et fusionne avec le lysosome pour détruire son contenu. L'endosome tardif peut fusionner avec l'autophagosome (voie bleu) formant l'amphisome.

La protéine GTPase Rab5 a été montrée pour être impliquée dans la régulation des premières phases de formation de l'autophagosome par sa capacité à inhiber l'activité de la kinase mTOR. Elle peut également former un macro-complexe avec les protéines Beclin1 et Vps34 (Li et al., 2010; Su et al., 2011). L'implication directe de Rab5 dans l'autophagie a été mise en évidence dans une étude mettant en avant que l'inhibition de Rab5 entraîne une réduction du nombre de vacuoles autophagiques induites par l'infection par HCV (Su et al., 2011). La protéine GTPase

Rab7 impliquée dans la voie endolysosomale et localisée au niveau de la membrane de l'autophagosome est importante pour la progression de la voie de l'autophagie (Fig. 21) (Gutierrez et al., 2004; Jäger et al., 2004). La protéine Rab7 est par ailleurs importante pour la fusion de l'autophagosome et de l'amphisome avec le lysosome, mais ne semble pas intervenir dans la formation de l'amphisome (Fader and Colombo, 2008).

Ces deux voies cataboliques présentent un fort dynamisme de réarrangement de leurs membranes caractérisé par de nombreux événements de fusion contrôlés par une famille de protéines appelées SNARE.

Chapitre III : Le trafic membranaire

Le cytoplasme des cellules eucaryotes est caractérisé par la présence d'une variété d'organites impliqués dans le transport de molécules vers leur destination finale afin d'exercer leurs fonctions. Malgré la complexité due à l'interconnexion des voies cellulaires, à la diversité ainsi que la quantité des composants transportés, leur livraison précise et localisée est rigoureusement maintenue. La régulation complexe de cette machinerie assurant le transport vésiculaire a été particulièrement bien étudiée ces dernières décennies et a valu à J. Rothman, R. Schekman et T. Südhof le prix Nobel de médecine ou de physiologie en 2013. Pour réaliser ce transport, les vésicules bourgeonnent au niveau de leur membrane donneuse puis sont véhiculées le long des microtubules ou du cytosquelette jusqu'au compartiment accepteur où elles fusionnent avec la membrane cible au travers de divers complexes "d'attache" permettant de délivrer les molécules (Bonifacino and Glick, 2004). L'ensemble des étapes de ce trafic membranaire fait intervenir plusieurs protéines ou complexes protéiques pour conduire efficacement cette fusion (Fig. 22). Une fois formée, la vacuole de transport a besoin d'être sélective dans la reconnaissance de son compartiment cible. Cette sélectivité est assurée par deux types de protéines : la famille des protéines SNARE et la famille des Rab GTPases. Le mécanisme de base pour l'attachement de la vacuole et la fusion inclut l'activation des protéines Rab, qui recrutent un grand nombre de protéines d'arrimage (Tether). L'attachement plus intime est induit par la formation du complexe SNARE.

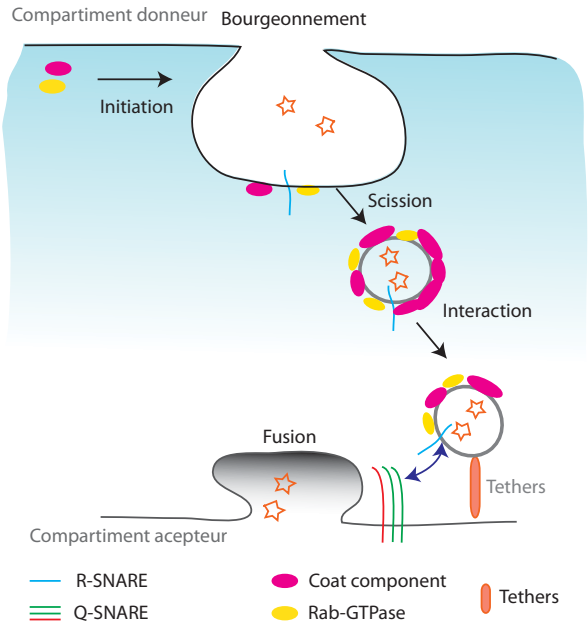


Figure 22 : Bourgeonnement et fusion d'une vacuole de transport. L'assemblage du manteau est initié au niveau du compartiment donneur par le recrutement des composants du manteau (cercle rose) et les protéines Rab-GTPases (cercle jaune). L'ensemble des composants du manteau est polymérisé afin d'induire la déformation et le bourgeonnement puis la scission de la vacuole de transport du compartiment donneur. Cette vacuole nouvellement formée migre vers les membranes cibles et interagit avec les protéines d'attache (« tether » ovale orange) de la membrane grâce à l'interaction des protéines GTPases qui interagissent avec les facteurs d'attache. Les R- (ligne bleue) et Q-SNARE (lignes rouge et verte) agissent de façon coordonnée pour former les complexes SNARE (flèche bleue) nécessaires au rapprochement des membranes, pour finalement permettre la fusion de la vésicule et des membranes cibles pour délivrer la cargaison.

Les protéines Rab sont de petites GTPases (entre 20-35 kda) spécifiques du compartiment cellulaire dont environ 66 isoformes sont exprimées chez les mammifères. Les Rab sont au centre de l'organisation, de la maintenance et du dynamisme du système endo-membranaire des cellules grâce à leur implication dans la régulation du transport membranaire des différentes voies (Fig. 22 et 23) (Stein et al., 2012). Les protéines Rab sont cycliquement retrouvées dans le cytosol (forme inactive : GDP-bound) et aux membranes (forme active : GTP-binding). Au niveau du compartiment donneur, la GEF catalyse l'échange d'un phosphate de la forme GDP vers GTP, entraînant un changement conformationnel de la Rab-GTP qui expose alors un groupement lipidique utilisé par la GTP active pour s'ancrer dans le compartiment donneur (Fig. 23) (Stein et al., 2012). Après le bourgeonnement de la vacuole, les Rab-GTPases restent associées aux membranes de la vacuole nouvellement formée, qui se dirige vers les compartiments cibles. Les effecteurs des protéines Rab situés sur les membranes cibles peuvent être spécialement reconnus et liés à la forme active des Rab, conduisant ainsi au recrutement des facteurs d'amorçage. Les protéines Rab recrutent plusieurs effecteurs qui opèrent au niveau de la sortie du cargo et de la mobilité de la vacuole, et régulent l'activité des SNARE (Fig. 23) (Grosshan ortiz 2006). En interagissant de manière séquentielle avec leurs effecteurs, les protéines Rab vont coordonner un grand nombre d'étapes des voies intracellulaires (Fig. 27).

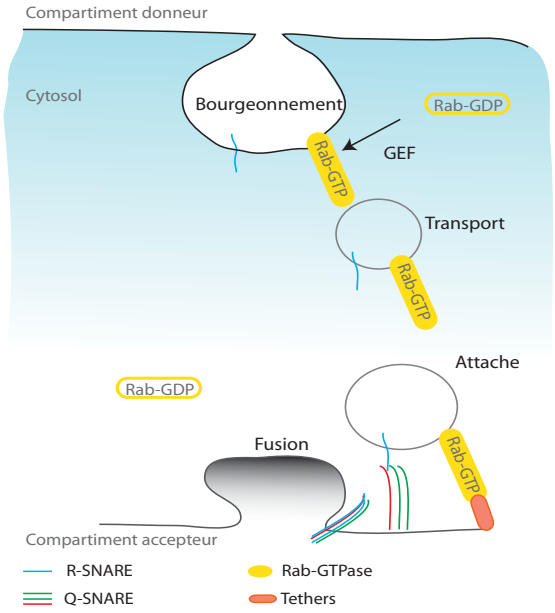


Figure 23 : Trafic vacuolaire en fonction des Rab. Au niveau du compartiment donneur, la protéine cytosolique des protéines Rab (Rab-GDP), sous l'action de la GEF, échange sa GDP pour une GTP et s'associe avec les membranes de la vacuole en bourgeonnement. La vacuole ainsi formée est transportée vers un compartiment cible. Avant l'étape d'attache, les protéines Rab reconnaissent leurs effecteurs (cercle orange). La fusion des membranes est effectuée via/par l'association des R-SNARE (ligne bleue) avec les Q SNARE (lignes rouge et verte).

Les protéines Rab sont principalement impliquées dans le recrutement d'un grand nombre de régulateurs du trafic membranaire. Les protéines SNARE jouent un rôle central dans la spécificité des liaisons et dans la fusion des vacuoles avec leur membrane cible.

I. SNARE

Ce sont les travaux du groupe de J. Rothman dans les années 1990 qui ont mené à la découverte des protéines composant le complexe SNARE (Söllner et al., 1993a; 1993b). La première étape de cette identification fut la purification du *N-ethylmaléimide sensitive factor protein* (NSF), capable de catalyser le transport de vésicules (Block et al., 1988). Les protéines NSF, solubles dans le cytosol, se lient aux membranes par association avec un complexe de protéines nommées SNAP (*Soluble NSF attachment proteins, α/β/γ*) qui sont elles-mêmes solubles (Clary and Rothman, 1990). L'association des SNAP sur les membranes des compartiments vésiculaires et cibles se fait par l'intervention de récepteurs spécifiques dénommés SNARE (*SNAP receptor*) (Söllner et al., 1993b). Une vingtaine de protéines SNARE ont été référencées chez les levures, tandis que environ le double a été découvert chez l'homme. Les SNARE sont caractérisées par la présence d'un motif spécifique encadré par un domaine N-terminal et un domaine transmembranaire en C-terminal. Cette structure est relativement conservée entre les protéines (Fig. 24) (Chaineau et al., 2009). Les SNARE ont été premièrement classées comme v- et t-SNARE, qui sont respectivement présentes sur les membranes de la vacuole (v- ; vesicular) ou

sur les membranes cibles recevant la vacuole (t- ; target) (Table1 et Fig. 24) (Söllner et al., 1993b).

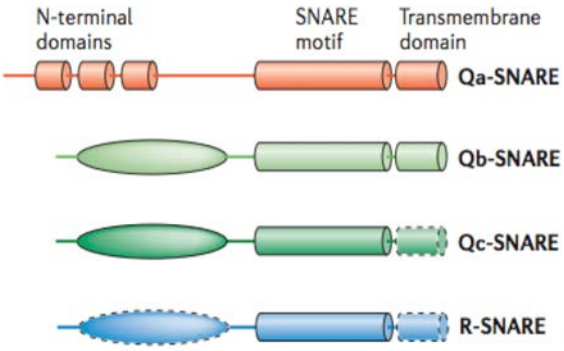


Figure 24 : Structure des différentes familles de protéines SNARE. Les différents membres de la famille Q-SNARE sont représentés en vert et en rouge. Les Q-SNARE sont associées avec les membranes cibles alors que les R-SNARE, représentées en bleu, sont retrouvées sur les membranes de la vacuole. Les SNARE sont typiquement constituées d'un domaine N-terminal, d'un motif SNARE et d'un domaine transmembranaire en C-terminal. Les domaines délimités par des pointillés représentent les domaines pouvant être absents dans certaines familles de protéines chez certains membres de la sous-famille (Jahn and Scheller, 2006).

Fonction	v-SNARE	t-SNARE
Structure en fonction de l'a. a. central du motif SNARE	R-SNARE	Q-SNARE
Sous-classification des Q-SNARE	Qa, Qb et Qc	

Tableau 1 : Classification des protéines SNARE. Les protéines sont séparées en deux grandes familles sur la base de leur localisation ou de l'acide aminé situé au centre du motif SNARE. Les SNARE situées sur les vacuoles ou qui comportent une arginine au centre de leur motif sont nommées v-SNARE/R-SNARE. Quant aux SNARE présentes sur les membranes cibles ou ayant une arginine, ces dernières sont dénommées Q-SANRE. Cette famille peut elle-même être scindée en trois sous-familles.

Alternativement, les protéines SNARE sont aussi classées comme étant des Q- ou R-SNARE, selon la présence respectivement d'une glutamine ou d'une arginine au centre du motif SNARE (Table1 et Fig. 24) (Fasshauer et al., 1998). Les Q-SNARE fonctionnent généralement comme des t-SNARE et les R-SNARE comme des v-SNARE. De plus, en fonction de la position du résidu glutamine, la famille des Q-SNARE peut être subdivisée en Qa, Qb et Qc (Tableau 1 et Fig. 24). L'association des SNARE en un complexe protéique régule le trafic membranaire.

I.1. SNARE et Trafic membranaire

I.1.1. Mode d'action général

La fusion des membranes se fait en plusieurs étapes. La migration des vacuoles donneuses vers le compartiment accepteur est suivie par leur arrimage et l'obtention des propriétés nécessaires à la fusion membranaire. Un pore se forme, permettant la libération des molécules transportées, puis les SNARE sont recyclées.

Avant la fusion membranaire, la vacuole s'arrime à la membrane cible. Ce contact initial entre la vacuole et la membrane cible met en jeu les facteurs d'arrimage de la famille des protéines Tether et, sous leur action, quatre SNARE vont s'associer. Par exemple, le complexe protéique

impliqué dans la fusion des endosomes est constitué de : Rab5, son facteur d'échange Rabex5, une protéine des endosomes EEA1 et la R-SNARE des endosomes, la syntaxin 13, qui va pouvoir être activée par EEA1 (Christoforidis et al., 1999). D'autres complexes protéiques ont été identifiés et pourraient définir les sites de fusion membranaire, en activant localement la machinerie de fusion SNARE. L'amorçage de la fusion membranaire est sous le contrôle des protéines Sec1/Munc 18 (SM), liées directement à la R-SNARE, permettant l'interaction avec les protéines Q-SNARE et la stabilisation du complexe (Fig. 25) (Hong, 2005). Le complexe SNARE est composé de quatre SNARE qui interagissent et s'associent pour former un faisceau à quatre hélices nommé complexe *trans*-SNARE (Fig. 25). En effet, le complexe SNARE fonctionnel est constitué des protéines R-, Qa, Qb et Qc-SNARE, avec la protéine R-SNARE localisée sur la vacuole et les trois autres protéines sur la membrane cible (Jahn and Scheller, 2006). Ces quatre SNARE sont individuellement non structurées mais elles subissent un changement de conformation lorsqu'elles se lient entre elles rapidement par « zippering-up » (Malsam et al., 2008). Cette structure particulière permet de rapprocher suffisamment les membranes. L'énergie générée durant la formation du faisceau à quatre hélices a été proposée pour conduire à la fusion des deux membranes opposées.

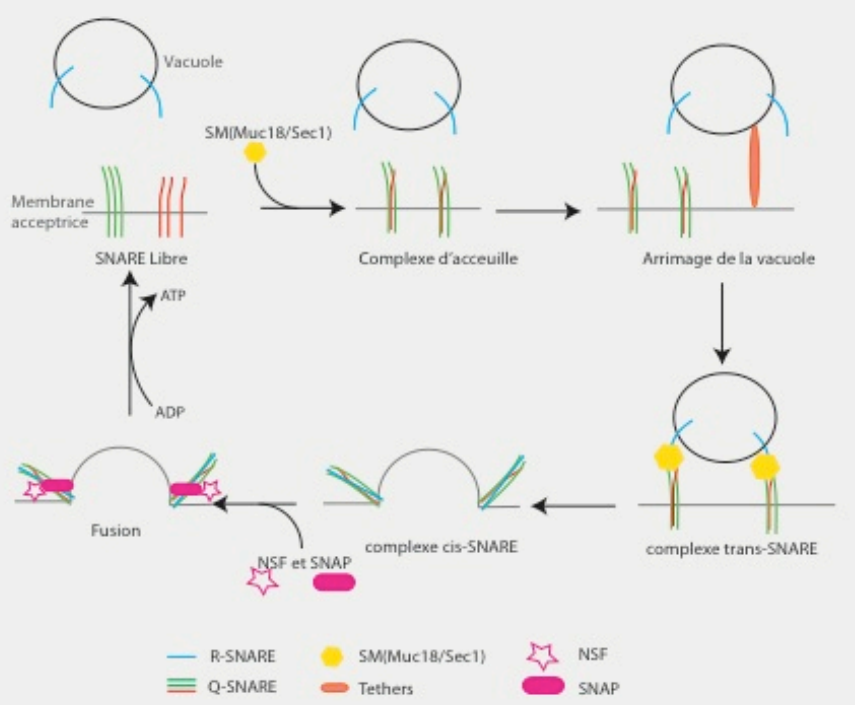


Figure 25 : Trafic membranaire régulé par un complexe SNARE. Les Q-SNARE (Qa-, ligne rouge ; Qb et Qc-, ligne verte) sont dans un état non structuré lorsqu'elles ne sont pas engagées dans un processus de fusion membranaire. Sous l'action de protéines d'arrimage SM, elles s'arrangent en complexe. Le premier contact entre la vacuole et les membranes cibles se fait par des facteurs d'attache (Tether). Puis les v-SNARE (ligne bleue) s'associent avec les Q-SNARE sous une forme d'hélice, créant le complexe trans-SNARE. Le complexe trans-SNARE est stabilisé par les protéines SM. Les membranes fusionnent et le complexe SNARE passe sous la forme cis-SNARE. L'association des facteurs NSF et SNPA avec les complexes SNARE permet la dissociation de celui-ci. Les protéines SNARE sont recyclées et peuvent être à nouveau mobilisées dans un nouveau cycle.

La fusion des membranes est réalisée par fusion successive de la bicouche lipidique constituant le feuillet externe puis de celle des feuillets internes (Fig. 26). Après la fusion, la protéine R-SNARE et les trois Q-SNARE sont retrouvées étroitement liées, formant le complexe *cis*-SNARE, lequel peut se dissocier afin d'être mobilisé dans un autre cycle de fusion. La dissociation du complexe *cis*-SNARE se produit via une ATPase cytosolique spécifique des NSF, qui interagissent avec les SNAP (Fig. 25). Dans un premier temps, ces deux complexes s'associent avec la forme *cis*-SNARE, conduisant à la formation d'un complexe transitoire 20S (Hohl et al., 1998). L'hydrolyse de l'ATP par NSF induit la dissociation du complexe 20S et permet l'individualisation des protéines Q-SNARE et R-SNARE. Les Q-SNARE ainsi libérées peuvent alors être recyclées vers un compartiment donneur par transport rétrograde, tandis que les R-SNARE peuvent être réorganisées afin de former un nouveau site d'ancrage.

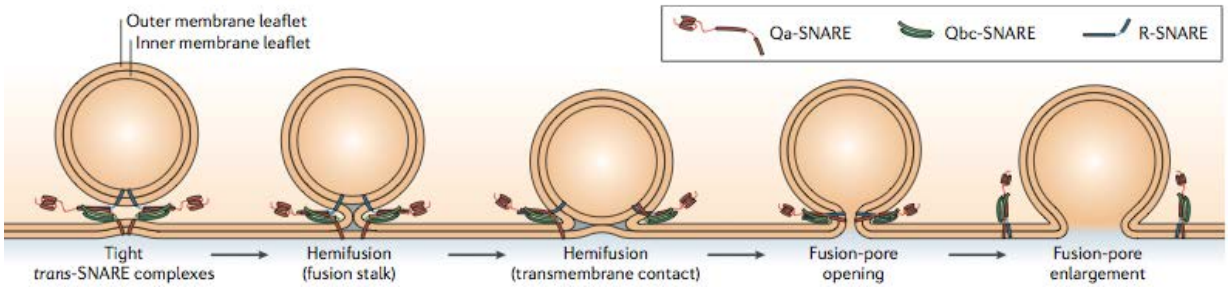


Figure 26 : Fusion des membranes sous la direction du complexe SNARE. Le complexe SNARE permet le rapprochement des membranes. Les feuillets lipidiques externes des membranes de la vacuole et du compartiment cible fusionnent. Suit la fusion des feuillets lipidiques internes, qui permet la formation d'un pore dans ces deux compartiments et la libération du contenu vésiculaire(Jahn and Scheller, 2006).

La spécificité des membranes qui fusionnent est en partie assurée par le complexe SNARE lui-même, car ce complexe est retrouvé sous une forme différente à chaque étape de la fusion membranaire (Malsam et al., 2008). Certaines protéines, telles que les protéines de la famille des Tetherines, peuvent directement interagir avec les SNARE, augmentant et contribuant à une forte fidélité de la fusion entre la vacuole et la membrane cible (Cai et al., 2007). Dans la famille des protéines d'arrimage (Tetherines), on retrouve notamment les protéines Sec1/Munc18, décrites comme entourant et stabilisant le complexe SNARE (Cai et al., 2007). Le complexe SNARE fait partie intégrante de la régulation du trafic membranaire. Il n'est donc pas surprenant que ces protéines aient une distribution ubiquitaire dans la cellule.

I.1.2. Localisation et fonction de quelques complexes SNARE

Les cellules eucaryotes possèdent un grand nombre de SNARE, avec plusieurs membres dans chaque sous-famille. Certaines SNARE interagissent avec un partenaire à une étape donnée, tandis que d'autres sont moins spécifiques et peuvent interagir avec plusieurs partenaires différents, expliquant la robustesse et la flexibilité des fusions membranaires et leur implication dans une variété de voies cellulaires. Par exemple, la syntaxine 5, localisée au niveau du Golgi,

est impliquée dans le trafic vésiculaire entre des compartiments endosomaux et le Golgi (Fig. 27) (Tai et al., 2004). La syntaxine 5 fait partie, avec Sec22b, d'un complexe SNARE qui participe à la fusion de vésicules dérivant du RE, nommé COPII (*Coat protein II*), avec l'ERGIC (*ER-Golgi intermediate compartment)* (Fig. 27) Le transport rétrograde de vésicules provenant des endosomes précoces et des vacuoles de recyclage vers le réseau trans-golgien (TGN) est principalement régulé par le complexe Syntaxine 16-VAMP4 (Fig. 27) (Mallard et al., 2002). Une autre protéine SNARE est principalement décrite pour jouer un rôle dans le transport rétrograde de vésicules provenant de compartiment de recyclage. Il s'agit de la protéine VAMP3 (Fig. 27) (Mallard et al., 2002). C'est dans la voie de l'endocytose que le rôle de nombreuses SNARE a été décrit. L'interaction de VAMP2 et SNAP 25 avec la syntaxine-13 génère un complexe SNARE qui intervient dans la sortie des endosomes précoces (Fig. 27) (Sun et al., 2003). La protéine VAMP8 régule la fusion homotypique entre les endosomes précoces et tardifs, en formant un complexe moléculaire avec les Q-SNARE, Syntaxine-7, Vti1b et Syn8 (Fig. 27) (Antonin et al., 2000b). La syntaxine-7 est localisée au niveau de tous les compartiments qui jouent un rôle dans l'endocytose (membrane plasmique, endosome, lysosome) et est particulièrement présente au niveau des membranes de l'endosome tardif. La syntaxine-7 interagit d'abord avec la syntaxine-8 puis avec VAMP8, formant ainsi un complexe SNARE qui participe à la fusion entre l'endosome tardif et le lysosome (Antonin et al., 2000a). La SNARE VAMP7, impliquée dans les voies de sécrétion et d'endocytose, joue aussi un rôle dans cette fusion entre endosome et lysosome (Fig. 27) (Pryor et al., 2004; Chaineau et al., 2009). En effet, l'interaction du complexe SNARE, constitué de la syntaxine 4 et SNAP-23 avec VAMP7, peut induire la fusion de la membrane plasmique avec le lysosome (Fig. 27) (Rao et al., 2004). Le transport du TGN vers la membrane plasmique fait appel à un complexe SNARE qui reste peu caractérisé même si les syntaxine-2, -3 et -4 en sont des membres proposés (Fig. 27) (Fujita et al., 1998). Les vésicules post-TGN qui migrent vers le pôle apical des cellules polarisées présentent le complexe SNARE constitué de VAMP3 et de la syntaxine-3 (Pocard et al., 2007).

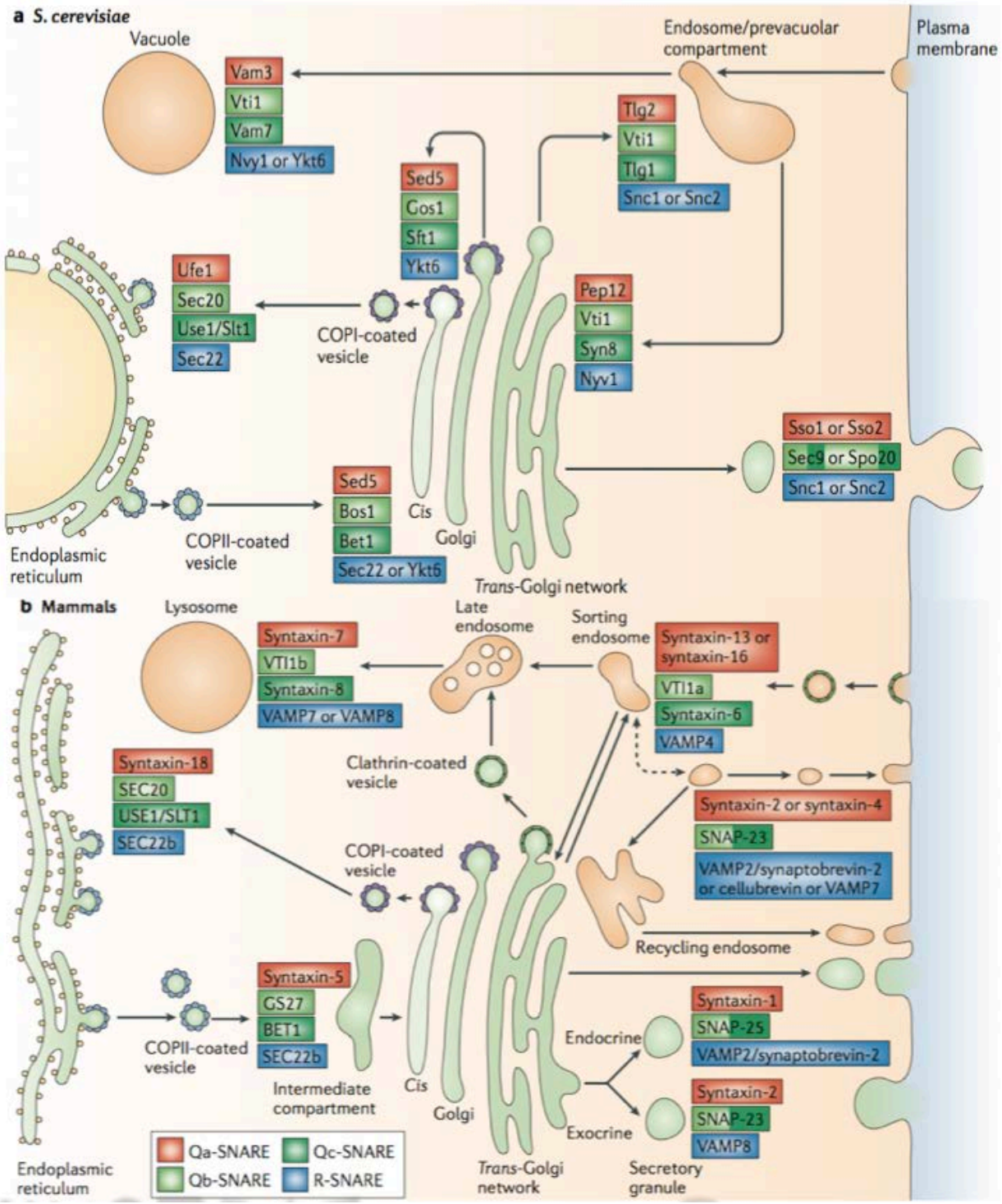


Figure 27 : Voie de transport intracellulaire et SNARE associées. Le schéma représente les compartiments intracellulaires des voies de sécrétion, de dégradation et d'endocytose retrouvés chez la levure (a) ou chez les mammifères (b). Le trafic entre les différents compartiments est représenté par des flèches. La localisation des différentes SNARE est représentée par des rectangles de couleur (Jahn and Scheller, 2006).

I.2. SNARE et Autophagie

Il a fallu attendre ces dernières années pour que l'intervention des SNARE soit étudiée dans les événements de fusion membranaire ayant lieu le long de la voie de l'autophagie. Il a été notamment révélé que les SNARE peuvent jouer un rôle à différentes étapes de la formation de l'autophagosome.

I.2.1. Initiation et maturation de l'autophagosome

Les protéines SNARE ont été montrées comme régulant la formation de l'autophagosome aussi bien chez la levure que dans les cellules de mammifères. Chez les levures, les SNARE impliquées dans l'exocytose, Sso2p et Sec9, ont été décrites comme jouant un rôle dans la biogenèse de l'autophagosome (Table 2 et Fig. 28) (Nair et al., 2011). En effet, elles participent à la formation des structures tubulaires positives pour ATG9, protéine impliquée dans les phases précoces de la formation de l'autophagosome. D'autres SNARE impliquées dans les phénomènes d'exocytose, telles que Sec22, Ykt6p et Tlg2, sont également impliquées dans ce processus de formation du réseau tubulaire positif pour ATG9 (Table2 et Fig. 28)(Nair and Klionsky, 2011). En effet, l'absence des SNARE Sso2 et Sec9 entraîne la non-formation du réseau tubulaire positif pour ATG9 mais la création de petites vésicules ATG9 qui ne subissent pas de fusion. Ceci suggère l'implication des SNARE dans la régulation de la fusion des vacuoles ATG9 dans les phases précoces de l'autophagie (Nair et al., 2011). L'identité et l'implication des SNARE responsables de l'incorporation des vacuoles ATG9 au sein du précurseur de l'autophagosome chez les mammifères ne sont pas encore connues. Par contre, il a été mis en évidence que les SNARE-*vesicle-associated-membrane protein7 (VAMP*7), syntaxin-7, syntaxin-8 et VTI1B régulent la fusion homotypique d'ATG16L1 (Tableau3 et Fig. 28) (Moreau et al., 2011). L'inhibition de l'expression de ces protéines s'accompagne d'une diminution du nombre d'événements de fusion entre les vacuoles ATG16L1, ce qui suggère l'implication de VAMP7 dans la régulation de la fusion homotypique d'ATG16L1 (Moreau et al., 2011). Ces événements de fusion permettent la croissance des structures en un réseau tubulaire conduisant à la formation du phagophore puis de l'autophagosome (Moreau et al., 2011; Moreau and Rubinsztein, 2012). Une étude a mis en évidence une corrélation entre l'émergence du phagophore et le site de contact entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Hamasaki et al., 2013). Le site de contact entre ces deux organites est, d'une part, enrichi avec la syntaxine-17 et, d'autre part, co-localise avec le marqueur des phagophores, ATG14 (Tableau3 et Fig. 28). De plus, l'inhibition de l'expression de la syntaxine-17 s'accompagne d'une diminution du flux autophagique (Tableau3 et Fig. 28) (Hamasaki et al., 2013). Ainsi, les auteurs proposent que la SNARE résidente au niveau du

réticulum endoplasmique, la syntaxine-17 se lie et recrute ATG14 au niveau du site de contact RE-mitochondrie (Hamasaki et al., 2013).

La progression de la voie de l'autophagie vers la formation de l'autolysosome est liée à de nombreux événements de fusion membranaire. Il a été mis en évidence dans une lignée cellulaire humaine d'érythrocyte de leucémie que, la SNARE VAMP3 est capable de réguler la fusion membranaire entre les corps vésiculaires et l'autophagosome mais n'intervient pas dans les étapes suivantes, telles que la fusion avec le lysosome (Tableau3 et Fig. 28) (Fader et al., 2009).

SNARE-Levure	Localisation	Rôle dans l'autophagie
Formation de l'Autophagosome		
Sso2	PM, Golgi, Vacuole	Formation du réseau tubulaire positif pour Atg9
Sec9	PM, Golgi, Vacuole	Formation du réseau tubulaire positif pour Atg9
Sec22	Golgi, ER	Formation du réseau tubulaire positif pour Atg9 et régulation de la fusion entre l'autophagosome et la vacuole
Tlg2	PM, EE	Formation du réseau tubulaire positif pour Atg9
Ykt6p	Golgi, vacuoles	Formation du réseau tubulaire positif pour Atg9 Fusion avec le lysosome
Fusion de l'autophagosome et du Lysosome		
Vam3	Vacuole	Fusion lysosome-autophagosome
Vam7	Vacuole	Fusion lysosome-autophagosome
Vti1	Vacuole	Fusion lysosome-autophagosome

Tableau 2 : Les SNARE de levure impliquées dans différentes étapes de la voie de l'autophagie. La localisation cellulaire et le rôle de chaque SNARE sont indiqués. Les SNARE régulent principalement deux étapes de l'autophagie : la formation de l'autophagosome et la fusion avec le lysosome.

SNARE-Mammifère	Localisation	Rôle dans l'autophagosome
Formation de l'Autophagosome		
Syntaxine-7	P.M, E.E, L.E et Lys	Régulation de la fusion homotypique ATG16L1
Syntaxine-8	P.M, E.E, L.E et Lys	Régulation de la fusion homotypique ATG16L1
Syntaxine-17	ER	Recrutement et liaison avec ATG14 au niveau du site de contact RE-Mitochondrie
VAMP7	P.M, E.E, L.E et Lys	Régulation de la fusion homotypique ATG16L1
VTI1B	P.M, E.E, L.E et Lys	Régulation de la fusion homotypique ATG16L1
VAMP3	M.P, E.E, L.E et RE	Régulation de la formation de l'amphisome
Fusion Autophagosome-Lysosome		
Syntaxin-17	ER	Régulation de l'autophagosome fusion avec le lysosome
Syntaxin-7	ER, Golgi	Régulation de la formation du lysosome
SLY1	ER, Golgi	Régulation de la formation du lysosome
Syntaxin 5	Golgi	Régulation indirecte de l'acidification de l'autolysosome
VAMP8	P.M, E.E, L.E et Lys	Régulation de la formation de l'autolysosome
VAMP7	P.M, E.E, L.E et Lys	Rôle dans la fusion de l'autophagosome avec le lysosome
VTI1B	P.M, E.E, L.E et Lys	Rôle dans la fusion de l'autophagosome avec le lysosome

Tableau 3 : Les SNARE de mammifères impliquées dans différentes étapes de la voie de l'autophagie. La localisation cellulaire et le rôle de chaque SNARE sont indiqués. Les SNARE régulent principalement deux étapes de l'autophagie : la formation de l'autophagosome et la fusion avec le lysosome.

De manière intéressante, il a été montré que VAMP7 et ses partenaire sont également impliqués dans l'étape de fusion entre l'autophagosome et le lysosome, qui sera décrite dans la section suivante (Fader et al., 2009; Furuta et al., 2010). Cette observation suggère que des mêmes SNARE peuvent intervenir au début et à la fin de cette voie catabolique.

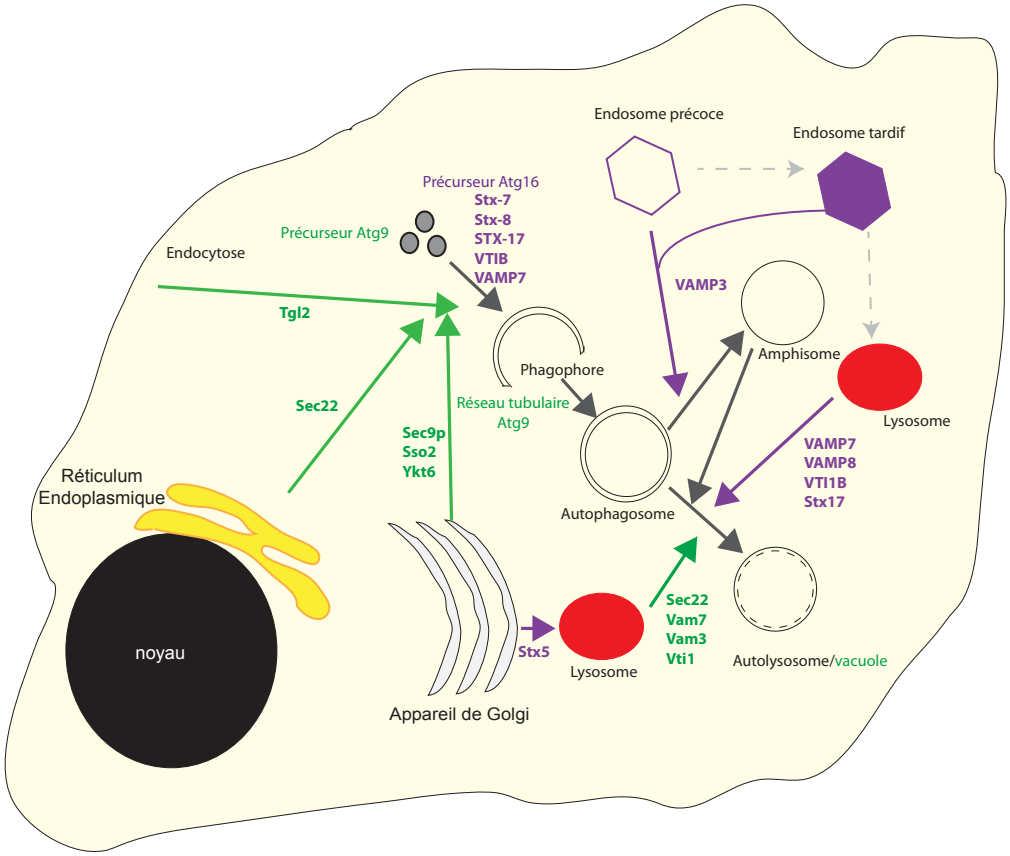


Figure 28 : Implication des SNARE dans la voie de l'autophagie. La voie de l'autophagie est constituée de quelques étapes clés, comme la formation du phagophore, de l'autophagosome et de l'autolysosome. La flèche grise indique l'avancement de la voie de l'autophagie ainsi que son interaction avec la voie endosomale. Chez la levure, les SNARE Tgl2,Sec22, SSo2,Ykt6 et Sec9p (vert) sont principalement impliquées dans la régulation et la formation du réseau tubulaire ATG9 générant le phagophore, tandis que les SNARE Sec22, Vam7, Vam3 et Vti1 régulent la fusion de l'autophagosome et du lysosome. Chez les mammifères (voie violette), les SNARE syntaxine (stx)7, stx-8, stx-17, VAMP7 et Vti1b sont responsables de la fusion homotypique d'ATG16. Certaines de ces SNARE sont retrouvées dans la régulation de l'étape de fusion entre autophagosome et lysosome. La SNARE VAMP3 régule la formation de l'amphisome. Les fléches en pointillés indiquent le parcours de la voie endosomale.

I.2.2. Fusion membranaire entre l'autophagosome et le lysosome

L'autophagosome mature fusionne avec le lysosome afin de délivrer son contenu à dégrader. Chez la levure, la fusion entre l'autophagosome et le lysosome est due aux protéines SNARE Vti1, Ykt6, Vam3, Vam7, Sec18, Sec17, Ypt7 et au complexe Vps/HOPS (Tableau2 et Fig. 28) (Sato et al., 1998; Darsow et al., 1997; Wang and Klionsky, 2003; Klionsky, 2005). Dans les cellules de mammifères, il a été mis en évidence que VAMP7 joue un rôle au niveau de cette étape (Tableau3 et Fig. 28) (Fader et al., 2009). La surexpression d'une protéine chimérique de VAMP7 (composée de son domaine N-Ter couplé à la GFP) induit une diminution du nombre d'autolysosomes observés, ce qui suggère un rôle de VAMP7 dans l'étape de fusion entre l'autophagosome et le lysosome (Fader et al., 2009). Dans des cellules mammifères, VAMP8 et VTI1B vont réguler la fusion de l'autophagosome et du lysosome, et cela même si l'autophagosome a séquestré un pathogène (Furuta et al., 2010). À la différence de l'étude de

Hamasaki et collaborateurs montrant l'implication de la syntaxine-17 dans les phases très précoces de la formation de l'autophagosome, deux autres études ont décrit son rôle dans la fusion de l'autophagosome et du lysosome (Hamasaki et al., 2013; Itakura et al., 2012; Takats et al., 2013). L'étude menée chez *Drosophila melanogaster* montre que la diminution de l'expression de Syntaxine-17 et de VAMP7 interfère avec la maturation de l'autophagosome (Takats et al., 2013). De plus, la syntaxine-17 est montrée comme présente au niveau de l'autophagosome mature ayant perdu les marqueurs des étapes précoces, et est requise pour la fusion avec l'autophagosome (Takats et al., 2013). Parallèlement aux résultats obtenus chez la drosophile, la réalisation de la diminution de l'expression de la syntaxine-17 dans des cellules mammifères a montré l'absence d'effet sur la formation de l'autophagosome mais a conduit au blocage de la fusion de ce dernier avec le lysosome. Ceci mettant en avant le rôle de la syntaxine-17 dans cette étape (Itakura et al., 2012; Itakura and Mizushima, 2013).

L'étape cruciale qui permet une dégradation efficace des constituants séquestrés dans l'autolysosome est son acidification, due à l'activité des enzymes lysosomales (Yamamoto et al., 1998). La voie de l'autophagie peut présenter une déficience dans son acidification, pouvant être dûe à l'inhibition de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome, ou encore à un défaut de maturation du lysosome. La syntaxine-5 est impliquée dans la régulation du transport antérograde entre le réticulum endoplasmique et le Golgi ainsi que dans la maturation des enzymes lysosomales (Takats et al., 2013). La syntaxine-5 a également été identifiée comme pouvant être un modulateur positif de l'autophagie (Tableau 3 et Fig. 28) (Renna et al., 2011). La déplétion de cette syntaxine diminue significativement l'efficacité d'élimination des substrats par la voie de l'autophagie, laquelle est dépendante de l'activité du lysosome (Renna et al., 2011). Que ce soit dans des cellules mammifères ou chez la levure, les SNARE interagissent à différentes étapes de la voie de l'autophagie de manière directe en permettant la fusion des vacuoles entre elles, ou de façon indirecte en influençant la biogenèse de certains organites cellulaires.

Les SNARE, régulateurs clés du trafic membranaire mis en place par de multiples voies cellulaires, peuvent également intervenir dans la réponse immunitaire au niveau des étapes de sécrétion de médiateurs de l'inflammation ou de la phagocytose des pathogènes par les cellules immunitaires (Stow et al., 2006).

I.3. SNARE et pathogènes

La manipulation de la machinerie de fusion membranaire par les pathogènes est un thème émergent en microbiologie cellulaire. Au cours d'une infection, les SNARE peuvent être recrutés au site d'entrée du pathogène, devenir un constituant de la vacuole supportant la réplication, et intervenir dans le trafic intracellulaire du pathogène, voire même faire l'objet de mimétisme.

L'infection de macrophages par le virus HIV conduit à une altération des processus de remodelage des membranes situées au site de phagocytose, en perturbant le recrutement des endosomes de recyclage (VAMP3 positive) mais sans altérer le recrutement de VAMP7 (Mazzolini et al., 2010). Dans le cas du virus enveloppé, cytomégalovirus humain (HCMV), la syntaxine-3 et SNAP-23 sont impliquées dans la production de particules virales (Cepeda and Fraile-Ramos, 2011; Liu et al., 2011). La déplétion de SNAP-23 dans des fibroblastes induit une diminution du nombre de virus extracellulaires observés, mettant ainsi en avant l'importance de cette SNARE dans la production de CMV (Liu et al., 2011). De plus, une SNARE de la membrane plasmique, la syntaxine-3, est localisée au site d'assemblage du virus et est incorporée dans l'enveloppe du CMV. La déplétion de la syntaxine-3 a un effet sur la production de particules virales du CMV et non du HIV. Ces études mettent en avant l'exploitation et la manipulation des SNARE cellulaires au profit du virus (Cepeda and Fraile-Ramos, 2011; Liu et al., 2011; Mazzolini et al., 2010).

La vacuole contenant *Mycobacterium tuberculosis* acquiert la syntaxine-4 mais exclut spécifiquement la syntaxine-6 (Fratti et al., 2002; Perskvist et al., 2002). Chaque étape d'acquisition ou d'exclusion d'une SNARE est une étape critique pour la maturation de la vacuole de *M. tuberculosis*. Similairement, la syntaxine-13 paraît jouer un rôle dans la maturation de la vacuole contenant *Salmonella* (smith et al., 2005). *Legionella pneumophila* requiert les syntaxine-2, -3 et -4 pour la biogenèse de ses vacuoles, et ses protéines effectrices Drra recrutent Sec22, conduisant à la fusion de la vacuole avec le réticulum endoplasmique (Arasaki and Roy, 2010; Arasaki et al., 2012). L'infection de macrophages par la souche virulente *L. pneumophila* (système de sécrétion de type IV Dot/Icm actif) entraîne la localisation de sec22, et non celle de VAMP7, à la vacuole tandis qu'en présence d'une souche mutante DotA (Dot/Icm inactif), l'inverse est observé. Cela met en avant l'aptitude de la bactérie, à travers son système de sécrétion Dot/Icm, à moduler le recrutement des v- SNARE (Arasaki and Roy, 2010). Les auteurs ont proposé que ce phénomène de fusion permet de créer une réserve de membrane nécessaire à la maturation de la vacuole de *Legionella.* L'étude du trafic intracellulaire de *Chlamydia trachomatis* a mis en évidence le recrutement de SNARE au niveau de ses inclusions (Delevoye et al., 2008; Moore et al., 2011). Il a été montré que *C. trachomatis* exclut les syntaxines-4 et -16 mais recrute la syntaxine-6. Le rôle et le mécanisme de recrutement de cette dernière ne sont pas encore bien établis, même si les auteurs mettent en avant la nécessité d'une protéine bactérienne et d'un facteur cellulaire (Moore et al., 2011). D'autres SNARE ont été identifiées au niveau de la membrane de l'inclusion contenant les micro-organismes, comme VAMP3, VAMP7, VAMP8 et dans une moindre mesure VAMP4, par un mécanisme qui dépend de la protéine bactérienne IncA (Delevoye et al., 2008). IncA présente des homologies avec les SNARE et serait responsable de l'interaction des SNARE avec l'inclusion (Delevoye et al., 2008).

En effet, la protéine IncA possède deux motifs nommés SLD1 et SLD2, pour *SNARE Like Domain,* qui sont des facteurs de virulence capables de réguler positivement ou négativement des phénomènes de fusion membranaire, favorisant ainsi l'infection par *Chlamydia* (Ronzone and Paumet, 2013). Les auteurs ont proposé que les SNARE recrutées au niveau de l'inclusion permettraient la fusion avec d'autres compartiments et donc l'apport de membrane nécessaire pour l'expansion de l'inclusion. Le mimétisme du motif SNARE est utilisé par les pathogènes afin de manipuler les fusions membranaires. Les protéines effectrices LegC7, LegC2 et Lecg3 sécrétées par le système de sécrétion de type IV, Dot/Icm de *Legionella pneumophila,* présentent un domaine similaire au motif SNARE qui leur permet de manipuler le trafic membranaire et d'empêcher la fusion endo-lysosomale (Paumet and Wesolowski, 2010).

La phagocytose de bactéries non pathogènes (*Escherichia coli*) par des cellules dendritiques fait intervenir les SNARE suivantes : VAMP3, VAMP7 et VAMP8. Ces protéines seraient impliquées dans le trafic intracellulaire des bactéries vers un compartiment de dégradation, le phagolysosome (Ho et al., 2008). De manière intéressante, les auteurs ont mis en évidence que VAMP8 régule négativement la phagocytose de la bactérie par les cellules dendritiques (Ho et al., 2008). Les cellules dendritiques $VAMP8^{-/-}$ présentent une activité de phagocytose supérieure à celle des cellules dendritiques $VAMP8^{+/+}$, confirmant l'effet négatif de VAMP8 sur la phagocytose bactérienne (Ho et al., 2008). Les SNARE peuvent ne pas intervenir directement dans le trafic du pathogène mais dans le trafic intracellulaire d'une protéine sécrétée par celui-ci, comme les toxines bactériennes. Par exemple, VAMP7 et la syntaxine-7 sont impliquées dans la formation de vacuoles intracellulaires suite à l'intoxication cellulaire par VacA, une cytotoxine produite par *H. pylori* (Mashima et al., 2008). Les protéines SNARE jouent également un rôle indirect dans l'élimination de la bactérie en facilitant la fusion entre le lysosome et le compartiment séquestrant le pathogène. Les *Streptococcus* du groupe A (GAS) sont d'abord séquestrés dans un autophagosome qui fusionne par la suite avec le lysosome. Il a été mis en évidence que la machinerie de fusion membranaire est requise à cette étape. Les SNARE endocytiques VAMP8 et VTI1B sont requises pour la fusion de l'autophagosome antimicrobial avec le lysosome, qui constitue l'étape ultime pour la dégradation (Furuta and Amano, 2010).

La régulation des événements de fusion membranaire au travers des complexes SNARE intervient dans de nombreuses voies de trafic cellulaire, telles que l'endocytose ou l'autophagie, mais aussi au cours du trafic intracellulaire de pathogènes. De façon intéressante, les complexes SNARE peuvent permettre la connexion entre le trafic cellulaire et celui du pathogène, comme dans le cas des bactéries GAS citées ci-dessus.

C'est dans ce contexte bibliographique, que la question du rôle des protéines SNARE dans le trafic intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis* dans un contexte d'autophagie a été émise.

Article

Et

Résultats

Arnold Berliner (Physicien Allemand, créateur du journal scientifique Naturwissenschaften en 1913) décrivait au physicien Albert Einstein la difficulté de contraindre les auteurs scientifiques à exposer leur sujet sous la forme la plus accessible possible, par cette devinette :

« Qu'est ce qu'un auteur scientifique ? »

Réponse : « Un croisement entre un mimosa et un porc-épic »

Extrait de Comment je vois le monde, *Albert Einstein*

Chapitre I : Le rôle de deux protéines SNARE dans le trafic intracellulaire de Y. pseudotuberculosis

Article en soumission ou en préparation avec ce chapitre :

- *Étude préliminaire*

Trafic intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis* dans les cellules MDCK.

- *Article en soumission : Autophagy*

Role of VAMP3 and VAMP7 in the commitment of *Yersinia pseudotuberculosis* to LC3-associated pathways involving single- or double-membrane vacuoles

Laure-Anne Ligeon[1,2,3,4], Kevin Moreau[1,2,3,4,*], Nicolas Barois[3,5], Antonino Bongiovanni[1,5], Delphine-Armelle Lacorre[4,5], Elisabeth Werkmeister[5,6], Véronique Proux-Gillardeaux[7,8], Thierry Galli[7,8], and Frank Lafont[1,2,3,4,5]

I. Contexte de scientifique

La xénophagie est une voie particulière de l'autophagie conduisant à la séquestration et la dégradation de pathogènes intracellulaires. Or de nombreux pathogènes ont développé différentes stratégies afin d'échapper à cette issue fatale. De manière générale l'autophagie est caractérisée par une implication hiérarchisée des ATG et une vacuole à double membrane présentant le marqueur de l'autophagie, LC3. Cependant, certains pathogènes sont capables de détourner de manière originale le processus autophagique par le recrutement direct de la protéine LC3 au niveau de la vacuole bactérienne composée d'une membrane unique, dans une voie nommée *LC3-Associated Phagocytosis* (LAP) (Sanjuan et al., 2007) (Birmingham et al., 2008).

Le laboratoire a précédemment montré que *Y. pseudotuberculosis* se réplique dans les macrophages au sein d'un autophagosome bloqué dans sa maturation (Moreau et al., 2010). Nous avons donc voulu savoir si les protéines SNARE jouent un rôle dans le trafic intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis,* et quel était leur impact sur l'autophagie au cours de l'infection. Nous avons montré que *Y. pseudotuberculosis* ne se réplique pas au sein d'un autophagosome dans les cellules épithéliale mais est présente à l'intérieur d'une vacuole à simple membrane positive pour LC3 et qui est non-acidifiée. Nous avons mis en évidence que les protéines SNARE sont séquentiellement recrutées au niveau de YCV, et que VAMP7 est requis pour le recrutement de LC3 au niveau de la vacuole bactérienne. De plus, VAMP3 semble participer à l'adressage de la bactérie entre les voies à simple ou double membrane positive pour LC3. Par l'utilisation de la technique de microscopie à force atomique (AFM) nous observons que le contact bactérie/cellule semble suffisant pour induire le recrutement de VAMP3 au niveau de la membrane plasmique.

II. Etude préliminaire

Trafic intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis* dans les MDCK

La protéine SNARE VAMP7 est aussi bien impliquée dans la voie de l'endocytose, que dans la voie de l'autophagie. Au vu des résultats montrant l'implication de VAMP7 dans la formation de l'autophagosome nous avons voulu savoir si cette protéine est recrutée au niveau de la vacuole de *Y. pseudotuberculosis,* et identifier son rôle au cours du détournement de l'autophagie par ce pathogène . Des cellules MDCK (Madin-Darby Canine Kidney) exprimant de façon stable la protéine VAMP7 fusionnée à la sonde fluorescent GFP (VAMP7-GFP) ont été infectées par *Y. pseudotuberculosis* (Fig. 29A). Après quatre heures d'infection, la protéine VAMP7-GFP est recrutée autour de la bactérie dans les cellules MDCK (Fig. 29B). L'observation du profil de fluorescence, constitué de deux pics d'intensité correspondant à la GFP et encadrant le pic du DAPI représentant la bactérie, confirme le recrutement de VAMP7 (Fig. 29C). De plus, les protéines v-SNARE sont constituées d'un motif SNARE encadrant un domaine transmembranaire en C-terminal et un domaine N-terminal nommé domaine Longin. Il a été montré que le domaine Longin de VAMP7 est impliqué dans le contrôle de sa localisation ainsi que de sa fonction (Martinez-Arca et al., 2011). Nous avons donc cherché si le domaine Longin de VAMP7 jouait un rôle déterminant au cours du trafic intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis.* Des cellules MDCK exprimant de façon stable la protéine VAMP7 tronquée pour son domaine Longin (ΔLongin) et couplée à la sonde fluorescente GFP ont été infectées durant 4 h par *Y. pseudotuberculosis* (Fig. 29A). En l'absence du domaine Longin, un marquage diffus est observé autour de la bactérie, confirmé par l'analyse du profil de fluorescence qui ne montre pas d'augmentation de l'intensité de la GFP (Fig. 29D-E). Ceci suggère que le domaine Longin jouerait un rôle dans le recrutement de VAMP7 au niveau de la vacuole bactérienne. Après dénombrement à 4 h, 6 h et 24 h post infection (p.i.), aucune différence significative n'a été observée dans la réplication de la bactérie entre les deux lignées cellulaires de MDCK, ce qui suggère que la bactérie ne semble pas être dégradée (Fig. 29F). Selon ces résultats nous nous somme demandé vers quelle voie du trafic intracellulaire *Y. pseudotuberculosis* est adressée et quel rôle joue VAMP7. L'analyse de l'acidité de la vacuole par l'utilisation de Lysotracker met en évidence de nombreuses bactéries présentes au sein d'une vacuole acide (Fig. 29G). De plus, l'observation en microscopie confocal de la distribution de VAMP7 au niveau de YCV montre que la protéine est recrutée aussi bien au niveau de la vacuole bactérienne acidifiée (Fig. 29G-29H) qu'au niveau d'une YCV non-acidifiée (Fig. 29G-29I). Nous émettons donc l'hypothèse que *Y. pseudotuberculosis* serait dirigée soit vers une voie de dégradation soit vers une autre voie qui permetterait le maintien de la bactérie dans un état de latence.

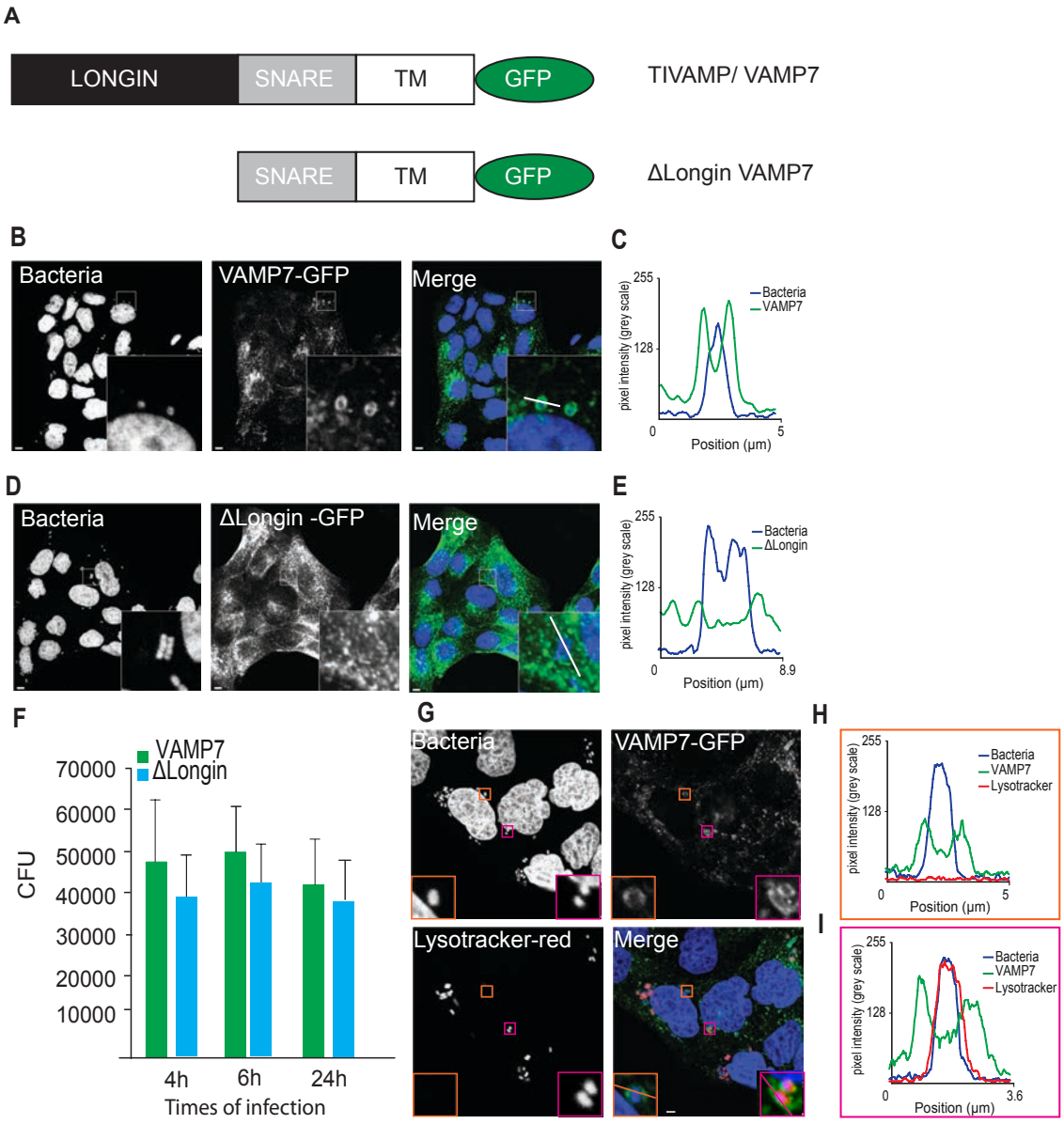


Figure 29 : VAMP7 est recrutée au niveau de la vacuole bactérienne. (A) Représentation schématique des différentes constructions de la protéine VAMP7 associée à la GFP et exprimée stablement dans les MDCK. **(B)** Les cellules MDCK exprimant stablement VAMP7-GFP ont été infectées pendant 4 h par *Y. pseudotuberculosis* puis fixées à la formaline et préparées pour l'analyse en CLSM. Les bactéries sont visualisées après marquage au DAPI (Bleu). L'encart montre une bactérie contenue dans une vacuole positive pour VAMP7-GFP. Barre d'échelle 5µm et grossissement de l'insert x5. Le profil de fluorescence associé à la ligne blanche est représenté dans le graphique en **(C). (D)** Les cellules MDCK exprimant stablement ΔLongin-GFP ont été infectées pendant 4 h par *Y. pseudotuberculosis.* L'encart montre un marquage diffus autour de la bactérie (bleu). Barre d'échelle 5µm et grossissement de l'insert x5. Le profil de fluorescence associé à la ligne blanche est représenté dans le graphique en **(E). (F)** Nombre d'unités formatrices de colonies (CFU) mesuré après 4 h, 6 h et 24 h d'infection. **(G)** Les cellules MDCK exprimant stablement VAMP7-GFP ont été infectées pendant 6 h par *Y. pseudotuberculosis* puis fixées à la formaline et préparées pour l'analyse en CLSM. L'encart orange montre une bactérie contenue dans une vacuole positive pour VAMP7-GFP mais négative pour le Lysotracker red. Le profil de fluorescence associé à la ligne orange est présenté en **(H)**. L'encart rose montre une bactérie contenue dans une vacuole positive pour VAMP7-GFP et positive pour le Lysotracker Red. Le profil de fluorescence associé à la ligne rose est représenté dans le graphique en **(I)** Barre d'échelle 5µm et grossissement de l'insert x5

De plus, l'observation du recrutement de VAMP7 au niveau des YCV, qui pourrait être dépendant du domaine Longin, suggère un possible rôle de cette SNARE dans le trafic

intracellulaire de la bactérie. Dans les MDCK nous n'avons donc pas observé de multiplication intracellulaire des bactéries comme celle décrite in vivo dans les macrophages. Comme nous voulions avoir un modèle reproduisant cette réplication nous avons testé une autre lignée cellulaire: les cellules HeLa, même si ces cellules épithéliales ne sont pas une cible physiologique. Au moins pouvaient-elles servir de modèle facilement manipulable pour disséquer les événements de trafic membranaire opérant lors de la réplication vacuolaire.

III. Article (en révision dans Autophagy)

Role of VAMP3 and VAMP7 in the commitment of *Yersinia pseudotuberculosis* to LC3-associated pathways involving single- or double-membrane vacuoles

Laure-Anne Ligeon[1,2,3,4], Kevin Moreau[1,2,3,4,*], Nicolas Barois[3,5], Antonino Bongiovanni[1,5], Delphine-Armelle Lacorre[4,5], Elisabeth Werkmeister[5,6], Véronique Proux-Gillardeaux[7,8], Thierry Galli[7,8], and Frank Lafont[1,2,3,4,5]

[1] Cellular Microbiology of Infectious Pathogens Group, Center for Infection and Immunity of Lille, Institut Pasteur de Lille, F-59021 Lille, France
[2] CNRS UMR8204, F-59021 Lille, France
[3] INSERM U1019, F-59021 Lille, France,
[4] University of Lille-Nord de France, F-59021 Lille, France
[5] BioImaging Center Lille-Nord de France, IFR142, Institut Pasteur de Lille, F-59021 Lille, France
[6] CNRS UM8161, Lille, France
[7] Institut Jacques Monod, UMR 7592, CNRS, University of Paris Diderot, F-75013 Paris, France
[8] INSERM ERL U950, 'Membrane Traffic in Neuronal & Epithelial Morphogenesis' Group, F-75013 Paris, France
[*] Current address: Cambridge Institute for Medical Research Wellcome Trust/MRC Building, Addenbrooke's Hospital, Hills Road Cambridge CB2 0XY UK

Email: frank.lafont@pasteur-lille.fr, Tel: +33 320 871 136, Fax +33 320 871 135

keywords: SNARE, VAMP3, VAMP7, autophagy, *Yersinia pseudotuberculosis*, LC3-associated phagosome

Running title: VAMPs and *Yersinia* invasion

Abstract

Yersinia pseudotuberculosis can replicate inside macrophages by hijacking autophagy and blocking autophagosome acidification. In bone marrow-derived macrophages, the bacteria are mainly observed inside double-membrane vacuoles positive for LC3, a hallmark of autophagy. Here, we address the question of the membrane traffic during internalization of *Yersinia* investigating the role of vesicle associated membrane proteins (VAMPs). First, we show that as well in epithelial cells, *Yersinia pseudotuberculosis* replicates mainly in non-acidic LC3-positive vacuoles. Second, in these cells, we unexpectedly found that VAMP3 localizes preferentially to Yersinia-containing vacuoles (YCVs) with single-membranes using correlative light-electron microscopy. Third, we reveal the precise kinetics of VAMP3 and VAMP7 association with YCVs positive for LC3. Fourth, we show that VAMP7 knockdown alters LC3's association with single-and multi-membrane-YCVs. Finally, in non-infected epithelial cells stimulated for autophagy, VAMP3 overexpression and knockdown led respectively to a lower and higher numbers of double-membrane, LC3-positive vesicles. Hence, our results highlight the role that VAMPs play in selection of the pathways leading to generation of ultrastructurally different LC3 compartments and pave the way for determining the full set of docking and fusion proteins involved in *Yersinia pseudotuberculosis*' intravesicular life cycle.

Introduction

Autophagy is an evolutionarily conserved mechanism for cellular self-digestion that can be involved in the host's immune response against microbial infection[1-4]. This pathway is conventionally described as comprising several steps in which cytoplasmic constituents or pathogens are sequestered within double-membrane vesicles called autophagosomes. The luminal contents are then degraded though fusion with lysosomes[5]. Three main "classical" autophagy pathways have been described: macro-autophagy, micro-autophagy and chaperone-mediated autophagy[6]. Macroautophagy is characterized by the hierarchically ordered activity of autophagy-related (ATG) proteins. The ATG8/microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) is generally considered to be the hallmark of autophagosomes[7-9]. It is important to note that LC3 can also be recruited to single-membrane phagosomes via a process called LC3-associated phagocytosis (LAP) [10-12]. Indeed, it has been shown that phagocytosis of Toll-like receptors in murine macrophages triggers LC3 recruitment to phagosomes; this process requires Beclin1, Vsp34, ATG5 and ATG7 but not the autophagy protein ULK-1[11,13]. This internalization process enhances the formation of an LC3-positive compartment capable of delivering engulfed bacteria to lysosomes[12,14,15]. It has been shown that during infection, *Listeria monocytogenes* expressing low level of listeriolysin O is not prone to phagosome escape and resides in single-membrane, LC3-positive, spacious *Listeria*-containing phagosomes{Birmingham:2008bp}. Thus, one of the main features of autophagy is the dynamic rearrangement of cell membrane structures via multiple membrane fusion events. Soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptors (SNAREs) are known to play a key role in the docking and subsequent fusion of intracellular membranes[17]. The membrane fusion of vacuoles is dependent on a SNARE complex composed of v/R-SNARE and t/Q-SNARE[18]. In fact, SNARE proteins are classified according to whether the central amino acid in the SNARE motif is arginine (R) or glutamine (Q) (yielding R-SNAREs and Q-SNAREs, respectively[19]) and whether they are located on the acceptor compartment (as target-SNAREs (t-SNAREs)) or on the donor membrane (vesicular-SNAREs, also known as v-SNAREs). The latter family includes vesicle-associated membrane proteins (VAMPs), in which glutamine is a central amino acid of the SNARE motif [20]. Studies in yeast have highlighted the involvement of SNAREs at several points in autophagy but the sequence of recruitment remains unknown. It is thought that Vam3 and Vam7 SNAREs are involved in the fusion between the autophagosome and the lysosome[21,22]. Tgl2, Sec22, Ykt6 and Sso1-Sec9 are also reportedly involved in autophagosome biogenesis via ATG9 transport[23]. Moreover, it has been reported that two mammalian v/R-SNAREs (VAMP3 and VAMP7) are involved in specific autophagy steps[24]. VAMP3 regulates amphisome formation by controlling the fusion between multivesicular bodies and autophagosomes[24]. VAMP7 is required for autophagosome biogenesis [25] and lysosome fusion events[24,26]. Mizushima and collaborators also highlighted that fact that

t/Q-SNARE syntaxin 17 and SNAP-29 bind to the v/R-SNARE VAMP8 and are required for fusion between the endosomal/lysosomal membrane and autophagosomal membrane and thus are involved in the degradation steps of autophagy[27-29]. In contrast, VAMPs 3, 7 and 8 reportedly have a role in the intracellular trafficking of pathogenic bacteria such as the Chlamydiae[30]. Moreover, VAMP7 was shown to be involved in phagosome formation during infection by *Helicobacter pylori* whereas VAMP3 was involved in phagosome maturation upon *Mycobacterium tuberculosis* infection[31,32].

We previously reported that *Y. pseudotuberculosis* is able to survive in murine bone marrow-derived macrophages (BMDMs) by hijacking autophagy and impairing the acidification of autophagosomes[33]. When autophagy is defective, *Yersinia* are degraded if ATG5 is knocked down or if an ATG4B mutant is overexpressed, these findings emphasized that autophagy provides a replicative niche for this pathogen[33]. The membrane fusion events leading to the formation and the growth of bacteria-containing vacuoles remained to be addressed. In the present study, we investigated the intracellular trafficking of *Y. pseudotuberculosis* in epithelial cells and compared with macrophages focusing on the involvement of SNAREs in these processes. To date, for the first time, we unveil the role played by VAMP3 in the formation of single-membrane LC3-positive vacuoles. Moreover, we reveal the kinetics of VAMP3 and VAMP7 recruitment to bacteria-containing vacuoles positive for LC3. Finally, we highlight the involvement of VAMP7 in the recruitment of LC3 to YCVs.

Results

In epithelial cells, *Yersinia pseudotuberculosis* replicates inside LC3-positive vacuoles

Following on from our finding that *Y. pseudotuberculosis* is able to replicate inside non-acidic autophagosomes in BMDMs[33], we sought to determine whether this bacterium can also replicate inside epithelial cells. We found that the number of Colony Froming Units (corresponding to intracellular bacteria) increased by a factor of 2.5 between 1 h and 24 h post-infection (**Fig. 1A**); this result confirmed an earlier report[34] that *Y. pseudotuberculosis* can replicate in HeLa cells. To determine whether autophagy is involved in *Yersinia* infection, we analyzed the distribution of the autophagy marker LC3 and observed its recruitment to *Yersinia*-containing vacuoles (YCVs). When studying HeLa cells stably expressing GFP-LC3, a confocal laser scanning microscopy (CLSM) analysis 4 h after infection with *Y. pseudotuberculosis* showed that GFP-LC3 and YCVs co-distributed (**Fig. 1B**). We then investigated the maturation of LC3-positive vacuoles containing *Y. pseudotuberculosis.* Firstly (in order to monitor the acidification of YCVs), we infected HeLa cells stably expressing the mRFP-GFP-LC3 construct. The disappearance of the GFP signal following protonation enables acidic compartments to be identified, whereas the presence of both mRFP and GFP signals indicates the presence of a non-acidic compartment[35]. Coupling

these markers to LC3 enabled the fate of LC3-positive vesicles to be tracked. Our observation of both GFP and mRFP signals (**Fig. 1C**) suggested that autophagosomes could not fuse with lysosomes. The line profile (**Fig. 1D**) revealed correlated increases in GFP and mRFP intensities on either sides of the bacterium. These results demonstrated the presence of a pool of *Y. pseudotuberculosis* located inside non-acidic, LC3-positive vacuoles. This pool was then quantified (in **Figure 1E**); we found that 55.3 ± 0.8%, of *Y. pseudotuberculosis* resided inside non-acidic, LC3-positive vacuoles. About 25% of bacteria were not labeled and may thus have been extracellular bacteria (probably killed by gentamycin treatment), bacteria not yet committed to the autophagy pathway and/or bacteria within phagosomes. Indeed, 15.7 ± 4.7% of bacteria were targeted to a LysoTracker-positive compartment corresponding to the phagosome-lysosomal pathway (**Fig. S1A**). Relatively few bacteria were targeted to autophagy-dependent degradation, since 17.1 ± 1.9% were located in an mRFP-positive but GFP-negative vacuole. Lastly, the mRFP-negative and GFP-positive profiles might correspond to background noise or a tiny pool of non-functional mRFP proteins. Taken as a whole, our data suggest that *Y. pseudotuberculosis* is able to replicate inside non-acidic, LC3-positive vacuoles in epithelial cells. We then wanted to investigate the ultrastructure of these LC3-positive YCVs.

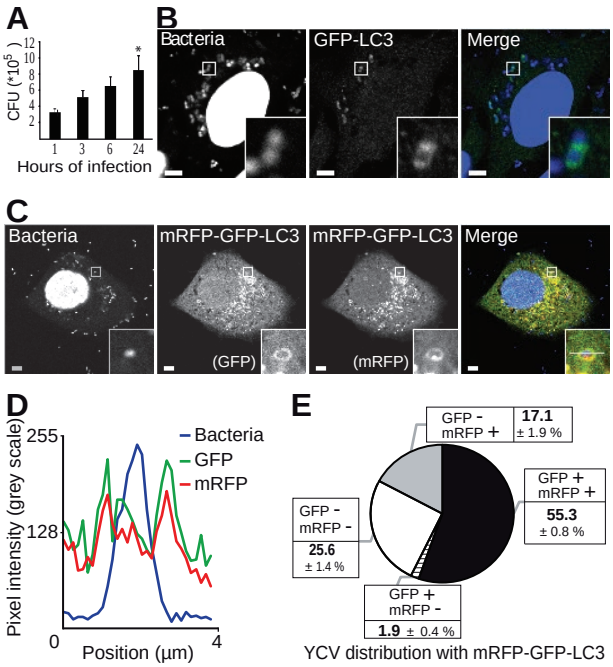


Figure 1. *Yersinia pseudotuberculosis* resides in non-acidic, LC3-positive compartments.(A) Intracellular replication of *Y. pseudotuberculosis* inside HeLa cells. Colonies were counted1, 3, 6 and 24 h after infection. Data represent the mean ± SEM of three independent experiments. (B) HeLa cells transiently expressing GFP-LC3 were infected with wild-type *Y. pseudotuberculosis* for 4 h and processed for CLSM. Bacteria were visualized after staining with DAPI. The insert shows bacteria inside a LC3-postive vacuole. Scale bars: 5 µm. Insert magnification: x5. (C) Bacteria contained in LC3-vacuoles do not reach an acidified compartment. HeLa stably expressing mRFP-GFP-LC3 were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 4 h and processed for CLSM. Bacteria were visualized after staining with DAPI. The insert shows a bacterium inside an mRFP-GFP-LC3 vacuole. Scale bars: 5 µm. Insert magnification: x5. The fluorescence profile along the white line in the image insert is shown in the lower left corner (D).(E) The distribution of bacteria is plotted as a function of GFP-LC3 and mRFP-LC3 labeling, 4 h p.i.. In each experiment, at least 50 infected cells were quantified in a double-blind analysis. Data are displayed as the mean ± SEM from at least three independent experiments.

Y. pseudotuberculosis is contained within non-acidic, LC3-positive, single-membrane vacuoles in epithelial cells

Having observed the recruitment of LC3 to YCVs in epithelial cells, we went on to characterize these organelles in an ultrastructural analysis. We had previously shown that *Y. pseudotuberculosis* can reside in LC3-positive, double-membrane autophagosomes in BMDMs[33]. To this end, we performed Correlative Light Electron Microscopy on HeLa cells stably expressing an mRFP-GFP-LC3 construct and that had been infected for 4 h with *Y. pseudotuberculosis*. In CLSM, the YCVs displayed the mRFP and GFP fluorescence associated with LC3 (insert, **Fig. 2A**) – thus confirming the bacteria's location within non-acidic, LC3-positive vacuoles (**Fig. 1 and 2A**). However, the CLEM analysis showed that these bacteria were present within single-membrane vacuoles and not the double-membrane vacuoles associated with "classical" autophagy (**Fig. 2A**). We confirmed this observation by performing a quantitative analysis of YCV profiles (**Fig. 2B and 2C**). Moreover, we monitored the vacuoles' ultrastructural features during infection. *Y. pseudotuberculosis* was mainly found inside single-membrane vacuoles (from 30 mn p.i. onwards and as late as 24 h p.i. - data not show). Indeed, 96 ± 0.5% of YCVs presented only a single membrane at 4 h post infection (**Fig. 2C**). We checked these results in HeLa cells not expressing the mRFP-GFP-LC3 construct (data not shown). We also confirmed that *Y. pseudotuberculosis* can replicate inside single-membrane vacuoles, since the number of bacteria increased during infection and a replicative profile could be observed (**Fig. 2B**). These results were reminiscent of LAP and (in view of our previous results in macrophages) suggested that *Y. pseudotuberculosis* is capable of replicating within several different types of LC3-positive vacuoles, autophagosomes inside BMDMs and LAPs in HeLa cells. Given that the bacteria replicate, the LC3-positive vacuoles should be supplied with incoming membranes. Due to the SNAREs' role in membrane trafficking, our findings prompted us to investigate the proteins' involvement in *Yersinia*'s intracellular life cycle.

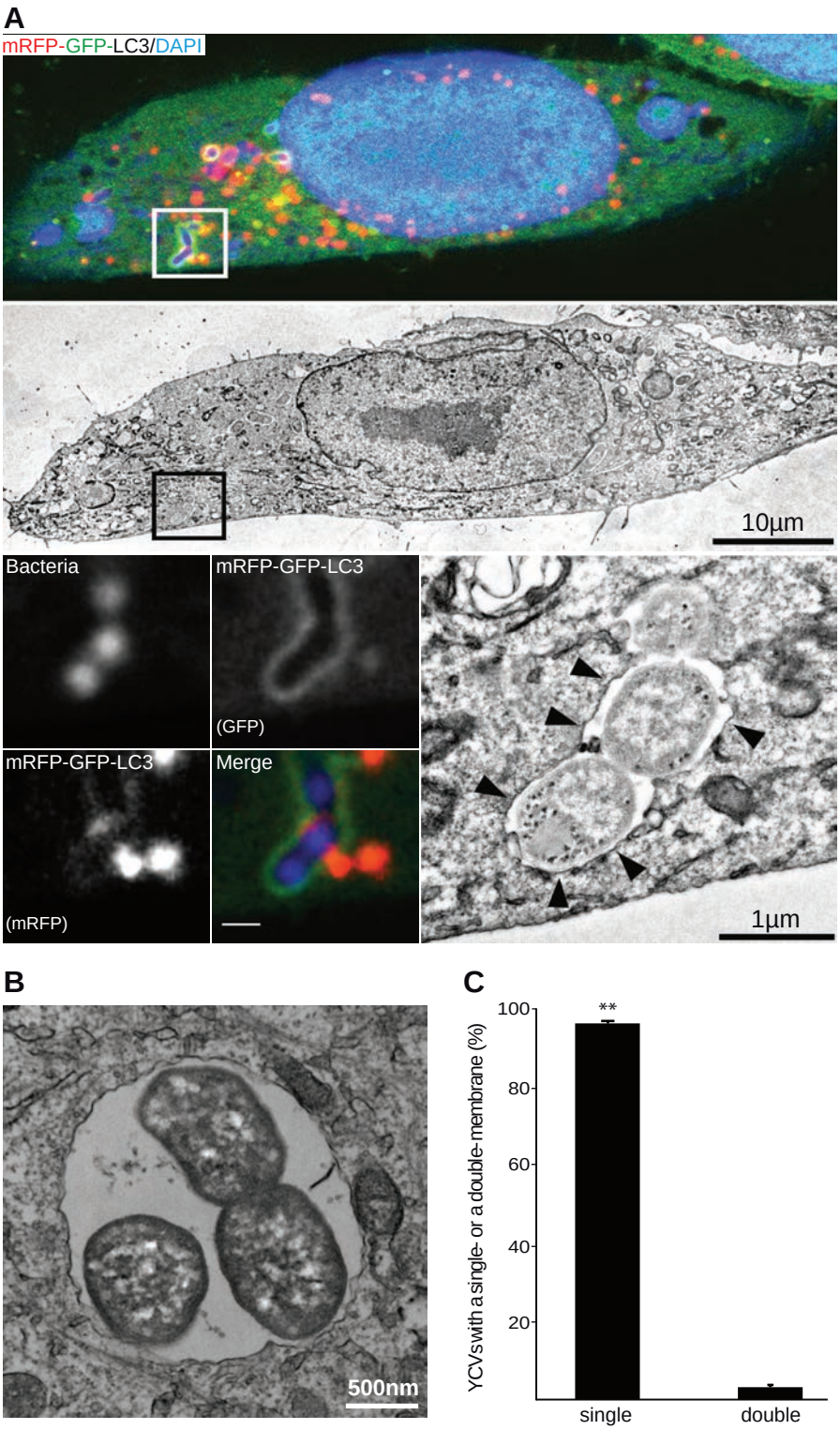


Figure 2. *Yersinia pseudotuberculosis* is contained within single-membrane, non-acidic, LC3-positive vacuoles. (A) HeLa cells stably expressing mRFP-GFP-LC3 were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 4 h and then processed for CLEM. Bacteria were visualized after staining with DAPI. The upper panel shows a single HeLa cell observed by CLSM and the middle panel shows the corresponding TEM image. The lower left images show bacteria inside an mRFP-GFP-LC3 vacuole (insert magnification: x8). The lower right image shows bacteria contained inside a single membrane vacuole (arrowheads). (B) Bacteria dividing inside a single-membrane vacuole, as visualized by TEM. HeLa cells stably expressing mRFP-GFP-LC3 were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 4 h and then processed for electron microscopy. (C) A qualitative TEM analysis of YCVs with single or double membranes. Values are quoted as the mean ± SEM from three independent experiments in which at least 20 HeLa cells stably expressing mRFP-GFP-LC3 were analyzed.

VAMP3 and VAMP7 are sequentially recruited to LC3-positive and single-membrane YCVs in epithelial cells

We focused on two t-SNAREs (VAMP3 and VAMP7), reportedly involved in the autophagy pathway[24]. Following infection of HeLa cells, EGFP-VAMP3 and GFP-VAMP7 co-distributed with *Y. pseudotuberculosis* (**Fig. 3A and 3B**). We then characterized the time course of recruitment as the infection proceeded. Thirty minutes after the entry of *Yersinia* into HeLa cells, we found that about 80% of YCVs were labeled with VAMP3 (**Fig. 3A, 3C-3D and Movie S1**); however, this phenomenon was transient because VAMP3 started to dissociate from the YCVs after 30 minutes (**Fig. 3D, white arrow and Movie S1**). At the same time, VAMP7 began to be recruited to YCVs (**Fig. 3D and Movie S1**). We saw that VAMP7-positive vacuoles migrated and then fused with YCVs (**red arrows in Fig. 2D and Movie S1**). After 4 h of infection, the majority of YCVs displayed VAMP7 labeling. The protein remained bound to YCVs for 24 h post infection (p.i.) (**Fig. 3C**). Our results thus reveal the sequential recruitment of VAMP3 and then VAMP7 to YCVs and suggest that these v-SNAREs are involved in the intracellular trafficking of *Y. pseudotuberculosis* in epithelial cells.

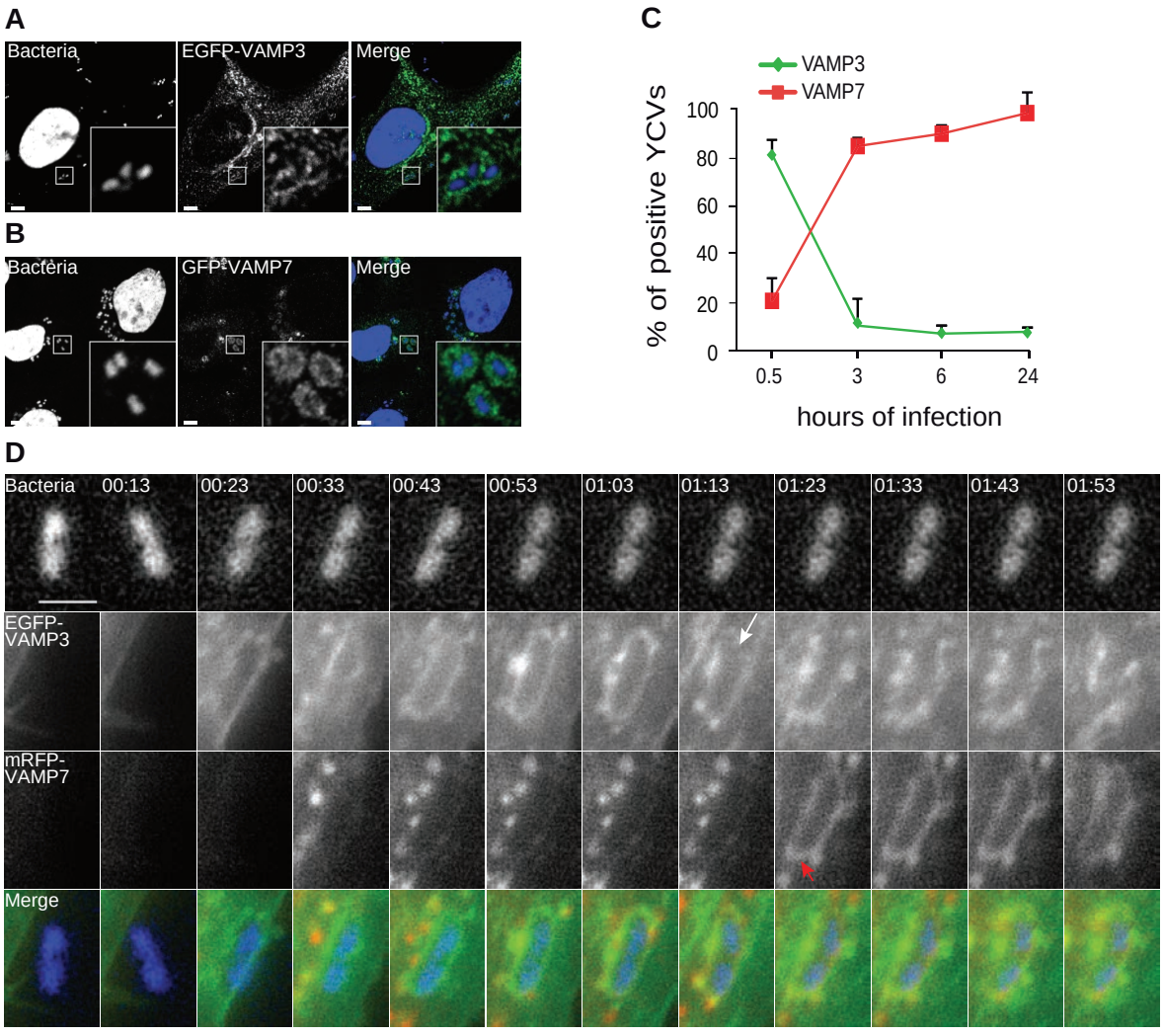


Figure 3. VAMP3 and VAMP7 associate with YCVs. (A) HeLa cells transiently expressing an EGFP-VAMP3 chimera were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 45 mn and then processed for CLSM. Bacteria (blue) are contained in EGFP-VAMP3-positive vacuoles. Scale bar: 5 µm. Insert magnification: x5. **(B)** HeLa cells transiently expressing an GFP-VAMP7 chimera were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 4 h and then processed for CLSM. Bacteria (blue) are contained in mRFP-VAMP7-positive vacuoles. Scale bar: 5 µm. Insert magnification: x5. **(C)** A time-series acquisition of VAMP3 and VAMP7 proteins on YCVs during infection. Data represent average percentages of YCVs positive for the considered protein (in three independent experiments and after the analysis of 50 transfected, infected cells per experiment). **(D)** HeLa cells transiently expressing EGFP-VAMP3 (green) and mRFP-VAMP7 (red) were infected for 3 h and 33 mn with *Y. pseudotuberculosis*. Bacteria were stained with DAPI (DNA, blue). Panels show series of images from MOVIE S1 (Supporting Information) showing the migration of EGFP-VAMP3 and mRFP-VAMP7 proteins around a YCV. The white arrow indicates dissociation of VAMP3 from the YCV. Red arrows indicate VAMP7 vesicles heading to fusion with the YCV. At 1:23, the YCV displays VAMP7 on its surface as a result of these fusions. Acquisition times are indicated in the lower left corner (hr:mn). Scale bar: 5 µm.

In view of the subsequent recruitment of LC3, we wanted to know when it was coming into the sequence. HeLa cells transiently expressing EGFP-VAMP3 were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 30 mn before fixation. Next, the distribution of LC3 was examined by CLSM. We found that 56.0 ± 5.0% of YCVs were positive for EGFP-VAMP3 but negative for LC3 (**Fig. 4A-4C**). In contrast, only 17.5 ± 0.7% of YCVs presented both EGFP-VAMP3 and mRFP-LC3 signals and only a tiny pool displayed the LC3 signal but not the VAMP3 signal (**Fig. 4C**). Neither signal could be detected in 19.6 ± 4.6% of YCVs (**Fig. 3C**). On the basis of these results, we concluded that VAMP3 was recruited upstream of LC3. We performed similar experiments on HeLa cells transiently expressing the GFP-VAMP7 and mRFP-LC3 constructs. After 4 h of *Y. pseudotuberculosis* infection, we observed YCVs displaying both VAMP7 and LC3 recruitment (**Fig. 4D**). Co-distribution was also observed on line profiles plots (such as that shown in **Figure 4E**, depicting the correlation between GFP fluorescence and mRFP fluorescence). Moreover, by using HeLa stably transfected with the mRFP-GFP-LC3 construct, we observed that VAMP7 was recruited to non-acidic, LC3-positive organelles (**Fig. S1B-D**). Although these organelles were positive for the lysosomal markers CD63 and LAMP-1, they were LysoTracker-negative (**Fig. S1B-S1D**). We noticed that almost 57% of the YCV pool presented both VAMP7 and LC3 signals, whereas only about 25% and 5% of the YCVs presented GFP-VAMP7 only and mRFP-LC3 only signals, respectively (**Fig. 4F**). Only 12.6 ± 0.2% of the YCVs were negative for both signals (**Fig. 4F**). The difference in the percentage of LC3-negative YCVs between **Figure 1E** and **Figure 4F** might be due to the use of a stably transfected cell line in one experiment (**Fig. 1E**) and transiently transfected cells in the other (**Fig. 4F**). These results, prompted us to investigate the time course of VAMP7/LC3 recruitment. By using video microscopy, we observed the migration of GFP-VAMP7 and mRFP-LC3 vacuoles in HeLa cells infected with *Y. pseudotuberculosis.* On **Figure 4G** and **Movie S2** (after 1 h 24 mn of infection), one can start to see the GFP-VAMP7 signal. The mRFP-LC3 signal appeared later. Moreover, the markers appeared as hot spots containing one of the signals or both (**Fig. 4G and Movie S2**). These results suggest that both VAMP3 recruitment and VAMP7 recruitment precede LC3 recruitment to YCVs. In view of these

results, we wondered whether VAMP7 might have a role in the recruitment of LC3 to YCVs in epithelial cells.

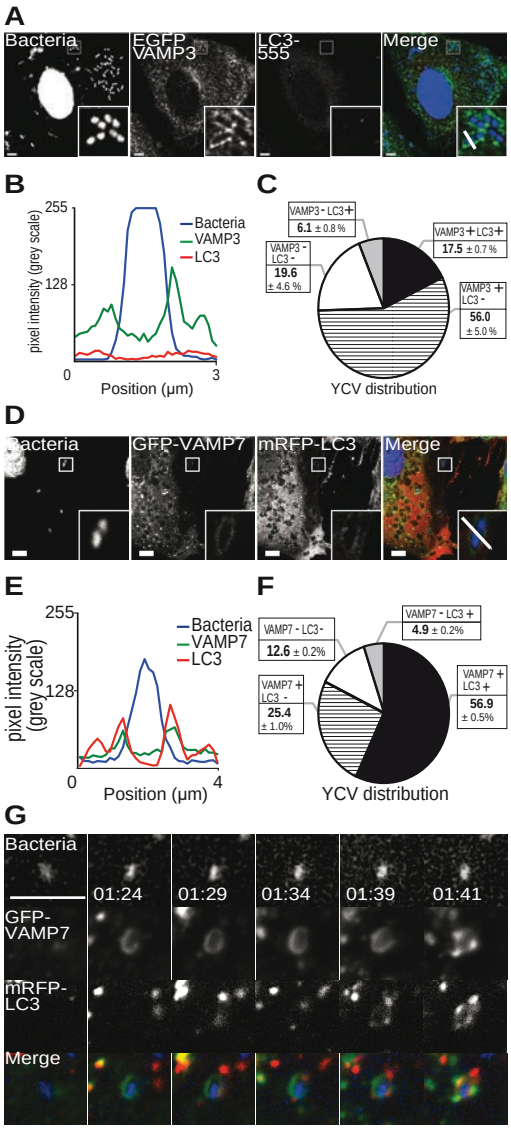


Figure 4. YCV vacuoles harbor LC3 and SNARE proteins (A) HeLa cells transiently expressing an EGFP-VAMP3 chimera were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 30 mn and then processed for CLSM. Bacteria (blue) are contained within EGFP-VAMP3-positive and LC3-AlexaFluor®555-negative vacuoles. Scale bar: 5 µm. Insert magnification: x4. A fluorescence scan along the white line in the insert in the merged panel is shown in **(B)**. **(C)** A pie chart displaying the distribution of bacteria as a function of EGFP-VAMP3 and LC3-AlexaFluor®555 labeling. In each experiment, at least 50 infected cells were quantified in a double-blind analysis. Values are quoted as the mean ± SEM from at least three independent experiments. **(D)** HeLa cells transiently expressing GFP-VAMP7 proteins were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 4 h and then processed for CLSM. Bacteria (blue) are contained in GFP-VAMP7-positive and mRFP-LC3 negative vacuoles. Scale bar: 5 µm. Insert magnification: x4. A fluorescence scan along the white line in the insert is shown at the bottom **(E)**. **(F)** A pie chart displaying the distribution of bacteria as a function of GFP-VAMP7 and mRFP-LC3 labeling. In each experiment, at least 50 infected cells were quantified in a double-blind analysis. Values are quoted as the mean ± SEM from at least three independent experiments. **(G)** HeLa cells transiently expressing GFP-VAMP7 (green) and mRFP-LC3 (red) were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 2 h. Cells were stained with DAPI (DNA, blue). Panels show series of images from MOVIE S2 (Supporting Information). Acquisition times are indicated in the lower left corner (hr:mn). Scale bar: 5 µm.

VAMP7 is involved in LC3 recruitment to YCVs

VAMP7 is reportedly involved in autophagosome biogenesis because knockdown of this protein decreases levels of autophagy as a result of limited LC3 processing[25]. We looked at whether VAMP7 might play a role in LC3's recruitment to YCVs. After transfection with a control siRNA, we observed the recruitment of VAMP7 and GFP-LC3 to YCVs (**Fig. 5A**) and confirmed the co-distribution according to the line profile plots (**Fig. 5B**). After VAMP7 RNA silencing, infected HeLa cells transiently expressing GFP-LC3 displayed YCVs devoid of LC3 (**Fig. 5C and 5D**). We then performed a series of immunoblots to investigate the processing of LC3. After its synthesis and the activation of autophagy, LC3 is proteolytically converted into a form lacking C-terminus amino acids (referred to as LC3-I), which in turn is modified by conjugation with phosphatidylethanolamine to form LC3-II. This latter is a hallmark of the mature autophagosome and thus reflects induction of the autophagy pathway. We thus quantified the intensity of the LC3-II band[9]. As has been observed in macrophages [33], infection with *Y. pseudotuberculosis* activated autophagy. Infection increased autophagy even after treatment with rapamycin (which induces autophagy by inhibiting the phosphorylation of mTOR) (**Fig. 5E, 5F and S2A**). After treatment with bafilomycin A1 (which inhibits autophagosome acidification and thus reduces further fusion with lysosomes), there was no difference in autophagy levels when comparing infected and non-infected cells (**Fig. 5E and 5F**). The fact that infection impairs acidification (see above) explained why we could not observe changes in LC3-I processing upon bafilomycin treatment of infected cells. Western blot results confirmed that siRNA treatment had knocked down VAMP7 expression to 22.6 ± 3.0% of the control value (Figure S2A and S2C). VAMP7 knockdown significantly impaired the infection-dependent activation of autophagy (**Fig. 5E and S2A-S2C**). The $[(\text{LC3II/tubulin})_{\text{infected}}]/[(\text{LC3II/tubulin})_{\text{non-infected}}]$ ratio was significantly lower for siVAMP7-treated cells than for siCTRL- treated cells (**Fig. 5E and 5G**). These results confirmed VAMP7's involvement in the early steps in the autophagy pathway (as suggested previously [25]) and demonstrated its involvement in the recruitment of LC3 to YCVs during the course of *Y. pseudotuberculosis* infection in epithelial cells. Furthermore, rapamycin treatment did not accentuate the effect of VAMP7 siRNA treatment. Taken as a whole, these results strongly suggest that VAMP7 has a role in LC3 recruitment to *Yersinia*-containing single-membrane vacuoles.

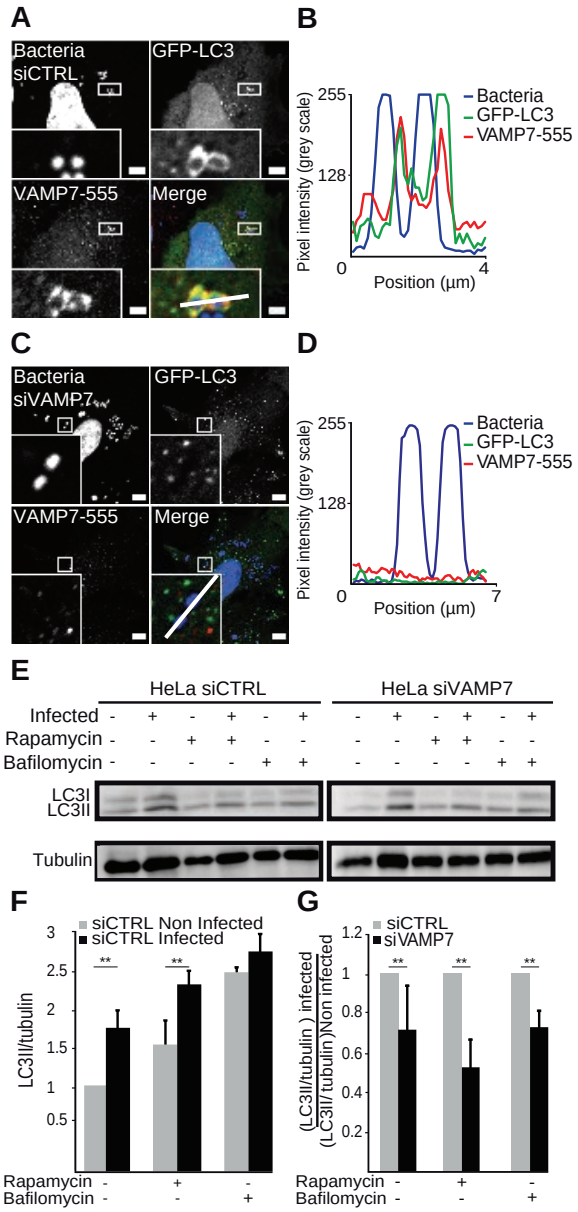


Figure 5. VAMP7 has a role in the recruitment of LC3 to YCVs-LAP.

(A) HeLa cells transiently expressing a GFP-LC3 chimera and treated with control siRNA (siCTRL) were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 4 h and then processed for CLSM. VAMP7 proteins were immunostained and visualized with a secondary antibody coupled to AlexaFluor®555. Bacteria (blue) are contained in GFP-LC3- (green) and VAMP7-AlexaFluor®555- (red) positive vacuoles. Scale bar: 5 µm. Insert magnification: x4. A fluorescence scan along the white line in the insert is shown in the right panel **(B)**. **(C)** HeLa cells transiently expressing a GFP-LC3 chimera and treated with VAMP7 siRNA (siVAMP7) were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 4 h and then processed for CLSM. VAMP7 proteins were immunostained and visualized with a secondary antibody coupled to AlexaFluor®555 (red). Bacteria (blue) are contained in GFP-LC3-positive (green) and VAMP7-AlexaFluor®555-negative vacuoles. Scale bar: 5 µm. Insert magnification: x5. A fluorescence scan along the white line in the merged insert is shown on the right **(D). (E)** HeLa cells transfected with control or VAMP7 siRNA were analyzed for LC3 by immunoblotting. The cells were treated with rapamycin or bafilomycin A1 as indicated and DMSO was used as a solvent control. Protein loading was checked against the alpha-tubulin content. The complete dataset is shown in Figure S2A. **(F)** The LC3 II/tubulin ratio for the HeLa siCTRL condition as a function of cell treatment or infection. The data correspond to the mean of three independent experiments and the error bars correspond to the SEM.**(G)** VAMP7's role in *Yersinia*-activated autophagy is shown by the $[(\text{LC3 II/tubulin})_{\text{infected}}]/[(\text{LC3 II/tubulin})_{\text{non-infected}}]$ ratio for HeLa cells treated with control siRNA (siCTRL) or siRNA against VAMP7 (siVAMP7) and as a function of drug treatments. The data correspond to the mean of three independent experiments and the error bars correspond to the SEM.

VAMP3, VAMP7 and LC3 recruitment to YCVs in macrophages

In macrophages, *Y. pseudotuberculosis* is able to replicate within non-acidic autophagosomes [33] and in view of our precedent results in HeLa cells, we then investigated VAMP3 and VAMP7 involvement during macrophage infection. We infected BMDMs transiently expressing EGFP-VAMP3 or mRFP-VAMP7 and used SIM to observe that EGFP-VAMP3 was recruited to YCVs 30 mn p.i. (**Fig. 6A and 6B**). mRFP-VAMP7 was recruited to YCVs later (4 h p.i) in macrophages than in epithelial cells (**Fig. 6C and 6D**). Autophagy was activated by infection (**Fig. 6E, 6F and S2D**) after control siRNA treatment of BMDMs. VAMP7 siRNA treatment reduced the percentage of cells expressing VAMP7 to 48.5 ± 0.1% of the control value (**Fig. S2D-S2F**). Under control conditions, we observed a lower $[(LC3II/tubulin)_{infected}]/(LC3II/tubulin)_{non\text{-}infected}]$ ratio and the effects were not accentuated by bafilmycin A1 or rapamycin treatments of the cells (**Fig. 6E-6G and S2D-S2E**). In view of the efficiency of VAMP7 knockdown and the level of LC3-I processing, we concluded that VAMP7 is involved in the recruitment of LC3 to double-membrane YCVs in BMDMs. Hence, the time course of VAMP3, VAMP7 and LC3 recruitment did not differ in HeLa cells and BMDMs. Nevertheless, the LC3-positive YCVs in the two cell types differed in terms of their shape; most of the vesicles had a single-membrane in HeLa cells, whereas LC3-positive YCVs displayed double-membrane in BMDMs. However, there were few VAMP3-positive YCVs in BMDMs.

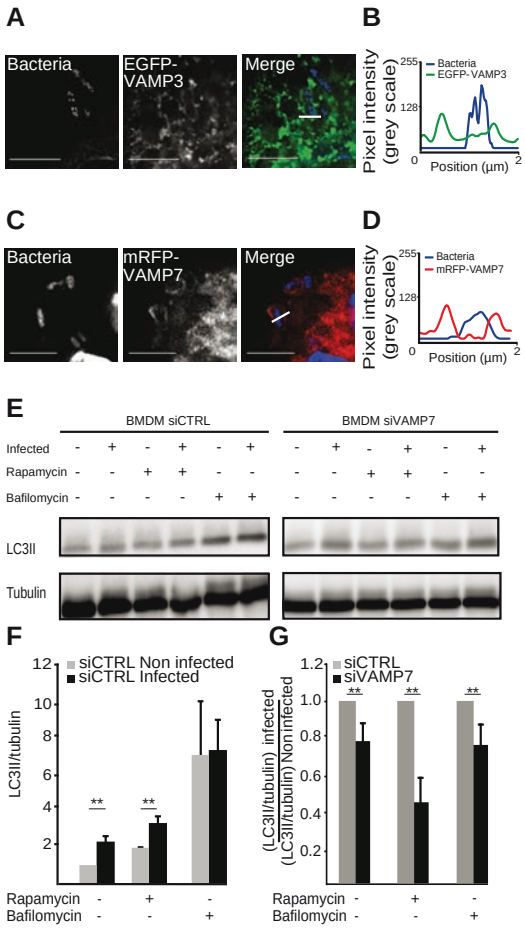


Figure 6. VAMP3 and VAMP7 are recruited to YCVs in macrophages and VAMP7 is involved in LC3 recruitment. (A) BMDMs transiently expressing EGFP-VAMP3 were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 30 mn and then processed for super resolution fluorescence analysis (structured illumination microscopy- SIM). Bacteria were visualized after staining with DAPI. Scale bars: 5 μM. The fluorescence profile along the white line of the image insert is shown in the lower left corner **(B). (C)** BMDMs transiently expressing mRFP-VAMP7 were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 3 h and then processed for SIM. Bacteria were visualized after staining with DAPI. Scale bars: 5 μM. The fluorescence profile along the white line in the image insert is shown at the bottom left **(D). (E)** BMDMs transfected with control (siCTRL) or VAMP7 siRNA were analyzed for LC3 by immunoblotting. The cells were treated with rapamycin or bafilomycin A1 as indicated and DMSO was used as a solvent control. Protein loading was checked against the tubulin content. The complete dataset is shown in Figure S2D. **(F)** The LC3 II/tubulin ratio for BMDMs treated with control siRNA (siCTRL) as a function of cell treatment or infection. The mean of three independent experiments is indicated and the error bars correspond to the SEM. **(G)** [(LC3 II/tubulin) $_{infected}$]/[(LC3 II/tubulin) $_{non-infected}$] ratio in BMDMs treated with control siRNA (siCTRL) or siRNA against VAMP7 (siVAMP7) cells as a function of treatment with rapamycin or bafilomycin A1. The mean of three independent experiments is indicated and the error bars correspond to the SEM.

VAMP3 participates in a checkpoint for LC3-positive vacuole morphology

At 30 mn p.i., we observed that almost 74% of YCVs in HeLa cells were positive for VAMP3, whereas the corresponding figure was only 14% in macrophages (**Fig. 3, 4A-4C, 6A-6B and 7A-7C**). In contrast, we noticed that the majority of the non-acidic, LC3-positive vacuoles had multiple-membrane in BMDMs [33] and single-membrane in HeLa cells (**Fig. 2**). We therefore wondered whether VAMP3 might have a regulatory role in this checkpoint and therefore looked at whether the level of VAMP3 expression influenced the ratio between single- and multiple-membrane YCVs.

In a first step, we knocked down the expression of VAMP3 in HeLa cells and examined the proportion of single/double membrane YCVs. HeLa cells were treated with VAMP3 and siGLO-GREEN siRNAs. siGLO-positive cells were sorted by FACS. This pool of cells then underwent a second round of siVAMP3 and control siRNA treatment. Effective VAMP3 knockdown was checked by Western blotting (**Fig. S3A and S3B**) and infected cells were analyzed by electron microscopy. Four hours p.i., treatment of HeLa cells with siRNA against VAMP3 was associated with a 14% decrease in the percentage of single-membrane YCVs and a 7-fold increase in double- and multiple-membrane YCVs (**Fig. 7D and 7E**). In a second step, we overexpressed VAMP3 in BMDMs and again analyzed the proportion of single-/double-membrane YCVs. In BMDMs, only 8.3 ± 4.2% of LC3-positive YCVs also displayed VAMP3 after 30 mn of infection and the majority of LC3-positive YCVs were VAMP3-negative (**Fig. 7A-7C**). The pEGFP-VAMP3 transfection in BMDMs was moderately effective, since only about 17% of macrophages expressed the fusion protein (data not shown). Upon EGFP-VAMP3 overexpression, an electron microscopy analysis revealed a decrease in the proportion of double-/multi-membrane YCVs (relative to BMDMs expressing GFP alone) (**Fig. 7F and 7G**). Taken as a whole, these data suggest that the recruitment of VAMP3 to the bacterial vacuole favors the single-membrane, LC3-positive YCV pathway.

We next wondered whether VAMP3 might influence the number of membranes (i.e. double vs. single) observed in LC3-positive compartments independently of infection. Since the baseline level of autophagy was low, HeLa cells transiently expressing EGFP or EGFP-VAMP3 were treated with rapamycin and then processed for electronic microscopy. We checked that HeLa cells were correctly transfected and that rapamycin treatment increased the autophagy level after expression of either plasmid (**Fig. S3C-S3F**). As expected, the electron microscopy profiles revealed that rapamycin-treated, EGFP-expressing HeLa contained more double-membrane vacuoles than untreated cells did (**Fig. 7H, 7I and S3G**). LC3-I processing was unaffected during EGFP-VAMP3 expression (**Fig. S3D-S3F**). Interestingly, we observed fewer double-membrane vacuoles in rapamycin-treated VAMP3-overexpressing cells than in the EGFP-rapamycin condition (**Fig. 7H 7I and S3C-S3G**). Cells overexpressing VAMP3 and untreated cell expressing EGFP had similar numbers of double-membrane vacuoles (**Fig. 7H, 7I and S3G**).

We used Western blots to assess the impact of VAMP3 overexpression and knockdown on LC3-I processing independently of infection. Treatment with rapamycin and/or bafilomycin did not significantly modify LC3-I processing in HeLa cells transiently expressing EGFP-VAMP3 or HeLa cells HeLa treated with VAMP3 siRNA (**Fig. S4A-S4D**). These data suggested that the presence of VAMP3 influenced the nature of the LC3-positive membrane compartments.

Hence our results suggest that VAMP3 acts at a checkpoint at which bacteria are committed to single-or multi-membrane LC3-positive YCV pathways and more generally raise the question of the SNAREs' involvement in selection of the LC3 route.

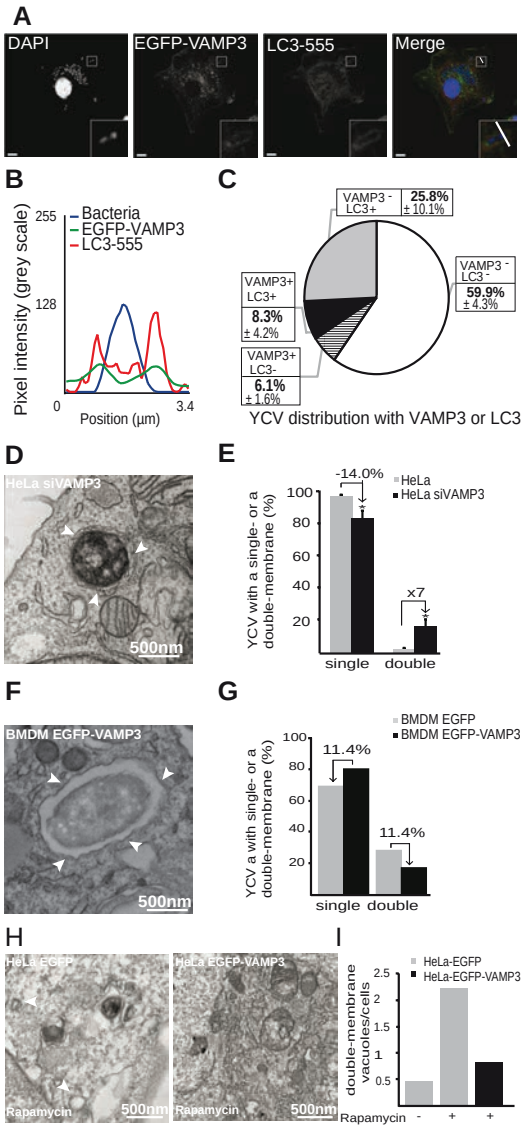


Figure 7. VAMP3 participates in the regulation of LC3-positive vacuole morphology. (A) BMDMs transiently expressing an EGFP-VAMP3 chimera were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 30 mn and then processed for CLSM. Bacteria (blue) are contained within EGFP-VAMP3-positive and LC3-AlexaFluor®555-negative vacuoles. Scale bar: 5 µm and insert magnification x4. A fluorescence scan along the white line on the insert in the merged panel is shown in **(B). (C)** A pie chart displaying the distribution of bacteria as a function of EGFP-VAMP3 and LC3-AlexaFluor®555 labeling. In each experiment, at least 30 infected cells were quantified in a double-blind analysis. Values are quoted as the mean ± SEM from at least three independent experiments. **(D)** The panel shows a bacterium inside a double-membrane vacuole (as visualized by TEM) in a HeLa cell treated with VAMP3 siRNA (siVAMP3). HeLa cells were treated with VAMP3 siRNA and siGLO-GREEN siRNA, sorted according to the GFP signal, again treated with VAMP3 siRNA or siCTRL, infected with *Y. pseudotuberculosis* for 4 h and then processed for TEM. Arrowheads show double-membrane vacuoles.**(E)** Quantification of YCVs with single- or double-membrane after 4 h p.i in HeLa cells treated with control (siCTRL) or VAMP3 (siVAMP3) siRNA. For each experiment, 45 cells were analyzed. The mean of three independent experiments is indicated and the error bars correspond to the SEM. **(F)** BMDMs transiently expressing EGFP-VAMP3 were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 3 h and processed for TEM. Arrowheads show *Y. pseudotuberculosis* contained in a single-membrane vacuole. **(G)** TEM quantification of single- or double-membrane YCVs for 38 BMDMs transiently expressing EGFP-VAMP3 or EGFP.**(H)** HeLa cells transiently expressing EGFP (left) or EGFP-VAMP3 (right) were treated with rapamycin for 7 h and then processed for TEM. White arrowheads show double-membrane vacuoles. The complete dataset is shown in Supporting Information Figure S3G.**(I)** Quantification of double-membrane vacuoles in HeLa cells transiently expressing EGFP or EGFP-VAMP3 and treated (or not) with rapamycin. In each experiment, at least 35 infected cells were quantified in a double-blind analysis

.

Discussion

The present study revealed four key characteristics of intracellular *Y. pseudotuberculosis* trafficking during the early stages of host cell invasion: (i) bacteria can traffic through different LC3-positive membrane pathways to reach intracellular replication niches; (ii) VAMP3 is involved in the commitment of bacteria towards replication in single-membrane, LC3-positive vacuoles; (iii) VAMP3 and VAMP7 are recruited sequentially to YCVs and (iv) VAMP7 has a role in the recruitment of LC3.

Although LAP has already been described for cytosol-resident bacteria and vacuolar bacteria in macrophages [12], we report herein the formation of single-membrane, LC3-positive YCVs in epithelial cells.

Analysis of *Y. pseudotuberculosis* traffic in epithelial cells revealed that the bacteria were able to replicate inside intracellular vacuolar niches and travel along several different pathways. Surprisingly, a CLEM analysis of infected HeLa cells showed that most of the *Y. pseudotuberculosis* was enclosed in vacuoles with a single mRFP-GFP-LC3-positive membrane. Our data suggested that in epithelial cells infected with *Y. pseudotuberculosis,* LC3 proteins are directly recruited to single-membrane YCVs (as previously reported for vacuolar bacteria in macrophages infected with *Escherichia coli* or *Burkholderia pseudomallei*[13-15]). The presence of *Y. pseudotuberculosis* inside non-acidic, single-membrane, LC3-positive vacuoles in epithelial cells enabled us to extend the LAP model already described by Brumell for macrophages infected with *Listeria monocytogenes*[36]**.** In fact, *Listeria* (probably expressing a low amount of Listeriolysin O[12]) are targeted by the LAP pathway via diacylglycerol enrichment and downstream reactive oxygen species production to establish spacious *Listeria*-containing phagosomes used as intracellular niches (SLAPs)[36]. There are also literature data to show that wild type *Escherichia coli* induced a rapid recruitment of LC3 to the phagosome in macrophages [13]. On the other hand, *Burkholderia pseudomallei* mutant lacking the type-3 secretion system follow the LAP pathway for their degradation in macrophages[15,36]**.** We have previously shown that in BMDMs, 80% of the LC3-positive compartments containing *Y pseudotuberculosis* had a double- or multi-membrane autophagosomes (20% were present in single-membrane LC3-positive vacuoles)[33]. Hence, impairment of acidification blocks the maturation of both single- and double-membrane LC3-positive vacuoles containing *Y. pseudotuberculosis* (in epithelial and macrophages, respectively), which allows the bacteria to establish replicative niches (data from the present study and from [33], respectively). Herein, we showed that *Y. pseudotuberculosis* subverts the LAP and autophagosome pathways and thus creates a replicative niche the ultrastructure of which depends on the cell type. This finding raises the question of how LC3 pathways are selected.

A variety of studies have highlighted the involvement of SNAREs in the autophagosome biogenesis and autophagosome-lysosome steps of autophagy[24,27,28,37]. In the present study, we provide compelling evidence for the recruitment of VAMP3 followed by VAMP7 to YCVs positive for LC3 4 h p.i in both epithelial cells and macrophages. In epithelial cells, the majority of YCVs are VAMP3-positive. In contrast, few YCVs in BMDMs are positive for VAMP3. Our present data highlighted a correlation between VAMP3 recruitment to YCVs during early-stage infection on one hand and the morphology of LC3-positive vacuoles on the other (Figure 7 and Figure S3). It has been previously reported that SNAREs can be involved during bacterial infection. For instance, VAMP7 is required for the formation of vacuoles induced by the VacA toxin produced by *Helicobacter pilory*[32]. A study has shown the kinetics of recruitment of VAMP3, 8, 7 proteins to the *Coxiella burnetii*-containing vacuole [38]. Authors highlighted that the percentage of *Coxiella* replicative vacuoles (CRVs) colocalized with VAMP8 decreased during infection, while that of CRVs positive for VAMP3 or VAMP7 was stable and also, they reported that VAMP7 was required in the biogenesis of these CRVs[38]. Moreover, VAMP3 was documented associated with *Mycobacterium tuberculosis*-containing vacuoles while being degraded over the course of infection[31]. Finally to date, whereas *Brucella melitens* VAMP3 expression was shown increased during infection of macrophages, the silencing of this VAMP did not affect the infection level [39]. In this study, we showed that *Y. pseudotuberculosis* replicate inside an LC3-positive compartment whose morphology depends on VAMP3. Indeed, in epithelial cells the VAMP3 knockdown increases the proportion of double-membrane YCVs (**Fig. 7D and 7E**). Conversely, most YCVs in BMDMs have two or more membranes but VAMP3 over-expression is associated with an increase in the proportion of single-membrane YCVs (**Fig. 7F and 7G**). Taken as a whole, these results suggest that VAMP3 regulates the LC3-positive vacuole pathways followed by bacteria. It is probable that VAMP3 is not the only factor involved in this process. Interestingly, TMEM59 is known to interact with ATG16L1, activate LC3 and mediate autophagy during *Staphylococcocus aureus* infection of HeLa cells; the bacteria were present in single-membrane, LC3-positive structures[40]. Our findings have widespread significance because we have shown that VAMP3 also participates in infection-independent autophagy. Upon rapamycin-mediated activation of autophagy, VAMP3 overexpression was associated with a decrease number of double-membrane autophagosomes. Hence, we suggest that VAMP3 is part of a molecular checkpoint for the commitment of *Y. pseudotuberculosis* towards either single- or double-membrane, LC3-positive vacuoles during invasion. It remains to be seen whether other SNAREs are involved. Although characterizing the membrane mechanism in detail will require further work, we have clearly identified the seminal molecular basis of this process, with VAMP3 involved in the selection of single- or multi-membrane, LC3-positive compartments. We also

showed that VAMP7 preceded LC3 recruitment to YCVs in both epithelial cells and BMDMs and that VAMP7 knockdown interfered with LC3 recruitment. Our data on VAMP7 knockdown indicate that this protein is involved in autophagy (as previously suggested[25]) but we highlighted for the first time that VAMP7 is also involved in LC3 recruitment during LC3-associated phagocytosis.

In conclusion, our study emphasizes the importance of characterizing the morphology of LC3-positive vacuoles when analyzing pathogen-dependent LC3 compartments and thus the related membrane trafficking regulation. Our present data revealed the molecular basis of the LC3 pathway selection process. This study paves the way for a comprehensive analysis (using a high-content screening approach, for example) of the SNAREs involved in *Yersinia* infection and the membrane traffic effectors that may govern the fate of intracellular pathogens.

Supporting information

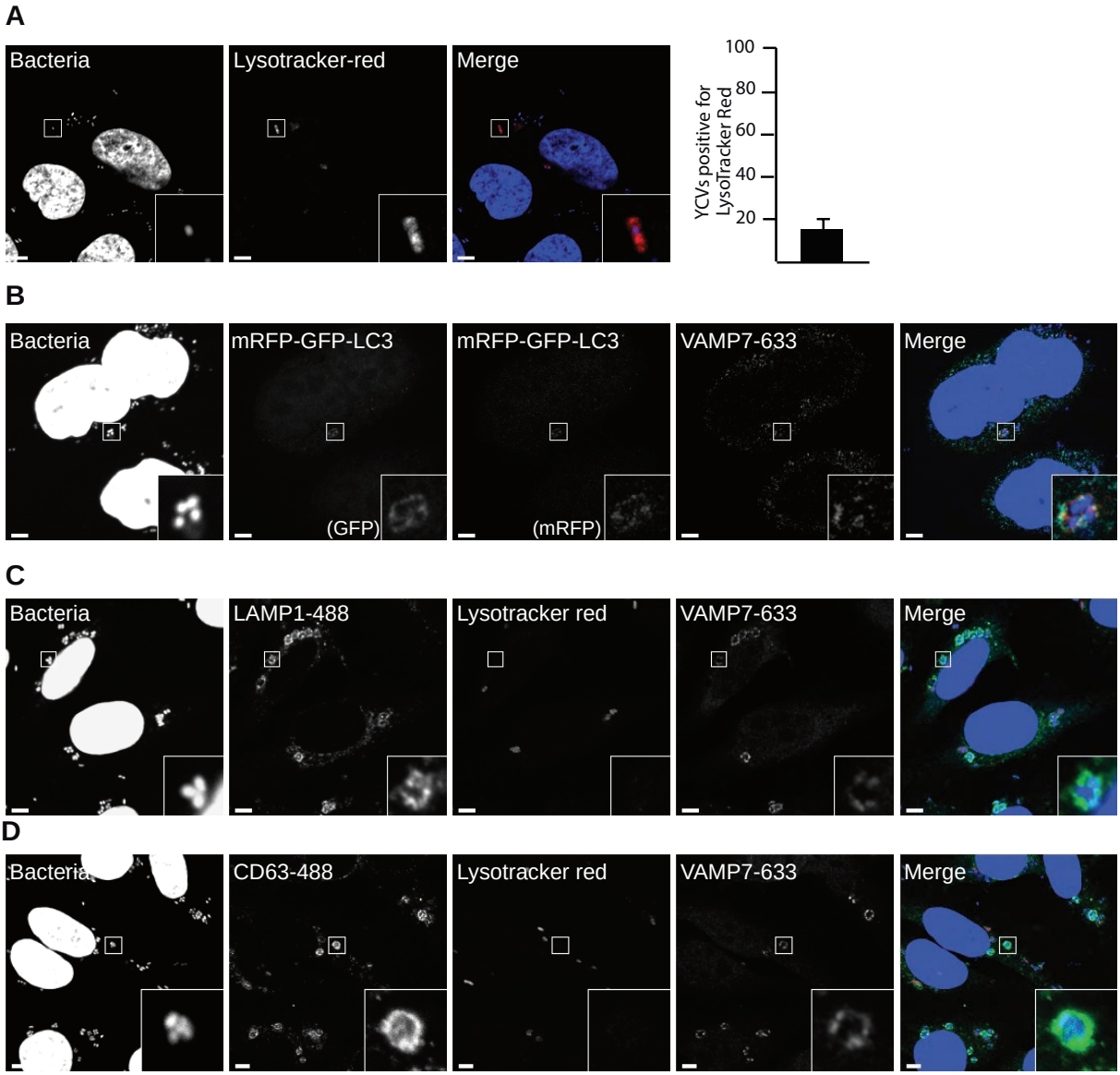


Figure S1. A low proportion of YCVs can reach lysosomes. (A) HeLa cells were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 4 h, treated with LysoTracker® Red for 4 h and processed for CLSM. Bacteria were visualized after staining with DAPI. Scale bars: 5 µM. Magnification: x5. The percentage of YCVs positive for LysoTracker® Red is indicated. In each experiment, at least 20 cells were quantified in a double-blind analysis. Values are quoted as the mean ± SEM from at least three independent experiments. **(B)** HeLa cells stably expressing mRFP-GFP-LC3 were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 4 h and processed for CLSM. Bacteria were visualized after staining with DAPI. VAMP7 proteins were detected with anti-VAMP7 rabbit antibodies and labeled with secondary antibodies coupled to Alexafluor®-633. The insert shows bacteria inside mRFP-GFP-LC3- and VAMP7-positive vacuoles. Scale bars: 5 µM. Magnification: x4. **(C)** HeLa cells were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 4 h, treated with LysoTracker® Red for 2 h and then processed for CLSM. Bacteria were visualized after staining with DAPI. LAMP1 was detected with anti-LAMP1 mouse antibodies and labeled with secondary antibodies coupled to Alexafluor®488. VAMP7 proteins were detected with anti-VAMP7 rabbit antibodies and labeled with secondary antibodies coupled to Alexafluor®-633. The insert shows bacteria inside vacuoles that are positive for LAMP1 and VAMP7 but negative for LysoTracker® Red. Scale bars: 5 µM. Magnification x4. **(D)** HeLa cells were infected with *Y. pseudotuberculosis* for 4 h, treated with LysoTracker® Red for 2 h and then processed for CLSM. Bacteria were visualized after staining with DAPI. CD63 was detected with anti-CD63 mouse antibodies and labeled with secondary antibodies coupled to Alexafluor®488. VAMP7 proteins were detected with anti-VAMP7 rabbit antibodies and labeled with secondary antibodies coupled to Alexafluor®633 antibodies. The insert shows bacteria inside vacuoles that are positive for CD63- and VAMP7 but negative for LysoTracker® Red. Scale bars: 5 µM. Magnification x5.

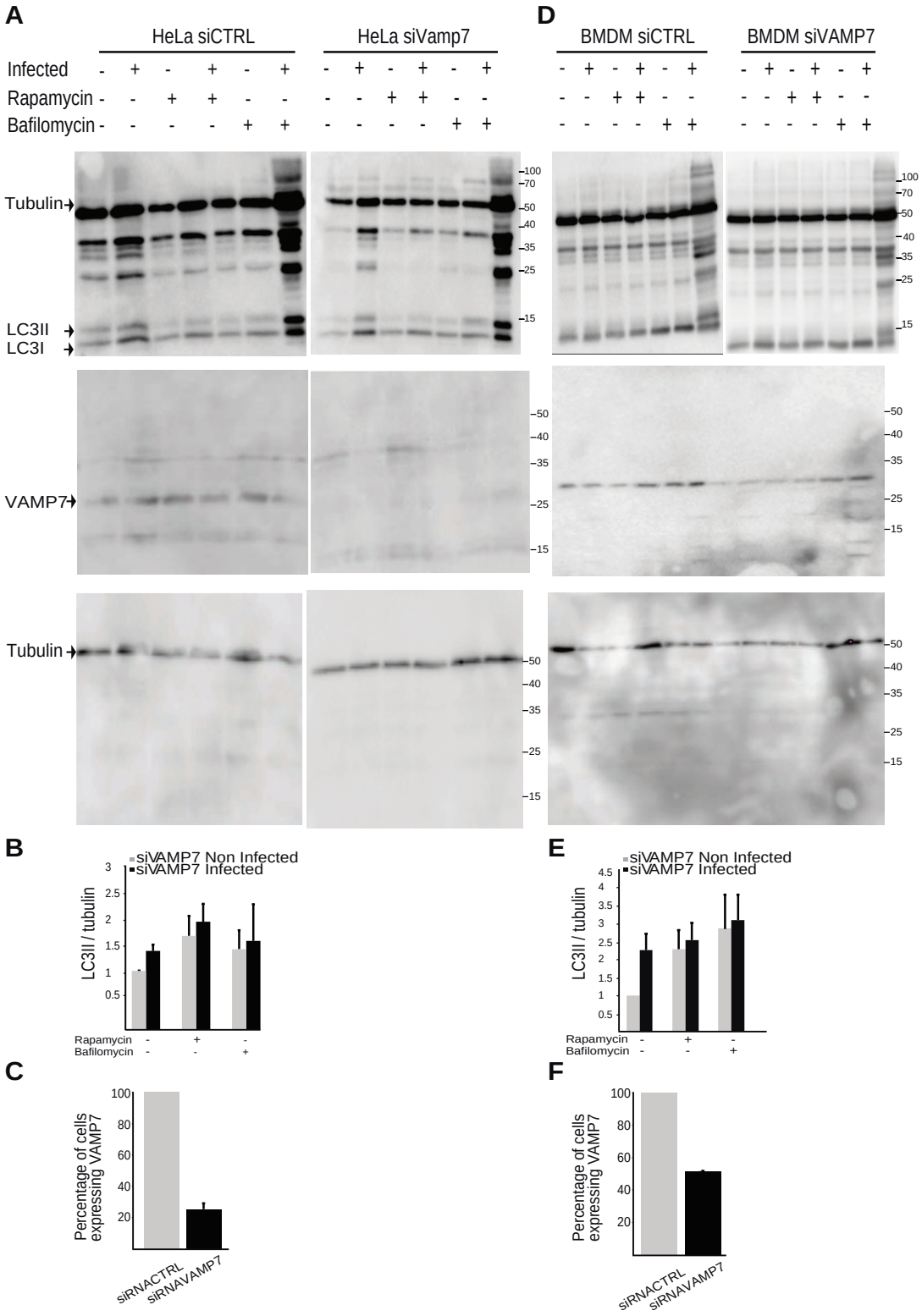


Figure S2. VAMP7 is involved in the recruitment of LC3 to YCVs. (A) The complete dataset for the Western blots shown in Figure 5. **(B)** The LC3 II/tubulin ratio for HeLa cells treated with VAMP7 siRNA (siVAMP7), as a function of cell treatment and infection. Data are quoted as the mean of at least three independent experiments and error bars correspond to the SEM. **(C)** Percentage of HeLa cells expressing VAMP7 proteins after treatment with control or VAMP7 siRNA. Data are quoted as the mean of at least two independent experiments. **(D)** The complete dataset for the Western blots shown in Figure 6. **(E)** The LC3 II/tubulin ratio for BMDMs treated with VAMP7 siRNA (siVAMP7), as a function of cell treatment or infection. Data are quoted as the mean of at least three independent experiments. **(F)** The percentage of BMDMs expressing VAMP7 proteins after treatment with control or VAMP7 siRNA. Data are quoted as the mean of at least two independent experiments.

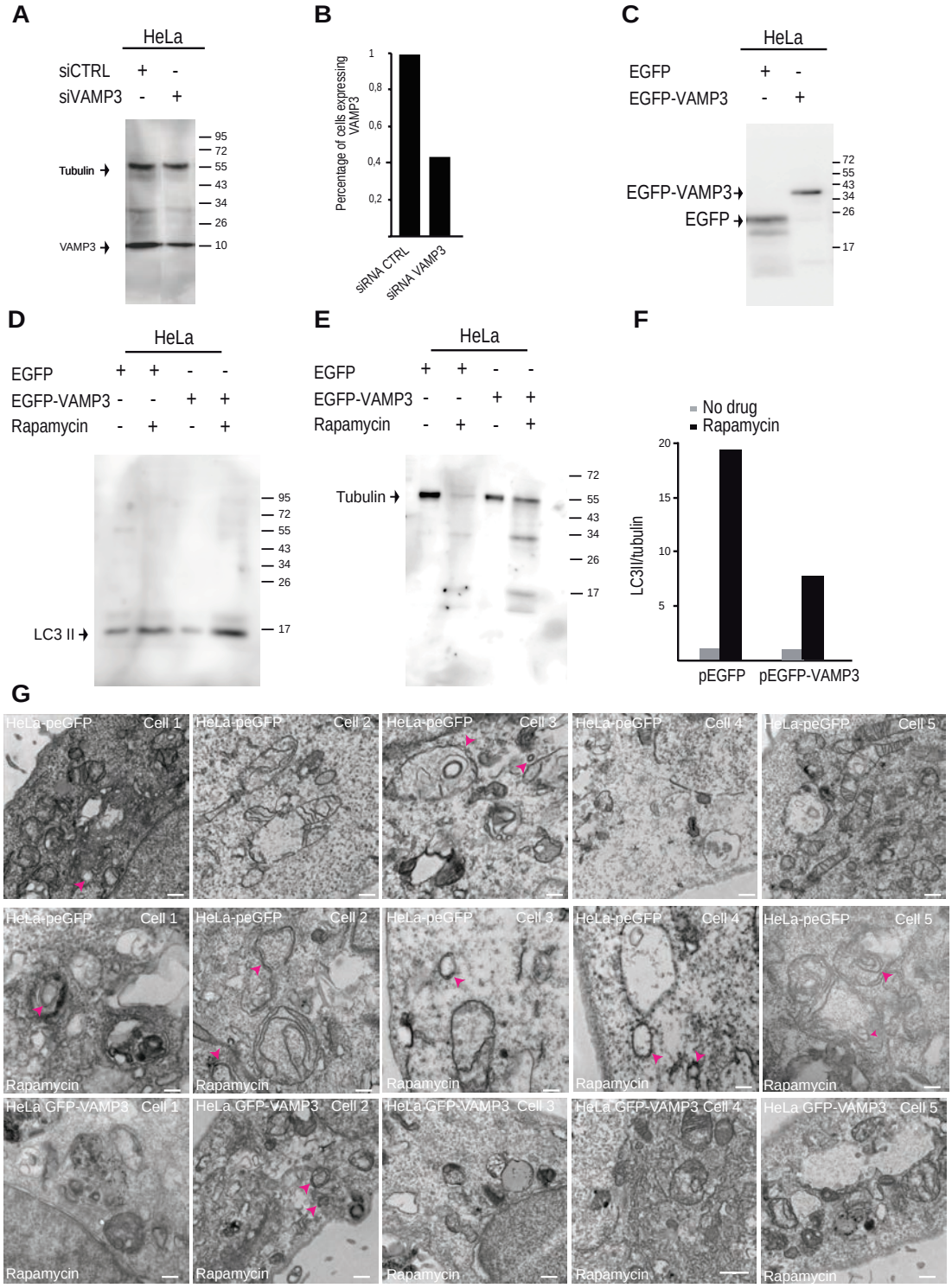


Figure S3. VAMP3 influences the morphology of autophagosomes. (A) HeLa cells were transfected with control (siCTRL) or VAMP3 siRNA (siVAMP3), sorted and treated again with siCTRL or siVAMP3, and analyzed for VAMP3 silencing by immunoblotting. Protein loading was checked against the alpha-tubulin content **(panel B). (C)** HeLa cells transfected with pEGFP or pEGFP-VAMP3 were analyzed for protein expression by immunoblotting. **(D)** HeLa cells transfected with pEGFP or pEGFP-VAMP3 were analyzed for LC3 by immunoblotting. The cells were treated with rapamycin as indicated and DMSO was used as a solvent control. Protein loading was checked against the alpha-tubulin content **(E). (F)** The LC3 II/tubulin ratio for HeLa transiently expressing EGFP or EGFP-VAMP3, as a function of cell treatment. **(G)** A panel of five TEM images for EGFP-expressing cells treated (or not) with rapamycin and for EGFP-VAMP3-expressing cells treated with rapamycin (corresponding to the histogram in Figure 7I). The top panels show the profiles of HeLa cells transiently expressing EGFP; few vacuoles with double membranes were observed. The middle panels show HeLa cells transfected with EGFP and treated with rapamycin; a greater proportion of vacuoles with a double membrane were observed (pink arrows). The bottom panels display double-membrane

vacuoles in HeLa cells overexpressing VAMP3 and treated with rapamycin. The pink arrows show the few observed vacuoles with a double membrane.

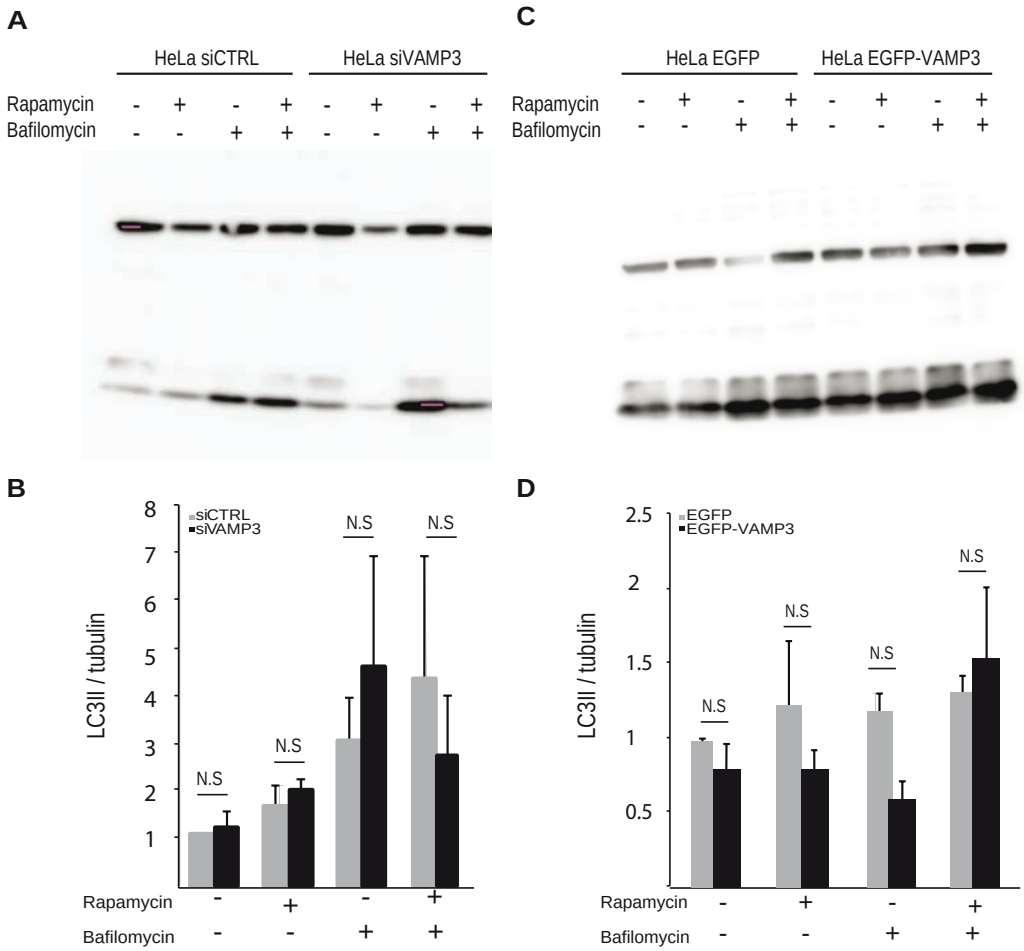


Figure S4. VAMP3 does not influence the level of autophagy. (A) HeLa cells were transfected with control siRNA (siCTRL) or siRNA against VAMP3 (siVAMP3) and then analyzed for LC3 by immunoblotting. The cells were treated with rapamycin and/or bafilomycin A1. The LC3 II/tubulin ratio as a function of the cell treatment is indicated in panel **(B).** Data are quoted as the mean of at least three independent experiments. **(C)** HeLa cells were transfected with pEGFP or pEGFP-VAMP3 and then analyzed for LC3 by immunoblotting. The cells were treated with rapamycin and/or bafilomycin A1. The LC3 II/tubulin ratio as a function of the cell treatment is indicated in panel **(D).** Data are quoted as the mean of at least two independent experiments.

Movie S1. VAMP3 and VAMP7 recruitment to YCVs

HeLa cells transiently expressing EGFP-VAMP3 (green) and mRFP-VAMP7 (red) were infected with *Y. pseudotuberculosis*, stained with DAPI (DNA, blue) and directly observed by video microscopy for 3 h 33 mn. The movie shows the migration of EGFP-VAMP3 and mRFP-VAMP7 proteins on a single YCV. Acquisition times are indicated in the bottom left corner (hr:mn). Scale bar, 5 µm.

Movie S2. VAMP7 and LC3 recruitment to YCVs

HeLa transiently expressing GFP-VAMP7 (green) and mRFP-LC3 (red) were infected with *Y. pseudotuberculosis*, stained with DAPI and then observed by video microscopy for 1h. The arrows indicate the migration of GFP-VAMP7 and mRFP-LC3 proteins on a single YCV. Acquisition times are indicated in the lower left corner (hr:mn). Scale bar: 5 µm.

Materials and Methods

Cell culture

HeLa cells were cultured in minimum essential medium (Gibco) (supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and 100 U/ml penicillin/streptomycin) in 5% CO_2 at 37°C.

HeLa cells having been stably transfected with mRFP-GFP-LC3 (a kind gift from D. Rubinzstein, University of Cambridge, UK) were cultured in L-glutamine Roswell Park Memorial Institute medium (Gibco) (supplemented with 10% FBS, 2mM L-glutamine and 100 U/ml penicillin/streptomycin) in 5% CO_2 at 37°C.

Mouse BMDMs were derived in a 6-day culture in non-tissue-culture-treated dishes (diameter: 100 mm) containing Dulbecco's Modified Eagle's Medium L-Glutamax (Gibco) supplemented with 30% L-Cell conditioned medium (as a source of CSF-1), 10% FBS and 100 U/ml penicillin/streptomycin.

Reagents

Antibodies included rabbit polyclonal anti-LC3 (MBL international PM036), mouse monoclonal anti-LAMP1 (Santa-Cruz, sc-18821, clone H5G11), mouse monoclonal anti-CD63 (BD, 556019), plus LysoTracker® Red DND-99 (Invitrogen, L7528) and goat anti-rabbit Alexafluor® 488, 555- or 633-conjugated antibody (Invitrogen) for immunofluorescence, rabbit polyclonal anti-LC3 antibody (Novus biological NB100-2220) for Western blots, rabbit polyclonal anti-VAMP7 antibody (TG50), rabbit polyclonal anti-VAMP3 (TG1). mouse monoclonal anti-tubulin antibody (Sigma) and mouse or rabbit anti-HRP antibody (Jackson). Predesigned small, interfering RNAs (siRNAs) were ordered from Thermo Scientific Dharmacon. The siRNA IDs were as follows: VAMP7 siGENOME SMARTpool Human SYBL1 (M-020864-00), VAMP3 siGENOME SMARTpool ONE-TARGETplus Human (L 011934-00) and siGLO Green (D-001630-01-05).

Bacterial strain

Yersinia pseudotuberculosis strain 2777 wild type was grown at 28°C in Luria-Bertani broth or on Luria-Bertani agar plates.

Plasmids

Plasmid pEGFP-LC3 containing rat LC3 cDNA inserted into a GFP fusion expression vector was a kind gift from T. Yoshimori (Osaka University, Japan). Plasmid pmRFP-LC3 was derived from pEGFP-LC3, with an mRFP sequence instead of the GFP sequence. Plasmids pEGFP-VAMP7 and pmRFP-VAMP7 (containing the human VAMP7 gene) have been described elsewhere[41]. Plasmid pEGFP-VAMP3 is derived from plasmid pEGF-C3 and contains the human VAMP3 gene[42].

Cell transfections

HeLa cells were transiently transfected with plasmids using Fugen HD (Promega), according to the manufacturer's instructions. For VAMP7 siRNA treatment, cells were transfected with Lipofectamine RNAi max (Invitrogen), according to manufacturer's recommendations. VAMP3 siRNAs were co-transfected with siGLO-GREEN siRNAs, again according to manufacturer's recommendations. Upon siGLO-GREEN expression, transfected cells emit a green fluorescence signal that enables fluorescence-activated cell sorting (FACS). The sorted cells were cultured in 6-well plates. After plating, the cells were again treated with VAMP3 siRNA and then incubated for a further 48 h at 37°C in 5% CO_2.

Murine BMDMs were transiently transfected with plasmids or siRNA using the Amaxa™ Mouse Macrophage Nucleofector™ kit (Lonza), according to the manufacturer's instructions.

Modulation of autophagy

To inhibit LC3-II degradation, cells were treated with 100 nM bafilomycin A1 (Sigma-Aldrich) for 2 h before fixation. To induce autophagy in an mTOR-dependent manner, cells were treated with rapamycin (Sigma-Aldrich) at 20 µg for 2 h before infection or for 7 h for experiments without infection.

Cell infection assay

Cells were infected with *Yersinia* at a multiplicity of infection of 10. Briefly, a suspension of exponentially grown (OD_{600} =0.6) bacteria in culture medium was centrifuged onto cells for 5 mn at 3000 rpm.

For video microscopy, bacteria were pre-labeled with DAPI (5 µg/ml, Invitrogen) for 15 mn at 28°C. Infected cells were incubated for 30 mn at 37° C in 5% CO_2 or directly observed using video microscopy. In order to kill extracellular microorganisms, the medium was removed and replaced with fresh cell culture medium containing 10 µg/ml gentamicin.

Bacterial intracellular replication assay

In order to determine the number of intracellular bacteria, HeLa cells were washed with phosphate-buffer saline (PBS) and lysed with 0.1% Triton X-100 (Sigma-Aldrich). The lysates were sonicated to disperse bacteria and then plated onto LB agar plates for counting viable *Yersinia* (quantified as colony forming units, CFUs).

Western blotting

Cells were harvested, rinsed with PBS, and lysed on ice for 10 mn in Laemmli buffer. The cell lysates were centrifuged at 13,000 rpm for 10 mn at 4°C and resolved by SDS-PAGE. The proteins were then transferred to PVDF membranes. The membranes were blocked with 5% milk or 5% bovine serum albumin in PBS-0.1% Tween (depending on the antibody being used), then incubated with primary antibodies diluted in blocking solution, washed with PBS-Tween 0.1% and then incubated for 1 h at room temperature with HRP-conjugated secondary antibodies. Immune complexes were revealed using SuperSignal West Pico chemiluminescence substrate (Thermo Scientific). Band density was read on a LAS-3000 system (Fuji) and quantified using ImageGauge® software (Fuji).

Immunofluorescence microscopy

Cells were cultured on coverslips, fixed with 4% paraformaldehyde in PBS for 20 mn, and permeabilized with 0.1% Triton X-100 in PBS for 5 mn. The coverslips were incubated with primary antibodies at room temperature, washed three times with PBS, and incubated with secondary antibodies. Samples were stained with DAPI, mounted with Mowiol® and observed with a LSM710 confocal microscope (Zeiss) mounted on an AxioObserver Z1 (Zeiss). Excitation was performed with an Argon laser (458-488-514 nm) or a laser diode (561 nm). The spectral detection range was adjusted for each fluorophore by using a Quasar detection unit. Images were acquired with ZEN software (Zeiss) and assembled using ImageJ software. Super-resolution images were acquired on a ElyraPS1 microscope system (Zeiss) using a 100x oil-immersion lens (NA 1.46). This SIM system can achieve a resolution of 100 nm along the x-y axis and 300 nm along the z-axis. Laser lines at 488 and 561 nm were used for excitation. Structured illumination microscopy (SIM) images (15 images with five different phases for three different angular orientations of illumination for each SIM image) were acquired with an EMCCD camera (512x512 pixels) and processed with Zen (Zeiss) software.

Live cell imaging

Cell marker recruitment was tracked with time-lapse, high-speed video microscopy. Epifluorescence and total internal reflection fluorescence (TIRF) were recorded using an inverted AxioObserver Z1 microscope fitted with a Zeiss Axiocam® MRm camera and operated by Axiovision® software. Images were acquired with a Plan-Apo 100x/1.46 oil immersion objective. For video microscopy, the fluorophore excitation system was composed of a Colibri system (Zeiss) with 365, 470, 555 and 590 nm LEDs. For TIRF, the fluorophore excitation system featured a laser module with a multiline (458/488/514 nm, 100mW) argon laser (Lasos Lasertechnik GmbH) and a laser TIRF slider with a monomode fiber (561 nm, 10 mV) diode-

pumped with a lambda 10-3 optical filter changer with SmartShutter™ (Sutter Instrument Company). Images were further analyzed using ImageJ software and converted into .avi files.

Electron microscopy and correlative light-electron microscopy

After infection, cells were fixed at 4°C overnight with 1% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate pH 6.8. Cells were post-fixed with 1% osmium tetroxide and 1.5% potassium ferricyanide for 1 h and then with 1% uranyl acetate for 45 mn (both in distilled water at room temperature and in the dark). After washing, cells were dehydrated in graded ethanol solutions, scraped off and then infiltrated with propylene oxide. Lastly, cells were infiltrated with epoxy resin and cured for 24 h at 60°C. Sections (thickness: 70-80 nm) on formvar-coated grids were observed with a Hitachi H7500 transmission electron microscope. Images were acquired with a 1 Mpixel digital camera (AMT).

For correlative light-electron microscopy (CLEM), mRFP-GFP-LC3-expressing HeLa cells were grown on glass coverslips bearing an alphanumeric photo-etched coordinate system (EMS). After infection, cells were fixed with 10% formalin plus 0.05% glutaraldehyde for 20 mn at room temperature and then incubated with 0.1% sodium borohydride in PBS for 15 mn. The coverslips were mounted on a concavity slide for observation under a confocal microscope. Cells of interest were located according to the alphanumerical coordinate system and imaged. The cells were again fixed with 1% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate pH 6.8 at 4°C overnight, and then processed for electron microscopy as described above (except that cells were flat-embedded and resin was cured on the coverslip). After removal of the coverslip, cells of interest were relocated and prepared for sectioning parallel to the resin surface. Serial sections (thickness: 70-80 nm) were laid down on carbon/formvar-coated slot grids.

Statistics

Unless otherwise stated, all data are reported as the mean ± SEM of at least three independent assays. A two-tailed, unpaired Student's t-test was used for intergroup comparisons. A *p*-value of less than 0.05 was considered to be statistically significant and is denoted hereafter by **; $p<0.1$ is denoted by *

Acknowledgments

We thank J. Warein, L. Brunet and C. Slomianny for expert technical assistance and advice, T. Proikas-Cezanne for providing plasmids and advice M. Simonet and P. Codogno for carefully reading the manuscript. The work was funded by grants from the CNRS and Région Nord Pas-de-Calais (L-AL), FEDER 12001407 (D-AL) and ANR 09-MIEN-020-01, ANR-10-EQPX-04-01, FEDER

References

1. Deretic, V. & B. Levine. Autophagy, immunity, and microbial adaptations. Cell Host and Microbe 2009; 5: 527–549
2. Deretic, V. Autophagy in immunity and cell-autonomous defense against intracellular microbes. Immunol Rev 2011; 240: 92–104
3. Johansen, T. & T. Lamark. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. Autophagy 2011; 7: 279–296
4. Faure, M. & F. Lafont. Pathogen-induced autophagy signaling in innate immunity. J Innate Immun 2013; 5: 456–470
5. Yang, Z. & D. J. Klionsky. Eaten alive: a history of macroautophagy. Nature Cell Biology 2010; 12: 814–822
6. Mizushima, N. Autophagy: process and function. Genes & Development 2007; 21: 2861–2873
7. Burman, C. & N. T. Ktistakis. Autophagosome formation in mammalian cells. Semin Immunopathol 2010; 32: 397–413
8. Mizushima, N. T. Yoshimori & Y. Ohsumi. The role of Atg proteins in autophagosome formation. Annu Rev Cell Dev Biol 2011; 27: 107–132
9. Klionsky, D. J. F. C. Abdalla H. Abeliovich R. T. Abraham A. Acevedo-Arozena K. Adeli L. Agholme M. Agnello P. Agostinis J. A. Aguirre-Ghiso et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Autophagy 2012; 8: 445–544
10. Lai, S.-C. & R. J. Devenish. LC3-Associated Phagocytosis (LAP): Connections with Host Autophagy. Cells 2012; 1: 396–408
11. Sanjuan, M. A. S. Milasta & D. R. Green. Toll-like receptor signaling in the lysosomal pathways. Immunol Rev 2009; 227: 203–220
12. Cemma, M. & J. H. Brumell. Interactions of pathogenic bacteria with autophagy systems. Curr Biol 2012; 22: R540–5
13. Sanjuan, M. A. C. P. Dillon S. W. G. Tait S. Moshiach F. Dorsey S. Connell M. Komatsu K. Tanaka J. L. Cleveland S. Withoff et al. Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. Nature 2007; 450: 1253–1257
14. Huang, J. V. Canadien G. Y. Lam B. E. Steinberg M. C. Dinauer M. A. O. Magalhaes M. Glogauer S. Grinstein & J. H. Brumell. Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. Proceedings of the National Academy of Sciences 2009; 106: 6226–6231
15. Gong, L. M. Cullinane P. Treerat G. Ramm M. Prescott B. Adler J. D. Boyce R. J. Devenish & D. Chakravortty. The Burkholderia pseudomallei Type III Secretion System and BopA Are Required for Evasion of LC3-Associated Phagocytosis. PLoS ONE 2011; 6: e17852
16. Birmingham, C. L. V. Canadien E. Gouin E. B. Troy T. Yoshimori P. Cossart D. E. Higgins & J.

H. Brumell. Listeria monocytogenes evades killing by autophagy during colonization of host cells. Autophagy 2007; 3: 442–451

17. Hong, W. SNAREs and traffic. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research 2005; 1744: 120–144
18. Jahn, R. & R. H. Scheller. SNAREs--engines for membrane fusion. Nat Rev Mol Cell Biol 2006; 7: 631–643
19. Fasshauer, D. R. B. Sutton A. T. Brunger & R. Jahn. Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 1998; 95: 15781–15786
20. Zylbersztejn, K. & T. Galli. Vesicular traffic in cell navigation. FEBS J. 2011; 278: 4497–4505
21. Darsow, T. S. E. Rieder & S. D. Emr. A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole. The Journal of Cell Biology 1997; 138: 517–529
22. Sato, T. K. T. Darsow & S. D. Emr. Vam7p, a SNAP-25-like molecule, and Vam3p, a syntaxin homolog, function together in yeast vacuolar protein trafficking. Mol. Cell. Biol. 1998; 18: 5308–5319
23. Nair, U. A. Jotwani J. Geng N. Gammoh D. Richerson W.-L. Yen J. Griffith S. Nag K. Wang T. Moss et al. SNARE Proteins Are Required for Macroautophagy. Cell 2011; 146: 290–302
24. Fader, C. M. D. G. Sánchez M. B. Mestre & M. I. Colombo. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. BBA - Molecular Cell Research 2009; 1793: 1901–1916
25. Moreau, K. B. Ravikumar M. Renna C. Puri & D. C. Rubinsztein. Autophagosome Precursor Maturation Requires Homotypic Fusion. Cell 2011; 146: 303–317
26. Furuta, N. N. Fujita T. Noda T. Yoshimori & A. Amano. Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes. Molecular Biology of the Cell 2010; 21: 1001–1010
27. Moreau, K. M. Renna & D. C. Rubinsztein. Connections between SNAREs and autophagy. Trends in Biochemical Sciences 2013;
28. Itakura, E. C. Kishi-Itakura & N. Mizushima. The Hairpin-type Tail-Anchored SNARE Syntaxin 17 Targets to Autophagosomes for Fusion with Endosomes/Lysosomes. Cell 2012; 151: 1256–1269
29. Itakura, E. & N. Mizushima. Syntaxin 17: The autophagosomal SNARE. Autophagy 2013; 9:
30. Delevoye, C. M. Nilges P. Dehoux F. Paumet S. Perrinet A. Dautry-Varsat A. Subtil & R. H.

Valdivia. SNARE Protein Mimicry by an Intracellular Bacterium. PLoS Pathog 2008; 4: e1000022

31. Fratti, R. A. J. Chua & V. Deretic. Cellubrevin alterations and Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest. J Biol Chem 2002; 277: 17320–17326
32. Mashima, H. J. Suzuki T. Hirayama Y. Yoshikumi H. Ohno H. Ohnishi H. Yasuda T. Fujita & M. Omata. Involvement of vesicle-associated membrane protein 7 in human gastric epithelial cell vacuolation induced by Helicobacter pylori-produced VacA. INFECTION AND IMMUNITY, 2008; 76: 2296–2303
33. Moreau, K. S. Lacas-Gervais N. Fujita F. Sebbane T. Yoshimori M. Simonet & F. Lafont. Autophagosomes can support Yersinia pseudotuberculosis replication in macrophages. Cellular Microbiology 2010; 12: 1108–1123
34. Ewanowich, C. A. & M. S. Peppler. Phorbol myristate acetate inhibits HeLa 229 invasion by Bordetella pertussis and other invasive bacterial pathogens. INFECTION AND IMMUNITY, 1990; 58: 3187–3193
35. Kimura, S. T. Noda1 & T. Yoshimori. Dissection of the Autophagosome Maturation Process by a Novel Reporter Protein, Tandem Fluorescent-Tagged LC3. Autophagy 2007; 3: 452–460
36. Lam, G. Y. M. Cemma A. M. Muise D. E. Higgins & J. H. Brumell. Host and bacterial factors that regulate LC3 recruitment to Listeria monocytogenes during the early stages of macrophage infection. Autophagy 2013; 9:
37. Nair, U. & D. J. Klionsky. Autophagosome biogenesis requires SNAREs. Autophagy 2011; 7: 1570–1572
38. Campoy, E. M. M. E. Mansilla & M. I. Colombo. Endocytic SNAREs are involved in optimal Coxiella burnetii vacuole development. Cellular Microbiology 2013; 15: 922–941
39. Castañeda-Ramírez, A. J. L. Puente A. González-Noriega & A. Verdugo-Rodríguez. Silencing of VAMP3 expression does not affect Brucella melitensis infection in mouse macrophages. virulence 2012; 3: 434–439
40. Boada-Romero, E. M. Letek A. Fleischer K. Pallauf C. Ramón-Barros & F. X. Pimentel-Muiños. TMEM59 defines a novel ATG16L1-binding motif that promotes local activation of LC3. EMBO J 2013; 32: 566–582
41. Martinez-Arca, S. P. Alberts A. Zahraoui D. Louvard & T. Galli. Role of tetanus neurotoxin insensitive vesicle-associated membrane protein (TI-VAMP) in vesicular transport mediating neurite outgrowth. The Journal of Cell Biology 2000; 149: 889–900
42. Martinez-Arca, S. V. Proux-Gillardeaux P. Alberts D. Louvard & T. Galli. Ectopic expression of syntaxin 1 in the ER redirects TI-VAMP- and cellubrevin-containing vesicles. Journal of Cell Science 2003; 116: 2805–2816

IV. Résultats Complémentaires :

Afin de compléter notre analyse de l'implication de VAMP3 dans les phases très précoces de l'infection par *Y. pseudotuberculosis*, nous avons utilisé la microscopie à force atomique (AFM). L'AFM est une technique de microscopie qui permet de mesurer la topographie de la surface d'un échantillon, les forces d'adhésion, d'élasticité et d'interactions entre deux échantillons dont l'un est fixé à la pointe d'un levier. La détection des mouvements d'un faisceau laser focalisé sur la pointe du levier permet de suivre sa déflection au cours du balayage de l'échantillon. La résolution de l'appareil est de l'ordre de quelques dizaines de nanomètres sur des cellules vivantes en milieu liquide pour des mesures en mode contact, utilisé pour des courbes force-distance. Dans cette étude, l'AFM a été utilisée comme un système de nano-guidage permettant de mettre en contact une cellule, transfectée transitoirement avec une molécule étiquetée avec une sonde fluorescente, et une bactérie, préalablement marquée au DAPI et fixée de manière non-covalente sur la pointe d'un levier AFM (Fig. 30). Ce système permet de synchroniser le contact et de sélectionner les cellules exprimant de façon transitoire les molécules fluorescentes à un niveau compatible avec une bonne qualité des mesures.

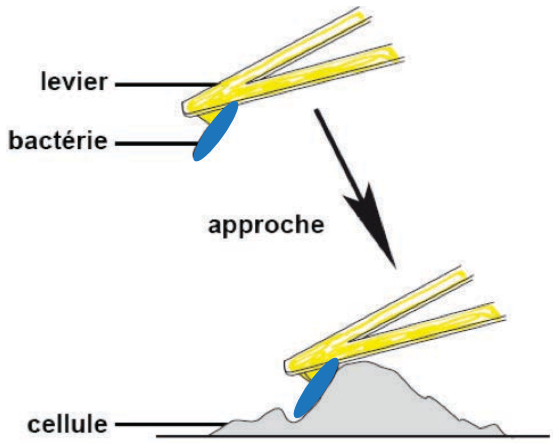


Figure 30 : Schéma de la mise en contact d'une bactérie et d'une cellule à l'aide d'un levier AFM

Le contact bactérie/cellule semble être suffisant pour induire le recrutement de VAMP3 à la membrane plasmique.

Après marquage au DAPI, la bactérie vivante est fixée sur un levier AFM puis amenée à la surface d'une cellule HeLa unique exprimant transitoirement la protéine GFP-VAMP3. Nous avons pu mesurer la mobilisation de la protéine GFP-VAMP3 vers la membrane plasmique au niveau du site d'interaction bactérie/cellule après 3 min de contact (Fig. 31 Flèche blanche, et Film 3). Au cours de l'acquisition, il a été observé que les vacuoles GFP-VAMP3 migrent vers le site de contact puis commencent à entourer la bactérie 33 min après l'adhésion bactérienne (Fig. 31, Film 3). Ce résultat suggère que le contact bactérie/cellule semble suffisant pour induire le recrutement de la protéine VAMP3 au niveau de la membrane plasmique.

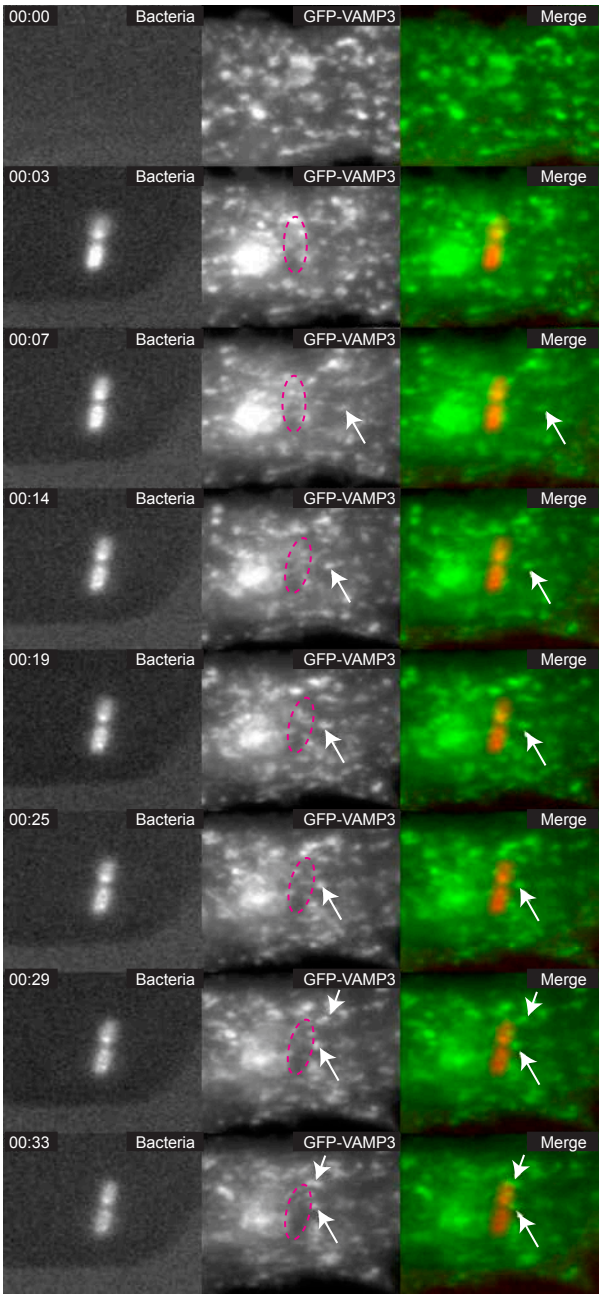


Figure 31 : Le contact bactérie/cellule permet le recrutement de VAMP3 au niveau du site de contact. *Y. pseudotuberculosis,* marquée à l'aide du DAPI, est fixée sur un levier AFM puis dirigée vers une cellule HeLa exprimant transitoirement la protéine GFP-VAMP3. Les flèches blanches indiquent les vacuoles GFP-VAMP3 migrant vers la bactérie. Voir Film 3.

V. Discussion

Par cette étude, nous montrons que *Y. pseudotuberculosis* emprunte différentes voies en fonction du type cellulaire. Dans les deux lignées cellulaires, nous avons révélé l'implication de deux SNARE, VAMP3 et VAMP7, dans le trafic intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis*. VAMP7 joue un rôle dans le recrutement de LC3 au niveau de YCV dans les macrophages et les cellules épithéliales. VAMP3 et VAMP7 sont séquentiellement recrutées au niveau de YCV, et VAMP3 est spécifiquement impliquée dans la morphologie de la vacuole positive pour LC3.

Il est connu que *Y. pseudotuberculosis* peut se répliquer dans les macrophages au sein d'un autophagosome bloqué dans sa maturation (Moreau et al., 2010). L'analyse du trafic intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis* a révélé que la bactérie n'a pas l'aptitude de se répliquer au sein des cellules épithéliales adhérentes canines (MDCK). Cependant, nous avons mis en évidence leur niche de réplication dans les cellules épithéliales adhérentes humaines (HeLa). L'utilisation de la microscopie corrélative photonique-électronique nous a permis de caractériser la vacuole de *Y. pseudotuberculosis* qui est associée avec la protéine LC3 mais, de manière surprenante, ne présente qu'une seule membrane. Les SNARE VAMP3 et VAMP7 sont séquentiellement recrutées autour des YCV. En plus d'avoir confirmé le rôle de VAMP7 dans l'autophagie, nous avons décrit pour la première fois son implication dans le recrutement de LC3 dans la voie LAP au cours de l'infection par *Y. pseudotuberculosis.* La protéine VAMP3 est recrutée au niveau des YCV dans les phases précoces de l'infection et est majoritairement associée avec des vacuoles à simple membrane. Nous proposons donc l'hypothèse que VAMP3 est un constituant moléculaire du check-point dirigeant la bactérie vers les voies à simple ou double membrane positives pour LC3. Les protéines SNARE sont constituées de trois domaines dont le domaine Longin en N-terminal, décrit comme participant au contrôle de leur localisation et à la fonction de VAMP7 (Martinez-Arca et al., 2011). Il serait intéressant d'investiguer le rôle du domaine Longin de VAMP3 et de VAMP7 dans le contrôle de leur adressage vers les YCV et dans le recrutement de LC3. L'identification du domaine protéique de VAMP3 et des autres acteurs impliqués dans le check-point nous donnera des clés pour mieux appréhender l'adressage préférentiel de la bactérie vers l'une des voies LC3 positives. L'implication des protéines SNARE dans le trafic intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis,* in vitro, amène à nous poser la question : quel est l'impact des SNARE VAMP7 et VAMP3 en condition *in vivo,* et est ce que des souris *know-down* pour VAMP3 ou VAMP7 vont répondre différemment à l'infection par *Y. pseudotuberculosis* ? Les premiers résultats obtenus chez des souris K.O VAMP7 ne montre pas de différence avec les souris sauvages. La bactérie a pu infecter les deux souches de souris similairement, il serait donc intéressant de tester l'infection de souris VAMP3$^{-/-}$.

Durant cette étude, nous avons utilisé des *Y. pseudotuberculosis* qui n'expriment pas leur système de sécrétion de type 3 (T3SS) et ne sécrétent pas leur effecteur YOP pour échapper à

l'internalisation. Il serait intéressant d'analyser le rôle des adhésines de *Y. pseudotuberculosis* en utilisant des mutants spécifiques. Même si la sélection de la voie intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis* au travers d'une signalisation dépendante des adhésines reste à se stade que spéculation, les résultats obtenus en AFM suggérent que le contact bactérie/ cellule serait suffisant pour conduire VAMP3 au point de contact, et encouragent à identifier les protéines bactériennes déclenchant la signalisation cellulaire.

Nous savons que les protéines ATG interviennent séquentiellement dans la formation de l'autophagosome, il serait donc intéressant d'étudier leur implication au cours de la voie LAP durant l'infection par *Y. pseudotuberculosis.* De plus, l'origine des membranes permettant la formation du phagophore étant complexe, nous nous posons donc la question de l'origine des membranes pouvant produire la YCV.

Chapitre II : Interaction de la vacuole de Y. pseudotuberculosis avec l'autophagie et la voie de l'endocytose

Article en rapport avec ce chapitre :

- *Article en préparation*

Les voies de l'endocytose et de l'autophagie agissent de concert au cours du trafic intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis* dans les cellules épithéliales.

Laure-Anne Ligeon, Yann Ciczora, Delphine-Armelle Lacorre and Frank Lafont

I. Contexte scientifique

La voie de l'endocytose des cellules eucaryotes peut être utilisée par les pathogènes afin d'être internalisés. Certains d'entre eux utilisent cette voie puis exploitent les endosomes au cours de leur trafic intracellulaire (Stein et al., 2012).

Le laboratoire a précédemment montré que *Y. pseudotuberculosis* a l'aptitude de se répliquer au sein des macrophages dans un autophagosome bloqué dans sa maturation(Moreau et al., 2010), tandis que dans les cellule épithéliales la niche de réplication est une vacuole à simple membrane positive pour LC3 et non-acidifiée. Dans cette étude, nous avons voulus caractériser les protéines de l'autophagie et des endosomes présentes au niveau de la *YCV*, associée avec LC3 et délimitée par une seule membrane. Nous avons mis en évidence que dans les phases précoces de l'infection par *Y. pseudotuberculosis*, la YCV est reconnue et ciblée par l'ubiquitine et p62, et que certaines protéines impliquées dans la formation de l'autophagosome sont recrutées au niveau de la vacuole. Parallèlement, nous avons observé que des protéines des endosomes précoces sont recrutées dans la même fenêtre de temps. Par exemple, au cours de l'infection, les protéines ATG9 et Rab5 se dissocient de YCV au profit de Rab7, marqueur des endosomes tardifs. De manière surprenante, les marqueurs du lysosome tels que LAMP1 et CD63 sont associés avec la vacuole YCV positive pour LC3 alors que celle-ci n'est pas acidifiée.

II. Résultats :

L'ubiquitine, le signal « *eat-me* » recruté au niveau de la vacuole de *Y. pseudotuberculosis*.

L'implication de l'ubiquitine dans le trafic intracellulaire de pathogènes, tels que les bactéries, est bien documentée (Boyle and Randow, 2013; Ligeon et al., 2011). L'ubiquitine se lie à la bactérie intracytosolique créant ainsi un signal « eat-me », qui permet de diriger la bactérie vers la voie de l'autophagie. Dans les cellules épithéliales, *Y. pseudotuberculosis* réside dans une vacuole à simple membrane positive pour LC3. Nous avons voulu savoir si l'ubiquitine (Ubi) joue un rôle dans le trafic de la bactérie. Pour répondre à cette question nous avons analysé en microscopie confocal la mobilisation de l'ubiquitine autour des bactéries dans des cellules HeLa infectées pendant 1 h (Fig. 32A). Nous avons ainsi observé une augmentation de l'intensité de fluorescence du signal associé à l'ubiquitine autour de *Y. pseudotuberculosis* (Fig. 32A et 32B). De plus, l'ubiquitine peut être reconnue par les protéines adaptatrices de l'autophagie, faisant le lien entre l'ubiquitine et la protéine LC3 (Jo et al., 2013). Après 30 min d'infection, les protéines NDP52 et NBR1 ne sont pas recrutées au niveau de la vacuole YCV comme le montrent les deux profils de fluorescence (Fig. 32C-32D et Fig. 32E-32F). Cependant la protéine p62 est rapidement recrutée autour de YCV (Fig. 32G-32H). Ces observations suggèrent que l'ubiquitine peut cibler et être recrutée au niveau de la vacuole de *Y. pseudotuberculosis* et pourrait jouer un rôle comme signal dans l'adressage de la

bactérie vers une voie autophagique. De plus, la présence de la protéine p62 autours de YCV suggère son implication dans la liaison de LC3 avec la vacuole bactérienne.

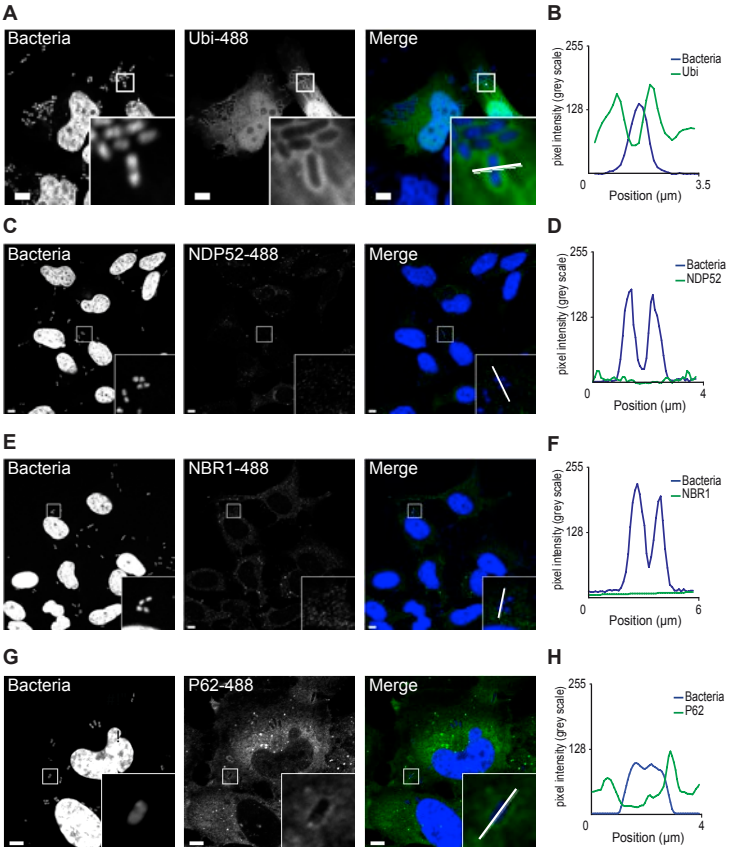


Figure 32 : Ubiquitine et p62 sont présentes au niveau de la vacuole de *Y. pseudotuberculosis* positive pour LC3. **(A)** Les cellules HeLa ont été infectées pendant 1 h par *Y. pseudotuberculosis* puis fixées à la formaline et préparées pour l'analyse en CLSM. Les bactéries sont visualisées après marquage au DAPI (Bleu). L'encart montre une bactérie contenue dans une vacuole positive pour l'ubiquitine-AlexaFluor-488nm®. Barre d'échelle 5µm et grossissement de l'insert x5. Le profil de fluorescence associé à la ligne blanche est représenté dans le graphique en **(B).** Les cellules HeLa ont été infectées pendant 30 min par *Y. pseudotuberculosis* puis fixées à la formaline et préparées pour l'analyse en CLSM. Les bactéries sont visualisées après marquage au DAPI (Bleu). L'encart montre une bactérie contenue dans une vacuole négative pour NDP52-AlexaFluor-488nm® **(C)** et NBR1-AlexaFluor-488nm® **(E)**. Barre d'échelle 5µm et grossissement de l'insert x5. Les profils de fluorescence associés à la ligne blanche sont respectivement représentés dans les graphiques en **(D) et (F). (G)** L'encart montre une bactérie contenue dans une vacuole négative pour p62-AlexaFluor-488nm. Barre d'échelle 5µm et grossissement de l'insert x5. Le profil de fluorescence associé à la ligne blanche est représenté dans le graphique en **(H).**

Les protéines intervenant dans les étapes précoces de l'autophagie sont recrutées au niveau de YCV.

L'initiation de la formation du phagophore requiert la participation du complexe ULK et de nombreuses protéines ATG telles que ATG16L1 et ATG9. Pour comprendre l'origine de la vacuole bactérienne nous nous sommes intéressés à l'implication des protéines ULK1, ATG9 et ATG16L1. L'analyse par microscopie confocale montre le recrutement de la protéine endogène ULK1 au niveau de YCV après 30 min d'infection (Fig. 33A-33B). De plus la protéine ATG9 est recrutée dans les premières phases de l'infection au niveau de la YCV puisque 49.3±2.6% des YCV sont associées avec ATG9, 30 min post infection (Fig. 33C-33E). La quantification du recrutement de la protéine ATG9 au cours de l'infection par *Y. pseudotuberculosis* montre que celle-ci va ensuite se dissocier de la YCV, avec 77.3±2.8% des YCV négatives pour ATG9 après 4 h d'infection (Fig. 33E). Enfin,

l'observation des cellules HeLa co-exprimant transitoirement les protéines ATG16L1-GFP et mRFP-LC3 montre leur codistribution au niveau des YCV (Fig. 33F – 33G). En effet, aprés 30 min d'infection, 55.2± 2.2% des YCV sont associées avec la protéine ATG16L (Fig. 33H). La présence de ces trois protéines autour de YCV suggère fortement l'implication de la machinerie autophagique dans la formation d'une vacuole bactérienne à simple membrane positive pour LC3. Une étude récente a montré que l'autophagie peut interagir avec la voie de l'endocytose dans un processus nommé autophagie par voie endosomale (Kawamura et al., 2012). Nous nous sommes donc interrogés sur la présence des marqueurs des endosomes au niveau de la vacuole bactérienne.

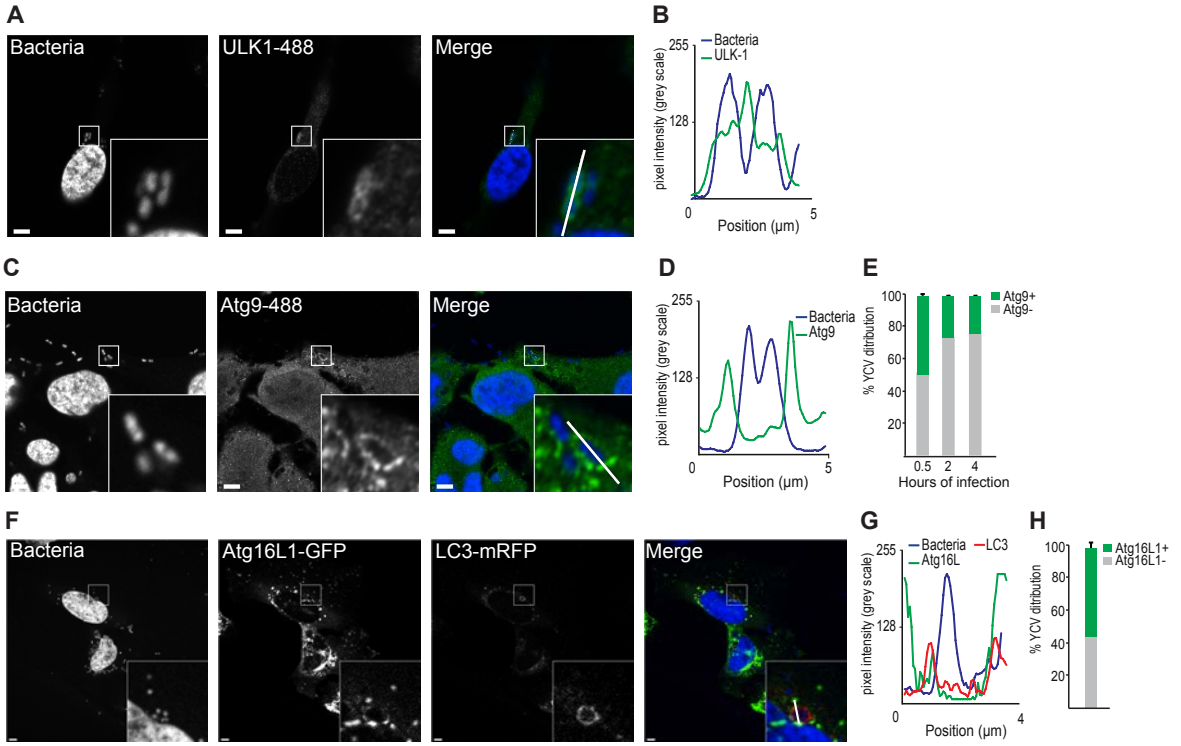


Figure 33 : Les protéines intervenant dans la formation de l'autophagosome sont recrutées au niveau de YCV. Les cellules HeLa ont été infectées pendant 30 min par *Y. pseudotuberculosis* puis fixées à la formaline et préparées pour l'analyse en CLSM. Les bactéries sont visualisées après marquage au DAPI (Bleu). **(A)** L'encart montre une bactérie contenue dans une vacuole positive pour ULK1-AlexaFluor-488nm® et le profil de fluorescence associé à la ligne blanche est représenté dans le graphique en **(B).** Les cellules HeLa transfectées transitoirement avec ATG16L1-GFP et mRFP-LC3 ont été infectées pendant 30 min par *Y. pseudotuberculosis* puis fixées à la formaline et préparées pour l'analyse en CLSM. **(C)** L'encart montre une bactérie contenue dans une vacuole positive pour ATG9-AlexaFluor-488nm® et le profil de fluorescence associé à la ligne blanche est représenté dans le graphique en **(D). (E)** Le graphique montre la distribution des YCV en fonction de la présence ou non de ATG9, après 0,5, 2 et 4 h d'infection.. L'encart montre une bactérie (Bleue) contenue dans une vacuole positive pour ATG16L1-GFP et mRFP-LC3 **(F)**. Le profil de fluorescence associé à la ligne blanche est représenté dans le graphique en **(G).** Le graphique montre la distribution des YCV en fonction de la présence ou non de ATG16L1-GFP **(H).** Pour l'ensemble des données **:** Barre d'échelle : 5µm et le grossissement de l'insert est x5. Les données représentent le pourcentage de la moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes après analyse de 20 cellules par deux expérimentateurs différents

Les marqueurs des endosomes précoces sont recrutés au niveau de YCV.

La voie de l'endocytose permet l'internalisation de molécules situées sur la membrane plasmique. C'est le cas du récepteur de la Transferrine, qui de ce fait est considéré comme un marqueur de la voie endocytique. Ainsi nous avons mesuré la localisation subcellulaire de ce récepteur pendant la phase précoce de l'infection par *Y. pseudotuberculosis.* Nous avons observé en microscopie

confocale que le récepteur de la transferrine est présent au niveau des YCV (Fig. 34A-34B). La protéine EEA1, également utilisée comme marqueur des endosomes précoces, est localisée au niveau de YCV après 30 min d'infection (Fig. 34C-34D). Rab5, un autre marqueur des endosomes précoces, est également recruté avec 54.83 ± 1.9% des YCV après 30 min d'infection (Fig. 34E-34G). Cependant Rab5 ne reste pas associé avec YCV car nous observons une diminution significative avec 18.1 ± 4.0% des YCV positives pour Rab5 après 2 h d'infection, et seulement 8.6 ± 1.8% après 4 h d'infection (Fig. 34G). La présence de ces marqueurs des endosomes précoces au niveau de la vacuole bactérienne suggère l'implication de la voie endosomale dans le trafic intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis.*

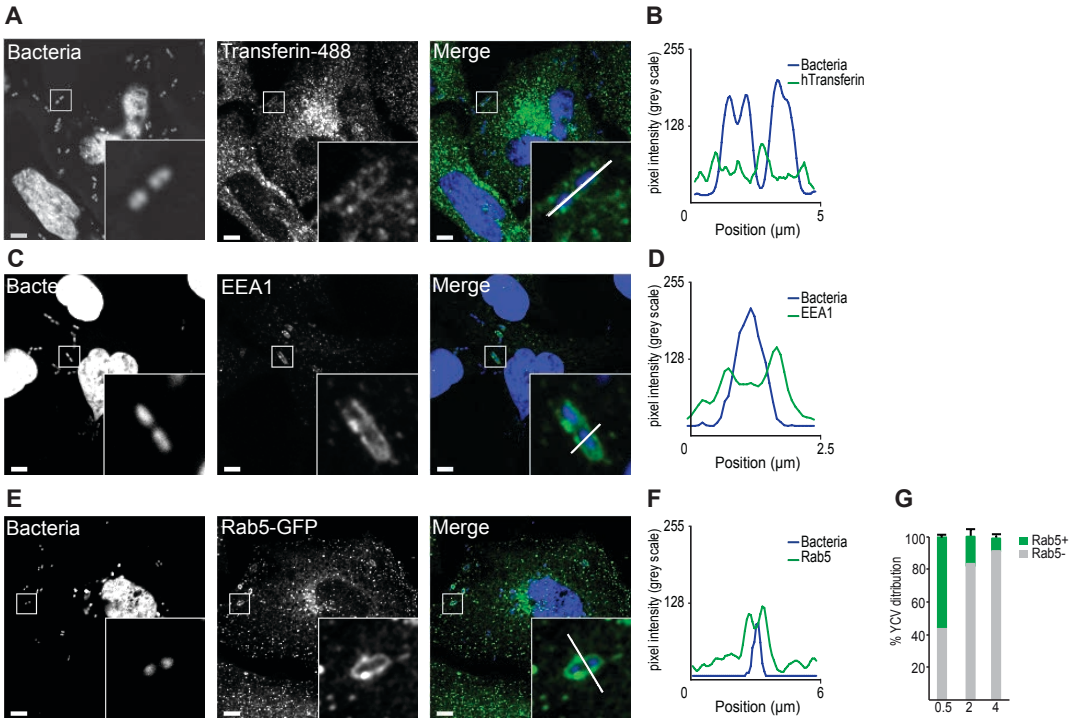


Figure 34 : Les protéines intervenant dans la formation de l'autophagosome sont recrutées au niveau de YCV. Les cellules HeLa on été infectées pendant 30 min par *Y. pseudotuberculosis* puis fixées à la formaline et préparées pour l'analyse en CLSM. Les bactéries sont visualisées après marquage au DAPI (Bleu). **(A)** L'encart montre une bactérie contenue dans une vacuole positive pour la Transferrine. Le profil de fluorescence associé à la ligne blanche est représenté dans le graphique en **(B). (C)** L'encart montre une bactérie contenue dans une vacuole positive pour EEA1-AlexaFluor-488nm® et le profil de fluorescence associé à la ligne blanche est représenté dans le graphique en **(D). (E)** L'encart montre une bactérie contenue dans une vacuole positive pour Rab5-GFP et le profil de fluorescence associé à la ligne blanche est représenté dans le graphique en **(F). (G)** Le graphique montre la distribution des YCV en fonction de la présence ou non de Rab5-GFP, après 0,5, 2 et 4 h d'infection. Pour l'ensemble des données **:** Barre d'échelle : 5µm et le grossissement de l'insert est x5. Les données représentent le pourcentage de la moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes après analyse de 25 cellules.

Les marqueurs des endosomes et des Lysosomes sont recrutés au niveau de YCV.

La maturation des endosomes est caractérisée notamment par un échange de la protéine Rab5 pour Rab7. La dissociation de Rab5 observée 4h après infection suggère une possible maturation des YCV. Nous nous sommes donc demandé si Rab5 se dissociait au profit de Rab7. Pour cela nous avons mesuré dans les cellules HeLa transfectées transitoirement avec Rab7-GFP et infectées par *Y. pseudotuberculosis,* le pourcentage de YCV présentant un marquage Rab7 après 30min, 2h et 4h

d'infection. Ainsi, nous avons observé une augmentation du pourcentage des YCV associées à Rab7 au cours du temps avec 15.1 ± 4.6% de vacuoles positives après 30 min d'infection, 30.81 ± 1,2% après 2h et 70% après 4h (Fig. 35A-35C). Lors de l'infection des cellules épithéliales, *Y. pseudotuberculosis* est donc véhiculé dans une vacuole à simple membrane présentant aussi bien des marqueurs de la voie autophagique que de la voie endosomale. Cependant, pour ces deux voies cataboliques, la maturation des vacuoles aboutie à la fusion avec les lysosomes, conduisant à l'acidification de la vacuole. Nous avons donc voulu savoir d'une part, si YCV est associée avec les marqueurs lysosomaux, tels que LAMP1 et CD63, et d'autre part de confirmer le blocage du processus d'acidification. Pour mesurer l'acidification des vacuoles LC3 positives, nous avons utilisé des cellules HeLa exprimant de façon stable la protéine LC3 associée aux sondes fluorescentes GFP et mRFP. Après 4 h d'infection par *Y. pseudotuberculosis,* la mobilisation de CD63 a été observé au niveau des YCV (Fig. 35D-35E). En effet, 61.4 ± 6.7% des YCV présentent un marquage CD63 (Fig. 35F). La moitié des YCV associées avec CD63 co-distribuent également avec mRFP-GFP-LC3, soit dans une vacuole non-acidifiée (Fig. 35G et Ch1.Fig. S1C-D). De la même manière, nous avons confirmé cette observation avec LAMP1. En effet, 77% des YCV présentent LAMP1 et 35.9 ± 3.7 % sont également associées avec mRFP-GFP-LC3 (Fig. 35H-35K) marquant la non acidification de la vacuole.

L'ensemble de ces résultats met en évidence que, au cours de son trafic intracellulaire, *Y. pseudotuberculosis* interagit avec les endosomes tardifs et la voie de l'autophagie. La vacuole bactérienne semble bien fusionner avec les lysosomes, comme le montre la présence de CD63 et LAMP1 au niveau de YCV, mais celle-ci est non-acidifiée.

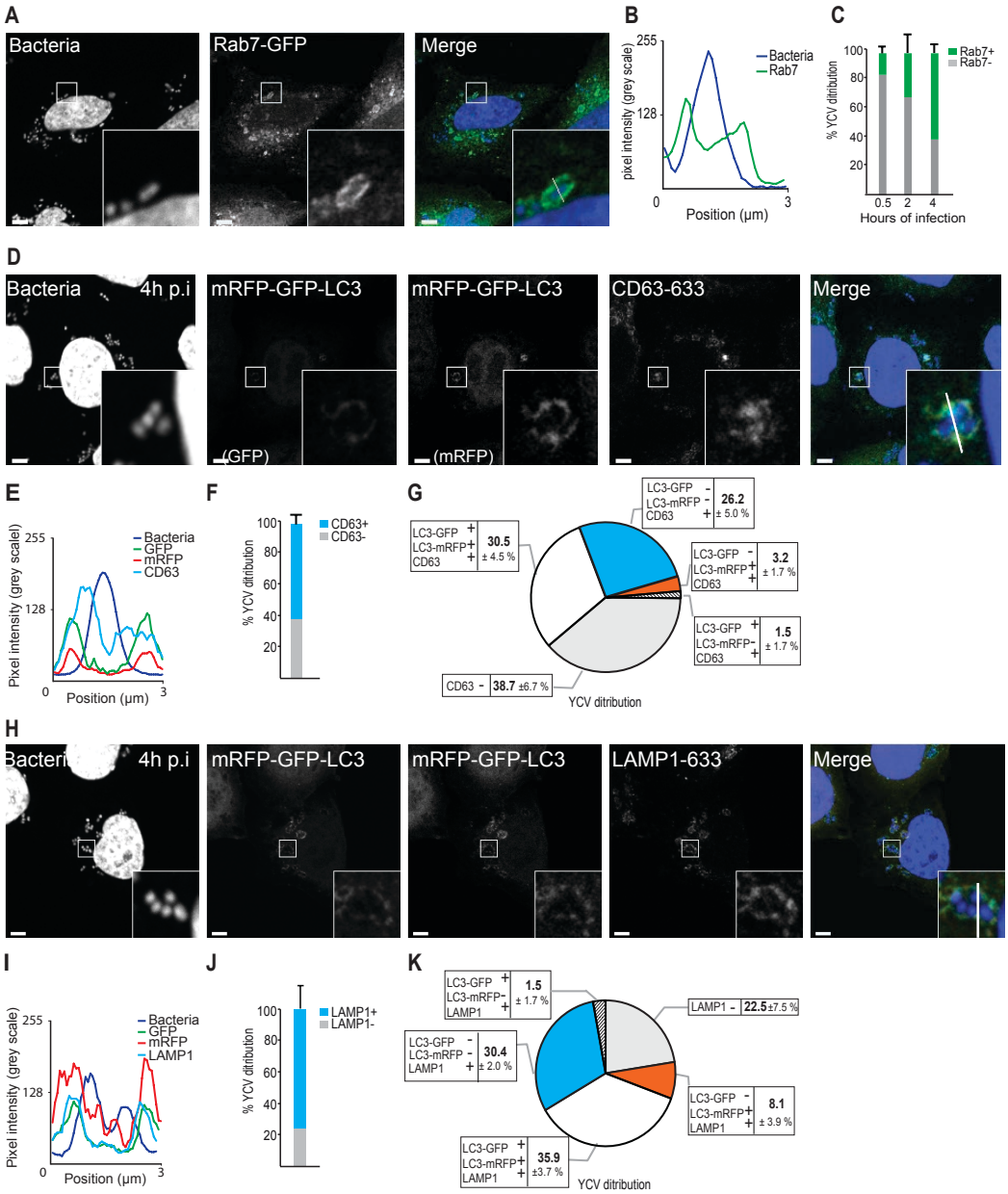


Figure 35 : Rab7, CD63 et LAMP1 sont recrutées au niveau de YCV positive pour LC3. Les cellules HeLa exprimant stablement la protéine mRFP-GFP-LC3 ou exprimant transitoirement la protéine mRFP-LC3 ont été infectées pendant 4 h par *Y. pseudotuberculosis* puis fixées à la formaline et préparées pour l'analyse en CLSM. Les bactéries sont visualisées après marquage au DAPI (Bleu). **(A)** L'encart montre une bactérie contenue dans une vacuole positive pour Rab7-GFP et le profil de fluorescence associé à la ligne blanche est représentée dans le graphique en **(B).** Le graphique montre la distribution des YCV en fonction de la présence ou non de Rab7-GFP, après 0,5, 2 et 4 h d'infection **(C). (D)** L'encart montre une bactérie contenue dans une vacuole positive pour mRFP-GFP-LC3 et pour CD63- AlexaFluor-633nm, et le profil de fluorescence associé à la ligne blanche est représenté dans le graphique en **(E). (F)** Le graphique montre la distribution des YCV en fonction de la présence ou non de CD63, après 4 h d'infection. Le diagramme montre la distribution des YCV positives pour CD63 en fonction de la présence de mRFP-GFP-LC3 **(G). (H)** L'encart montre une bactérie contenue dans une vacuole positive pour mRFP-GFP-LC3 et pour LAMP1- AlexaFluor-633nm, et le profil de fluorescence associé à la ligne blanche est représenté dans le graphique en **(I). (J)** Le graphique montre la distribution des YCV en fonction de la présence ou non de LAMP1, après 4 h d'infection. Le diagramme montre la distribution des YCV positives pour LAMP1 en fonction de la présence de mRFP-GFP-LC3 **(K).** Pour l'ensemble des données **:** Barre d'échelle : 5µm et le grossissement de l'insert est x5. Les données représentent le pourcentage de la moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes après analyse de 25 cellules.

III.Discussion

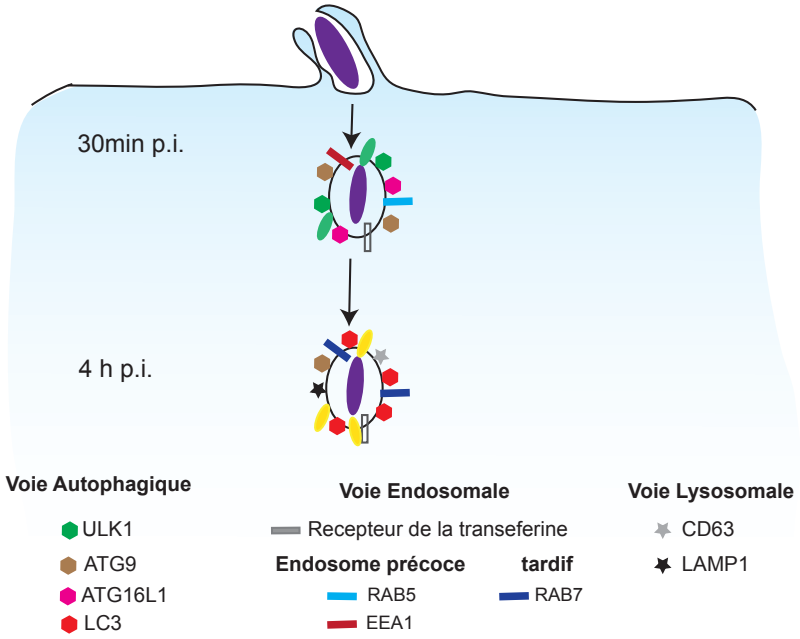


Figure 36 : Schéma récapitulatif des protéines présentes au niveau de la vacuole de Y. pseudotuberculosis

Nos résultats montrent qu'après son internalisation dans les cellules épithéliales, *Y. pseudotuberculosis* évolue au sein d'une vacuole à simple membrane présentant à la fois des marqueurs de la voie autophagique et de la voie endosomale.

L'analyse du trafic intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis* dans les cellules HeLa a montré que les marqueurs des endosomes précoces (EEA1 et Rab5) et tardifs (Rab7) sont recrutés séquentiellement au niveau des YCV. Il serait intéressant de continuer nos investigations sur la maturation de cette vacuole en analysant la mobilisation d'autres protéines Rab, telles que Rab9 et Rab11, connues pour jouer un rôle important dans la voie endosomale. La présence des protéines ULK1, ATG9 et ATG16L1 au début de l'infection suggère un rôle de la machinerie autophagique dans la formation de la vacuole. De plus, cette vacuole est également décorée par l'ubiquitine, par son adaptateur de l'autophagie p62, et par la protéine LC3. L'ubiquitine a récemment été décrite comme un pivot moléculaire permettant la connexion entre les bactéries contenues dans une vacuole endosomale endommagée et la machinerie de l'autophagie (Fujita et al., 2013). Considérant les travaux de Fujita et *al.*, il serait intéressant d'analyser et de caractériser l'implication de l'ubiquitine dans le recrutement des protéines de l'autophagie au niveau de la vacuole bactérienne à simple membrane et positive pour LC3, ainsi que les interactions de cette voie avec les endosomes. Enfin, la présence de marqueurs lysosomaux (CD63 et LAMP1) observée à des temps tardifs de l'infection suggère la maturation de cette vacuole par fusion avec un lysosome. De manière surprenante, le processus de maturation semble interrompu car l'acidification des vacuoles bactériennes ne semble pas majoritaire.

L'ensemble de ces résultats suggère que *Y. pseudotuberculosis* manipule de façon originale les voies cataboliques cellulaires afin de créer une niche favorable à sa réplication intracellulaire.

« La recherche fondamentale ne peut être pratiquée que dans un climat de liberté intellectuelle »

Extrait de La recherche passionnément, *Pierre Joliot*

Discussion Générale Et Perspectives

« On fait la Science avec des faits comme une maison avec des pierres ; mais une accumulation de faits n'est pas plus une science qu'un tas de pierres n'est une maison. »

Henri Poincaré

Discussion Générale et Perspectives

L'étude des mécanismes par lesquels *Y. pseudotuberculosis* détourne les processus cellulaires afin d'établir sa niche de réplication nous a permis de mieux appréhender la complexité de l'autophagie et l'importance des protéines SNARE dans le trafic membranaire.

Nous montrons que, pendant sa vie intracellulaire, *Y. pseudotuberculosis* réside dans une vacuole décorée par la protéine LC3. Bien que la morphologie de la vacuole bactérienne soit différente entre les macrophages et les cellules épithéliales, nous avons observé que, dans les deux cas, la protéine SNARE VAMP7 et la protéine LC3 participent à l'établissement de la niche réplicative de la bactérie. La protéine LC3 est spécifiquement décrite comme présente au cours de la formation et de la maturation de l'autophagosome. Cette protéine est ainsi communément utilisée comme marqueur des autophagosomes. Cependant, des études menées par différents groupes et confirmées par nos travaux ont révélé que la protéine LC3 peut être associée à des structures autres que les autophagosomes (Sanjuan et al., 2007; Birmingham et al., 2008). Ceci nous a amené à nous interroger sur l'utilisation de LC3 comme marqueur principal des autophagosomes. En effet, l'observation du recrutement de la forme conjuguée de LC3 en microscopie photonique ne donne aucune information sur la véritable morphologie de la vacuole. Cela renforce l'utilisation de la microscopie électronique en plus de l'analyse en microscopie photonique, avec l'identification par fluorescence de vésicules associées à LC3. De plus, au cours de notre étude, nous avons observé que la protéine VAMP3 est majoritairement associée avec les YCV à simple membrane dans les cellules épithéliales, alors que, dans les macrophages, la vacuole bactérienne présente essentiellement une double membrane non associée à VAMP3. Cela nous a conduits à proposer VAMP3 comme l'un des constituants moléculaires du check-point impliqué dans l'adressage de la bactérie vers une vacuole à simple ou double membrane positive pour LC3. Que ce rôle puisse être joué par une protéine SNARE n'est peut-être pas si surprenant que cela puisque les protéines SNARE sont au centre de la machinerie de régulation du trafic vésiculaire. En effet, les SNARE permettent une livraison sélective et précise des vésicules par une reconnaissance et une association spécifique d'une R-SNARE située sur les membranes des vésicules donneuses avec des Q-SNARE localisées sur les membranes acceptrices.

La mise en évidence de ces vacuoles à simple membrane positives pour LC3 et, dans notre cas, sans fusion avec le lysosome nous a interpellés sur la définition même donnée à l'autophagosome. En effet, en 1963, Christian De Duve définissait l'autophagie comme la présence de vésicules à simple ou double membrane contenant une petite partie du cytoplasme ou des organites. Il soulignait également que ces vacuoles de séquestration (autophagosomes) sont associées avec les lysosomes. Aujourd'hui, le concept de l'autophagie fait référence à la séquestration d'un élément intracellulaire à l'intérieur d'une vacuole à double membrane décorée par la protéine LC3,

autophagosome, fusionnant par la suite avec le lysosome. Quant aux vacuoles à simple membrane récemment décrites, elles mixent les caractéristiques stipulées par la définition de C. De Duve et la définition actuelle, puisque dans la littérature il s'agit de compartiments qui vont fusionner avec les lysosomes (incluant la xénophagie). Ceci nous a ainsi amenés à envisager que les vésicules à simple membrane et positives pour le marqueur LC3 pourraient constituer un « nouveau » type d'autophagosome. Ainsi, nous posons la question du terme même d'autophagosome : ne pourrait-il pas référer à une famille de vacuoles (autophagiques) permettant la dégradation de constituants par fusion avec le lysosome et dont les membres pourraient être différenciés d'une part sur leurs caractéristiques morphologiques et d'autre part sur le mécanisme moléculaire mis en jeu pour leur formation ? Les bactéries peuvent détourner l'une ou l'autre voie.

I. Quelle est l'origine des membranes constituant la formation de la vacuole bactérienne ?

La formation de l'autophagosome est caractérisée par l'intervention hiérarchisée de protéines ATG dont chacune d'entre elles joue un rôle précis au cours de la formation de cette vacuole à double membrane. La dissection du mécanisme moléculaire de l'autophagie a permis de révéler l'existence de voies alternatives conduisant à la formation de l'autophagosome. Par exemple, la formation de la vacuole à double membrane au cours de la voie non-canonique ou durant l'infection par *Brucella abortus* ne nécessite pas l'intervention de l'ensemble des protéines ATG (Codogno et al., 2012; Starr et al., 2012). Notre étude souligne une autre déclinaison de la voie autophagique, au cours de l'établissement de la vacuole de *Y. pseudotuberculosis* avec la mobilisation du répertoire protéique classique de l'autophagie autour d'une vacuole à simple membrane. L'ensemble de ces observations permet de formuler une hypothèse quant à l'implication de la voie de l'autophagie canonique dans la formation d'une vacuole à simple membrane lors de la vie intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis.* De plus, l'internalisation de *Y. pseudotuberculosis* dans les cellules HeLa, dans un compartiment à simple membrane, s'apparente à un processus endocytique. De concert avec la présence de protéines impliquées dans la voie autophagique, des marqueurs de la voie endosomale tels que EEA1, Rab5 et Rab7 sont mobilisés au niveau des YCV. Il semble que ces deux voies agissent simultanément pour former la vacuole bactérienne et permettre l'enrichissement et l'apport de membrane, notamment lors de la réplication intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis*. Cette hypothèse est étayée par l'identification d'un processus dans lequel les voies endosomales et de l'autophagie vont agir ensemble (Kawamura et al., 2012). Pour confirmer le rôle spécifique de la voie endosomale, il serait intéressant de poursuivre la caractérisation de la vacuole de *Yersinia,* notamment par l'analyse du recrutement de protéines telles que LAMP2A, Rab9 et Rab11.

II. Les SNARE : point de liaison entre les voies de l'autophagie et des endosomes ?

Fujita et collaborateurs ont très récemment proposé que l'ubiquitine constitue un pivot moléculaire entre les voies de l'endocytose et de l'autophagie (Fujita et al., 2013). Dans ce sens, des travaux initiés dans le laboratoire montrent que l'ubiquitine pourrait être un signal d'internalisation de *Y. pseudotuberculosis ;* et son maintien au niveau de la vacuole suggère sa participation dans le contrôle de l'engagement de ces deux voies cataboliques dans le trafic intracellulaire de la bactérie (Ciczora, travaux non publiés). La protéine VAMP3 présente une dynamique de recrutement au cours du trafic intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis*, et est décrite comme ayant une localisation subcellulaire au niveau des endosomes. Il a été montré que cette SNARE intervient dans la régulation de la fusion membranaire entre les endosomes et l'autophagosome (Fader and Colombo, 2008). La protéine VAMP3 pourrait alors être internalisée dans un domaine membranaire intégré à la vacuole de la bactérie suivant la voie de l'endocytose. Ensuite, VAMP3 participerait à la régulation de la fusion des endosomes précoces, puis des autophagosomes, avec la vacuole bactérienne, et serait ainsi engagée dans le contrôle de l'action de ces deux voies.

De manière surprenante, que ce soit dans les macrophages ou les cellules épithéliales, *Y. pseudotuberculosis* réside majoritairement dans des vacuoles non acidifiées. Bien que ne présentant pas d'acidification, la niche de réplication de *Y. pseudotuberculosis* présente les marqueurs lysosomaux. Contrairement à VAMP3, VAMP7 est présent sur les YCV dans les deux modèles étudiés et est requis pour le recrutement de la protéine LC3 au niveau des YCV. Si VAMP7 est décrit comme un acteur de l'initiation de la formation de l'autophagosome, il est également impliqué dans la fusion de l'autophagosome avec les lysosomes. VAMP7 pourrait donc jouer plusieurs rôles au cours de la vie intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis,* en participant dans un premier temps au recrutement de LC3 au niveau de YCV, faisant donc intervenir la voie de l'autophagie dans l'édification de la membrane des YCV, et, dans un second temps, en permettant la fusion avec le lysosome. Si VAMP3 participe au check-point morphologique, on voit que VAMP7 intervient dans l'aiguillage entre les voies. Il est tout-à-fait probable que ces deux protéines SNARE jouent le rôle de ponts protéiques au niveau de la vacuole bactérienne entre les voies des endosomes et de l'autophagie.

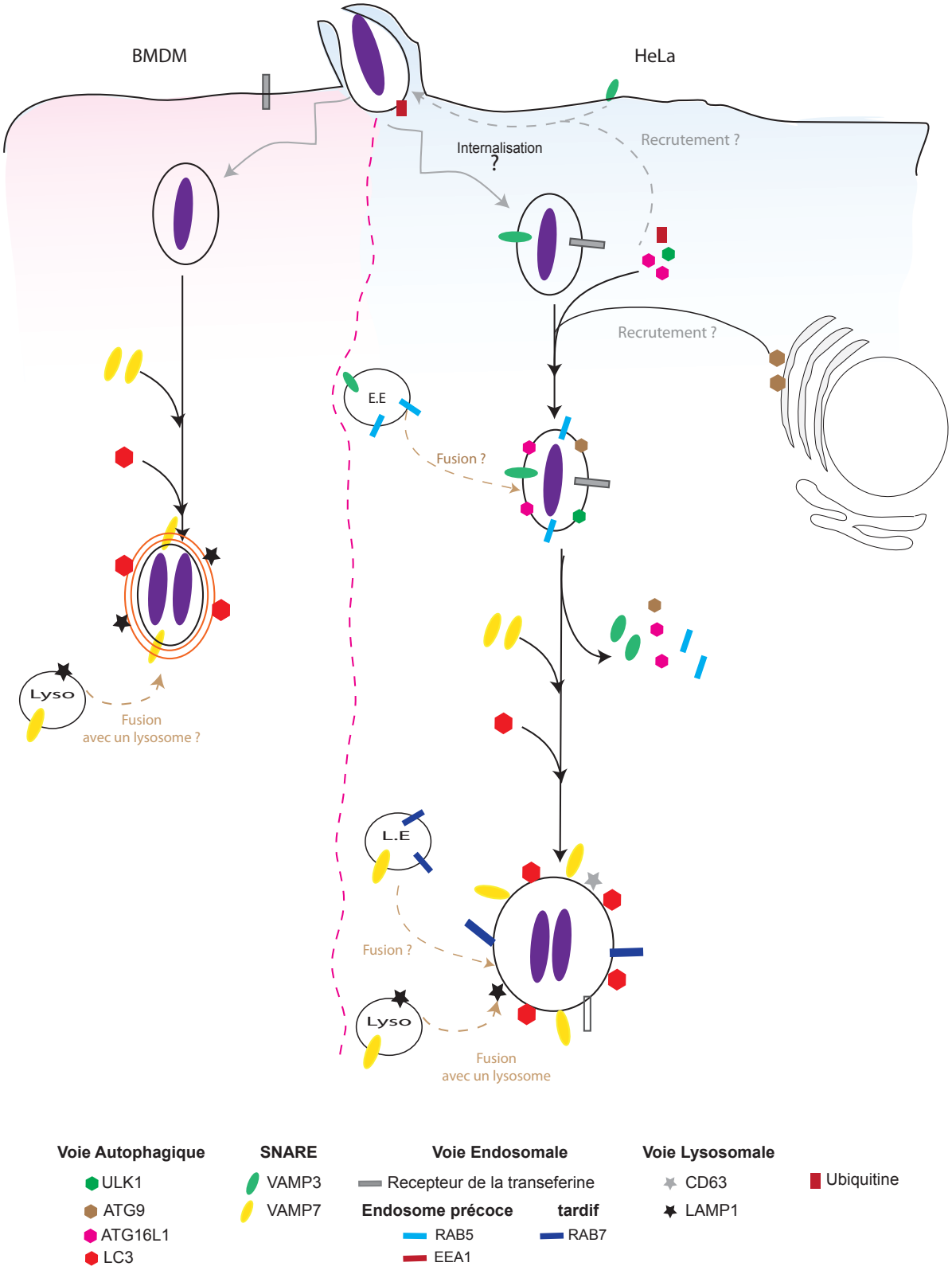


Figure 37 : Schéma de la vie intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis* dans les macrophages (BMDM) et les cellules épithéliales (HeLa).

III. Identification des partenaires des protéines SNARE

La fusion de la vacuole bactérienne avec les endosomes et l'identification de la participation de deux SNARE endocytiques, VAMP7 et VAMP3, dans l'établissement de la niche réplicative de *Y. pseudotuberculosis,* nous conduisent à nous interroger sur l'existence de leurs partenaires potentiels. Lors de la régulation des événements de fusion membranaire, les protéines v-SNARE interagissent avec divers partenaires susceptibles de jouer un rôle au cours de l'infection. Afin de les identifier, nous avons développé un essai phénotypique dans le but d'utiliser une banque de siRNA rassemblant des gènes intervenant notamment dans le trafic membranaire ou les voies de mort cellulaire (autophagie, pyroptose,…). La détection des changements phénotypiques est basée sur la visualisation de sondes fluorescentes dans les lignées cellulaires HeLa par microscopie confocale automatisée. Pour être adaptés à un criblage à grande échelle, ces essais doivent être optimisés pour l'analyse en microplaques 384 puits. La grande quantité de données générées sera ensuite traitée informatiquement à l'aide de logiciels dédiés à l'analyse d'images afin de mesurer l'évolution de paramètres tels que la présence des marquages associés aux protéines SNARE ou au marqueur LC3. Enfin, les mesures obtenues seront soumises à une analyse statistique rigoureuse qui nous permettra d'identifier les gènes de l'hôte engagés dans le détournement des voies cellulaires au profit de la bactérie. La technique de criblage demande des outils robustes. C'est pourquoi nous souhaitons effectuer notre crible en deux étapes. Dans la première phase, nous sélectionnerons les *« hits »* ayant eu un impact sur l'internalisation de la bactérie et/ou l'acidification de la vacuole. La quantification du nombre de bactéries intracellulaires dans les cellules transfectées par un siRNA en comparaison avec les conditions contrôles nous donnera accès aux protéines pouvant être impliquées dans l'internalisation et la réplication de *Y. pseudotuberculosis* dans les cellules HeLa. L'aptitude de la bactérie à bloquer l'acidification de sa vacuole est un point important de sa vie intracellulaire. L'étude de l'acidification de la vacuole par l'utilisation de Lysotracker permettra la sélection des gènes jouant un rôle dans le blocage de l'acidification de YCV. Les protéines cibles présélectionnées seront ensuite testées lors d'une deuxième phase de crible basée sur l'analyse du recrutement de VAMP7 et LC3 au niveau de la vacuole bactérienne. Nous nous intéresserons alors aux gènes impliqués dans la mobilisation de VAMP7 et LC3.

Si les cellules répondent à la présence du pathogène, celui-ci doit probablement influencer cette réponse de l'hôte par l'expression de facteurs de virulence.

IV. Quel est le rôle de la bactérie dans la modulation de ces voies ?

Dans notre étude, *Yersinia pseudotuberculosis* est cultivée à 28°C. Dans ces conditions, le T3SS n'est pas exprimé. En effet, ce système de sécrétion est exprimé de manière optimale à une température de 37°C et en absence de calcium. Dans nos conditions expérimentales, la communication entre la bactérie et la membrane cellulaire impliquerait donc d'autres facteurs bactériens, comme par exemple les adhésines ou les invasines. Notamment dans le cas de certaines *E. coli* adhérentes, les adhésines jouent un rôle important dans l'attachement de la bactérie à la cellule, le recrutement de récepteurs et la transduction de signaux cellulaires (Queval et al., 2011). Ces facteurs présents chez *Y pseudotuberculosis* pourraient donc intervenir dans l'internalisation de la bactérie et influencer son devenir intracellulaire. Par exemple, le recrutement de l'ubiquitine et de VAMP3 au niveau du site de contact bactérie/cellule pourrait être induit par la reconnaissance des facteurs d'adhésion bactériens par des récepteurs cellulaires. Le rôle de ces facteurs d'adhésion peut être abordé par l'utilisation de mutants pour l'expression de chacune de ces adhésines.

Pour déterminer l'importance de VAMP3 et de l'ubiquitine lors de l'internalisation de *Y. pseudotuberculosis*, il serait intéressant de vérifier si ces protéines sont également mobilisées lors du « dialogue » entre la cellule épithéliale et la bactérie exprimant son T3SS responsable du signal antiphagocytaire au travers de la sécrétion de ses effecteurs Yop.

Une fois internalisées, certaines bactéries pathogènes peuvent détourner les voies cellulaires *via* l'expression et la sécrétion de certains effecteurs. C'est le cas de *L. monocytogenes* qui sécrète une Lystériolysine de type O permettant la destruction de sa vacuole, échappant ainsi à la dégradation par voie lysosomale (Hamon et al., 2012). Dans notre modèle expérimental, nous ne savons pas si, une fois internalisée et résidant dans sa vacuole, *Y. pseudotuberculosis* exprime son T3SS lui permettant de moduler la réponse de l'hôte ou de stopper la maturation de sa vacuole.

Par nos travaux nous montrons que le trafic intracellulaire de *Y. pseudotuberculosis* implique à la fois la voie de l'autophagie et la voie endosomale. Cette association des deux voies semble régulée par les protéines SNARE, en particulier VAMP3 et VAMP7. De plus, bien que la morphologie de la vacuole bactérienne dépende du type cellulaire, chaque type vacuolaire aboutit à la même finalité : l'établissement d'une niche réplicative positive pour LC3 et bloquée dans sa maturation. VAMP3 participerait au contrôle de l'adressage de la bactérie vers une vacuole à double membrane, dans le macrophage, ou à simple membrane dans les cellules épithéliales. VAMP7 contrôlerait plus la fusion avec les autophagosomes. Ces check-points moléculaires pourraient-ils être retrouvés dans un autre type d'autophagie ? Ou sont-ils présents uniquement dans la macro-autophagie prenant naissance à la membrane plasmique et évoluant en lien étroit avec les endosomes ?

Matériels

Et

Méthodes

I. Bactériologie

I.1. Souches :

Yersinia pseudotuberculosis	Description	Résistance	Provenance
2777	Sérogroupe O1 : b	Aucune	M. Simonet
2777/GFP	Sérogroupe O1 : b ; p67GFP3.1	Ampicilline	M. Simonet

I.2. Culture bactérienne :

Les souches de *Yersinia pseudotuberculosis* sont cultivées à 28°C dans un milieu Luria-Broth (LB), en culture liquide sous agitation ou sur gélose, en présence de l'antibiotique adéquat. Pour induire l'expression de la GFP, la souche *Y. pseudotuberculosis* 2777/GFP est cultivée en présence de l'inducteur IPTG durant 1h.

I.3. Infection des cellules

Les bactéries en phase exponentielle de croissance sont centrifugées puis lavées dans le milieu de culture cellulaire spécifique (cf. paragraphe correspondant). Les bactéries *Yersinia pseudotuberculosis* sont ajoutées sur les cellules à une multiplicité d'infection (MOI) de 10, et centrifugées pendant 5 min à 3000 RPM afin de synchroniser l'infection. Après 30 min d'infection, les cellules sont lavées avec du PBS et incubées avec du milieu complet additionné de gentamycine à une concentration de 10 µg/ml, afin de tuer les bactéries extracellulaires, puis enfin conservées à 37°C sous 5% de $C0_2$ pendant le temps souhaité.

I.4. Dénombrement par CFU

Pour déterminer le nombre de bactéries intracellulaires, les cellules infectées sont lavées trois fois avec du PBS puis lysées dans un tampon de lyse (PBS, Triton X-100 à 0,1%) pendant 10 min à 37°C (Pujol and Bliska, 2003). Après collection du lysat cellulaire, une étape de sonication (3 pulses de 5 s) est réalisée pour permettre de disperser les bactéries agglomérées. Une série de dilutions du lysat est déposée sur gélose LB et incubée à 28°C. Les colonies sont dénombrées 48 h après ensemencement.

II. Culture Cellulaire

II.1. Lignées cellulaires :

II.1.1. Les lignées épithéliales :

Les lignées cellulaires suivantes sont utilisées : HeLa (cellules épithéliales adhérentes d'adénocarcinome du col de l'utérus humain), HeLa LC3-GFP, HeLa mRFP-GFP-LC3, MEF (fibroblastes d'embryon de souris), MDCK (cellules épithéliales adhérentes canines dérivées de rein de cocker) et MDCK exprimant différentes constructions de la protéine VAMP7-GFP (expression sous le contrôle d'un promoteur Tet-Off). L'ensemble des lignées est cultivé dans les conditions présentées ci-dessous à une température de 37°C sous 5% de CO_2 :

Lignée cellulaire	Milieu de culture (Gibco)	Antibiotiques (Gibco)	FBS	L-Glutamine	Provenance
HeLa	Minimum Essential Medium	P/S 100U/ml	10%	2mM	ATCC
GFP-LC3 HeLa	RPMI without L-glutamax	P/S 100U/ml G418 200µg/ml	10%	2mM	
mRFP-GFP-LC3 HeLa	RPMI without L-glutamax	P/S 100U/ml	10%	2mM	

Lignée cellulaire	Milieu de culture (Gibco)	Antibiotiques (Gibco)	FBS	L-Glutamine	Provenance
MDCK-GFP MDCK-VAMP7 MDCK-ΔVAMP7	Dulbecco Modified Eagle medium	P/S 100U/ml G418 200µg/ml Doxicycline 0.5µg/ml	7%	2mM	T. Galli

II.1.2. Les macrophages

Les BMDM sont une culture primaire de macrophages issus de moelle osseuse de souris Balb/c. Les macrophages sont cultivés à 37°C sous 5% de CO_2 dans les conditions de culture présentées ci-dessous :

Lignée cellulaire	Milieu de culture (Gibco)	Antibiotiques (Gibco)	FBS	L-Glutamine	Provenance
BMDM	Dulbecco Modified Eagle medium	P/S 100U/ml	10%	LCM* 30%	

*L-cells condition medium (LCM): Milieu de différenciation provenant du surnageant de culture de fibroblastes L929, filtré à 0,22 µm et conservé à -20°C, qui fournit une source de CSF-1 (colony stimulating factor 1), un agent de différenciation des cellules souches en macrophages après six jours de contact.

II.2. Culture cellulaire :

Toutes les lignées cellulaires sont cultivées dans des flasques de culture cellulaire de 25 à 75 cm^2 (NUNC) et sont entretenues tous les 3 jours après le détachement des cellules, soit par action mécanique avec un grattoir de cellules (Cell Scrapper ; TPP ; pour les RAW264.7), soit par traitement à la Trypsine-EDTA (0,05% de trypsine et 0,53 mM d'EDTA ; Gibco ; pour les cellules épithéliales). Des boîtes de Pétri non traitées sont utilisées pour les cultures primaires de macrophages différenciés afin d'éviter une adhérence trop importante des cellules, et tous les trois jours les cellules sont détachées avec du PBS-EDTA à 2mM.

III. Transfection et traitement cellulaire

III.1. Transfection cellulaire

III.1.1. Lipofection de vecteurs plasmidiques et des ARN interférants

Les vecteurs plasmidiques sont transfectés transitoirement dans les lignées cellulaires épithéliales à une concentration adaptée à l'aide de Fugen HD™ (Promega) ou de Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen), selon les recommandations du fabricant. Les ARN interférants (siRNA), seuls ou associés en co-transfection avec un plasmide, sont transfectés dans les cellules à des concentrations adéquates à l'aide de Lipofectamine™ RNAimax Reagent (Invitrogen). Le protocole de transfection est élaboré selon les recommandations du fabricant.

III.1.2. Électroporation

La transfection transitoire de plasmides ou de siRNA dans les lignées macrophagiques est effectué à l'aide de la technologie Amaxa suivant les recommandations du fabricant (Amaxa Biosystems). En fonction de la lignée cellulaire, un kit de transfection spécifique est utilisé : le kit « Mouse macrophage Nucleofector kit » pour les BMDM.

III.2. Modulation de l'autophagie

Pour la modulation de l'autophagie, deux stratégies sont employées. Dans la première, nous avons stimulé l'autophagie en traitant les cellules avec de la rapamycine, qui inhibe la protéine mTOR. L'inducteur est ajouté à une concentration de 10 à 20 µg/ml 2 h avant l'infection et est maintenue au cours de celle-ci. La seconde stratégie consiste à inhiber l'autophagie avec la bafilomycine A1 (Cf=100nM), un antibiotique qui bloque l'acidification des autophagosomes permettant ainsi l'accumulation de la forme LC3-II. L'efficacité des traitements est contrôlée par l'observation de la formation de puncta de la protéine LC3 en immunofluorescence, et par l'étude de l'accumulation de la forme LC3-II via des techniques de biochimie.

IV. Biologie cellulaire

IV.1. Plasmides

La souche *Escherichia coli* XL1-BLUE est utilisée pour produire les plasmides. L'extraction des plasmides est réalisée à l'aide du kit Machery-Nagel (Nucleobond AX) en suivant les recommandations du fabricant. La concentration et la pureté sont contrôlées par la mesure de la densité optique à 260 et 280 nm.

Nom	Description	Provenance
GFP-ATG5	Dérivé du plasmide pEGFP-C1, porte le gène codant pour la protéine ATG5 humaine, inséré entre les sites BamHI et XhoI	T.Yoshimori
GFP-ATG16L1	Dérivé du plasmide pEGFP-C1, porte le gène codant pour la protéine ATG16L1 humaine	
GFP-LC3	Dérivé du plasmide pEGFP-C1, porte le gène codant pour la protéine LC3 de rat, inséré entre les sites BglII et EcoRI	T.Yoshimori
mRFP-LC3	Dérivé du plasmide pLC3-GFP, porte le gène codant pour la protéine mRFP, inséré à la place de la GFP	T.Yoshimori
mRFP-GFP-LC3	Dérivé du plasmide pLC3-GFP, porte le gène codant pour la protéine mRFP, inséré entre les sites NheI et AgeI	T.Yoshimori
GFP-RAB5	-	T. Galli
GFP-RAB7	-	T. Galli
FLAG-TRAF6	-	R. Weil
GFP-VAMP3	Dérivé du plasmide pEGFP-C3, porte le gène codant pour la protéine VAMP3 humaine	T.Galli
GFP-VAMP7	Dérivé du plasmide pEGFP-C3, porte le gène codant pour la protéine VAMP7 humaine	T.Galli
mRFP-VAMP7	Dérivé du plasmide pEGFP-C3, porte le gène codant pour la protéine VAMP7 humaine	T.Galli
YFP-Ubiquitine	Dérivé du plasmide pEYFP-C3-HA, porte le gène codant pour la protéine Ubiquitine	
GFP-WIPI1	Dérivé du plasmide pEGFP-C1, porte le gène codant pour la protéine WIPI1a humaine	T.Proikas-Cezanne

IV.2. ARN interférants (siRNA)

Nom	Description	Provenance
siVAMP3	VAMP3 siGENOME SMARTpool ONE-TARGETplus Human (L 011934-00)	Dharmacon
siVAMP7	VAMP7 siGENOME SMARTpool Human SYBL1 (M-020864-00)	Dharmacon
siCTRL	siGENOME Non-Targetting siRNA Pools (D-001206-13-20)	Dharmacon
siGLO-GREEN	siGLO Green (D-001630-01-05)	Dharmacon

IV.3. Anticorps et réactifs

IV.3.1. Anticorps primaires

Anti	Espèce	Application-Dilution	Fabricant
ATG5	Lapin	W.B (1/1000)	Novus
ATG9	Lapin	IF (1.100)	Interchim
CALCOCO2/NDP52	Lapin	IF(1/100)	Abcam
EEA1	Souris	IF (1/100)	BD
FLAG-M2	Souris	IF(1/100); W.B(1/1000)	Sigma
GFP	Lapin	W.B (1/2000)	Abcam
hTransferine	Souris	IF(1/250)	Zymed
hVAMP3	Lapin- Clone TG1	IF(1/100); W.B(1/1000)	T.Galli
hVAMP7	Lapin-Clone TG50	IF(1/500);W.B(1/250)	T.Galli
LAMP1	Mouse H5G11	IF (1/100)	Santa-cruz
LC3	Lapin	W.B (1/1000)	Novus
LC3	Lapin	IF(1/100)	MBL
NBR1	Lapin	IF(1/100)	Abnova
p62	Lapin	IF(1/1OO)	MBL
RAB6	Lapin	IF (1/100)	Santa-Cruz
RAB9	Lapin	IF(1/100)	Santa-Cruz
Tubuline	Souris	WB (1/2500)	Sigma
Ubiquitine	Souris	IF(1/100)	Biomol
WIPI2	Lapin	IF(1/100)	Abgen

IV.3.2. Anticorps secondaires

Anti	Espèce	Couplage fluorochrome/enzyme	Application-Dilution	Fabricant
Lapin	Chèvre	HRP (Horse Radish peroxydase)	W.B (1/5000)	Jackson
Lapin	Chèvre	AlexaFluor 488	IF (1/500)	Invitrogen
Lapin	Chèvre	AlexaFluor 555	IF(1/500)	Invitrogen
Lapin	Chèvre	AlexaFluor 633	IF (1/500)	Invitrogen
Souris	Chèvre	HRP (Horse Radish peroxydase)	W.B (1/5000)	Jackson
Souris	Chèvre	AlexaFluor 488	IF (1/500)	Invitrogen
Souris	Chèvre	AlexaFluor 555	IF(1/500)	Invitrogen
Souris	Chèvre	AlexaFluor 633	IF (1/500)	Invitrogen

IV.3.3. Réactifs et produits chimiques

Nom	Spécificité	Fabrican
DAPI	Marqueur de l'ADN (359/461 nm)	Sigma
Hoechst (l33342)	Marqueur de l'ADN (352/461 nm)	Molecular Probes
Iodure de propidium	Marqueur de l'ADN (540/625) / cellules mortes	Sigma
Lysotracker Red	Marqueur de compartiments acides (577/590 nm)	Molecular Probes
IPTG	Substrat de la ß-galactosidase	Sigma
Rapamycine	Inducteur de l'autophagie (cible la protéine Tor)	Sigma
Bafilomycine A1	Inhibiteur de l'autophagie	Sigma

V. Extraction des protéines et Western blot

Les cellules sont lavées trois fois avec du PBS froid puis directement lysées dans le tampon Laemmli. Le lysat cellulaire est collecté puis centrifugé à 13000 RPM pour éliminer les débris cellulaires. Les protéines, dénaturées à 95°C pendant 5 min, sont déposées sur un gel de 12% ou 15% de polyacrylamide dans un tampon de migration (25mM Tris, 192 mM glycine, 0,1% SDS, pH 8,3), ou sur un gel de polyacrylamaide 4-15% (Biorad). Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de PVDF (Hybond-p de Amersham Bioscience) dans un tampon de transfert (25mM Tris, 192 mM glycine, 20% éthanol, pH 8.3) pendant 1h à 0,30A, ou en utilisant la technique Trans-Blot® Turbo™ de Biorad. La membrane est saturée dans du PBS-Tween 20 0,1% supplémenté avec 5% de lait en poudre ou 5% d'Albumine de sérum de veau (solution de saturation). Selon l'anticorps primaire utilisé, la membrane est incubée 2h à température ambiante ou sur la nuit à 4°C, puis une série de lavages avec du PBS-Tween 20 0,1% est réalisée. L'anticorps secondaire adéquat est ensuite incubé 1h à température ambiante. La révélation est réalisée à l'aide du kit de chimioluminescence Millipore (Euromedex) et la quantification est effectuée en utilisant le logiciel ImageGauge Fuji.

VI. Microscopie

VI.1. Microscopie photonique

VI.1.1. Immunofluorescence

Les cellules sont cultivées sur des lamelles de verre et sont fixées avec de la Formaline 10% durant 20 min à température ambiante. Après fixation, les cellules sont lavées trois fois au PBS, puis perméabilisées pendant 5 min à température ambiante avec du PBS-0,1% Triton X-100. Les sites aspécifiques sont bloqués avec du sérum de veau fœtal (SVF) pendant 1h, puis les lamelles sont ensuite incubées avec l'anticorps primaire adéquat dilué dans du SVF durant 1h à température ambiante. Après les étapes de lavage, les cellules sont incubées avec l'anticorps

secondaire adéquat couplé à un fluorochrome pendant 1h à température ambiante. L'ADN cellulaire et bactérien est visualisé après incubation avec l'agent intercalant DAPI (1µg/ml) pendant 5 min. Les lamelles sont montées sur lame de verre avec un milieu de montage (Dabco) et sont observées en microscopie photonique.

VI.1.2. Microscopie confocale

Les observations sont réalisées sur un microscope confocal LSM710 (Zeiss), installé sur un AxioObserver Z1 et équipé de quatre lasers: une diode 405 nm, un laser Argon (458-488-514 nm), un laser He-Ne 633 nm et un laser DPSS 561 nm. Pour chaque fluorochrome, la bande passante de détection du signal émis est ajustée avec le Quasar Detection Unit, et les images sont acquises par le logiciel Zen et assemblées dans le logiciel ImageJ.

VI.1.3. Microscopie de Super-Résolution (SIM : Structured Illumination Microscopy)

Les images SIM sont acquises sur le système microscopique Zeiss Elyra PS.1 équipé d'un objectif 100x à immersion à huile. Ce système SIM permet d'obtenir des résolutions théoriques de 100 nm le long de l'axe x-y (résolution latérale) et de 300 nm le long de l'axe-z (résolution axiale). Les images (15 images obtenues avec 5 différentes phases de rotation et 3 angles d'orientation différents d'illumination pour chaque champ d'acquisition sont collectées par une caméra EMCCD (1004x1002 pixels) et analysées avec le logiciel Zen.

VI.1.4. Vidéo-microscopie

Les cellules exprimant transitoirement des protéines fluorescentes sont cultivées dans des boîtes WillCo de 40 mm de diamètre avec fond en verre, durant 24h-48h. Avant l'infection, les bactéries en phase exponentielle sont mises en présence de DAPI (5µg/ml) pendant 15 min à 28°C, puis diluées à la MOI d'intérêt dans du milieu de culture cellulaire sans rouge de phénol. La suspension bactérienne est répartie sur les cellules préalablement lavées avec du PBS. L'acquisition est débutée immédiatement après une centrifugation à 3000 RPM, permettant l'observation des étapes très précoces de l'infection.

Le recrutement des marqueurs cellulaires est suivi par time-lapse grâce à un vidéo-microscope à haute vitesse. Les données d'épifluorescence et de fluorescense TIRF sont enregistrées sur un microscope inversé Zeiss Axio Observer Z1 équipé d'une caméra Zeiss Axiocam® MRm, et piloté avec le logiciel AxioVision®. Pour la vidéo-microscopie, le système d'excitation des fluorochromes est composé d'un module colibri muni de LED 405, 470, 555 et 590 nm. Tandis que pour le TIRF, le système d'excitation est composé d'un module de lasers - un laser Argon multi-raie (458/488/514 nm 100mW)et un laser curseur TIRF avec une fibre monomode 561nm -, et d'obturateurs rapides (SmartShutter). Les images sont analysées avec le logiciel ImageJ et converties en films de format avi®.

VI.2. Microscopie à force atomique (AFM)

Les cellules et les bactéries sont préparées selon le même protocole que pour la vidéo-microscopie. Seul le milieu cellulaire est différent (MEM sans rouge de phénol supplémenté avec 50mM HEPES).

La fonctionnalisation des pointes est constituée d'une étape de nettoyage à l'aide de plasma O_2, suivie d'un traitement à l'APTES 3-Aminopropyl triethoxy silane dilué au 1/2500 dans du toluène. Trois lavages de 30 min dans le toluène pur puis un lavage de 10 min dans l'éthanol sont enfin réalisés.

Un microscope Bioscope II (Veeco) équipé d'un statif Axiovert 200M (Zeiss), d'une caméra Coolsnap (Princeton Instrument), et piloté par le logiciel Metamorph (Molecular Device), est utilisé pour les acquisitions.

VI.3. Microscopie électronique à transmission (MET)

VI.3.1. Morphologie

Après infection, les cellules sont fixées avec 1% de glutaraldéhyde et 0,1 M de cacodylate de sodium, pH 6,8, à 4°C sur la nuit. Par la suite, les cellules sont traitées avec 1% de tétroxyde d'osmium et du ferricyanure de potassium à 1,5% pendant 1h, suivi d'un traitement de 45 min avec 1% d'acétate d'uranyle. Les cellules sont déshydratées dans l'éthanol, puis grattées et infiltrées avec de l'oxyde de propylène. Les cellules sont finalement incluses dans la résine époxy durcie pendant 24 h à 60 °C. Les sections d'une épaisseur de 70 à 80 nm sont déposées sur des grilles métalliques revêtues de formvar.

VI.3.2. Microscopie corrélative entre photonique et électronique

Les cellules HeLa exprimant stablement la protéine mRFP-GFP-LC3 sont cultivées sur une lamelle de verre disposant d'un système de coordonnées alphanumériques (EMS). Après l'infection, les cellules sont fixées avec du formol 10% et 0,05% de glutaraldéhyde pendant 20 min à température ambiante, suivi d'une incubation de 15 min avec 0,1% du borohydrure de sodium. Pour permettre l'observation en microscopie confocale, la lamelle est montée sur une lame disposant d'une concavité. Les cellules sélectionnées sont imagées et localisées à l'aide du système de coordonnées alphanumériques. Après cette étape d'observation, les cellules sont fixées une seconde fois sur la nuit à 4°C dans 1% glutaraldéhyde et 0,1 M de cacodylate de sodium à pH 6,4. Chaque cellule d'intérêt est incluse dans la résine coulée dans une gellule placée à plat sur la lamelle et qui est ensuite retirée/décollée. Les cellules sont localisées et des coupes en série d'une épaisseur de 70-80 nm sont réalisées et déposées sur des grilles métalliques revêtues de formvar.

VI.3.3. Microscope électronique

Les échantillons sont observés à l'aide d'un microscope électronique à transmission Hitachi 7500 associé à une caméra AMT CCD.

Annexes

Annexe I : Microreview

- *Microreview :* Cellular Microbiology 2011

Ubiquitylation and autophagy in the control of bacterial infections and related inflammatory responses

Laure-Anne Ligeon, Nassima Temime Smali et Frank Lafont

Annexe II : Légendes des films

Film 1 : VAMP3 et VAMP7 sont recrutées au niveau de YCV

Les cellules HeLa exprimant transitoirement EGFP-VAMP3 (vert) et mRFP-VAMP7 (rouge) sont infectées avec *Y. pseudotuberculosis*, marquées au DAPI (ADN Bleu) et directement observées en vidéo microscopie pendant 3 h 33 min. Le film montre la migration des protéines EGFP-VAMP3 et mRFP-VAMP7 au niveau d'une YCV. Le temps d'acquisition est indiqué en haut à gauche (hr :mn). Barre d'échelle : 5µm.

Film 2 : VAMP7 et LC3 sont recrutées au niveau de YCV

Les cellules HeLa exprimant transitoirement EGFP-VAMP7 (vert) et mRFP-LC3 (rouge) sont infectées avec *Y. pseudotuberculosis*, marquées au DAPI (ADN Bleu) et observées en vidéo microscopie pendant 1h. Les flèches indiquent la migration des protéines EGFP-VAMP7 et mRFP-LC3 au niveau d'une YCV. Le temps d'acquisition est indiqué en bas à gauche (hr :mn). Barre d'échelle : 5µm.

Film 3 : Recrutement de VAMP3 au niveau du site de contact bactérie/cellule

Une bactérie *Y. pseudotuberculosis*, marquée au DAPI (ADN Bleu) et fixée sur un pointe d'AFM, est mise en contact avec une cellule HeLa unique exprimant transitoirement EGFP-VAMP3, et observée en vidéo microscopie. Les flèches indiquent la migration des protéines EGFP-VAMP3 vers le site de contact bactérie/cellule. Barre d'échelle : 5µm.

Annexe III : Figure crible (i)

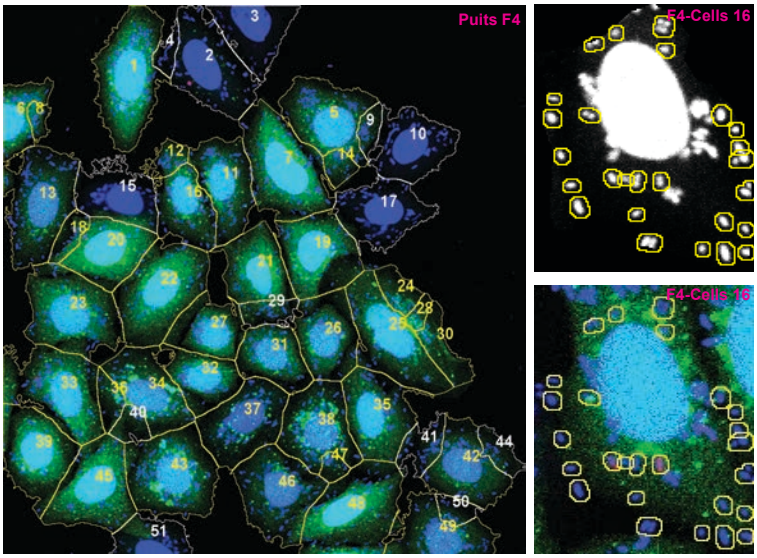


Figure 38 : Modélisation de la segmentation des cellules et des bactéries avec le logiciel ImageJ. Les cellules HeLa exprimant stablement GFP-LC3 sont infectées pendant 4 h avec *Y. pseudotuberculosis*.

<u>Stratégie de segmentation des cellules :</u>

La plateforme de microscopie photonique a développé une macro pour l'analyse des images en plusieurs étapes. La première consiste à segmenter les cellules d'intérêt transfectées. Des seuillages d'intensité de fluorescence permettent de segmenter les noyaux (canal DAPI) ainsi que les contours de l'ensemble des cellules (canal GFP). Une mesure de la fluorescence moyenne dans chaque cytoplasme permet de discriminer la population de cellules transfectées (Fig. 1). La seconde étape consiste à repérer les bactéries dans ces cellules transfectées via un seuillage d'intensité (canal DAPI) suivi d'une analyse de particules (Fig. 1). Chaque région d'intérêt correspondant à une bactérie est ensuite dilatée. Afin d'étudier le recrutement de protéines dans une zone proche de la bactérie, nous avons effectué des mesures d'intensité dans cette zone élargie. La macro permet l'analyse automatique de plusieurs images en batch. Le tableau de résultats obtenus indique, pour chaque zone « bactérie élargie », les intensités de fluorescence moyennes et maximales des canaux d'intérêt (canal GFP et si nécessaire le canal mRFP).

Annexe IV : Figure crible (ii)

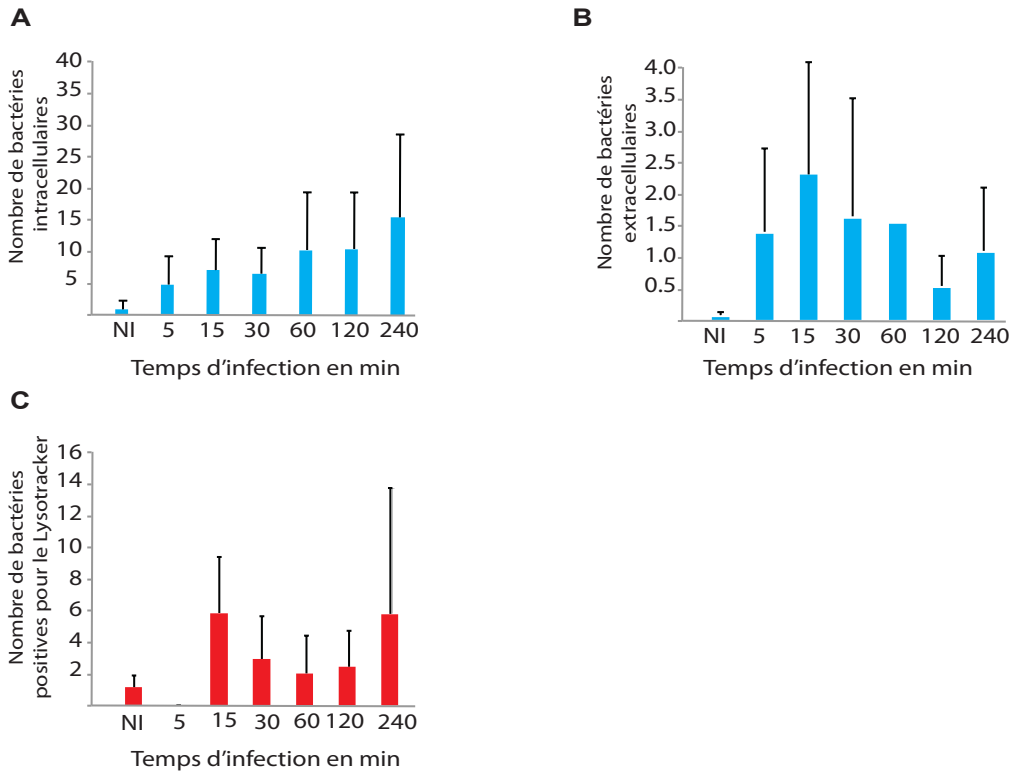
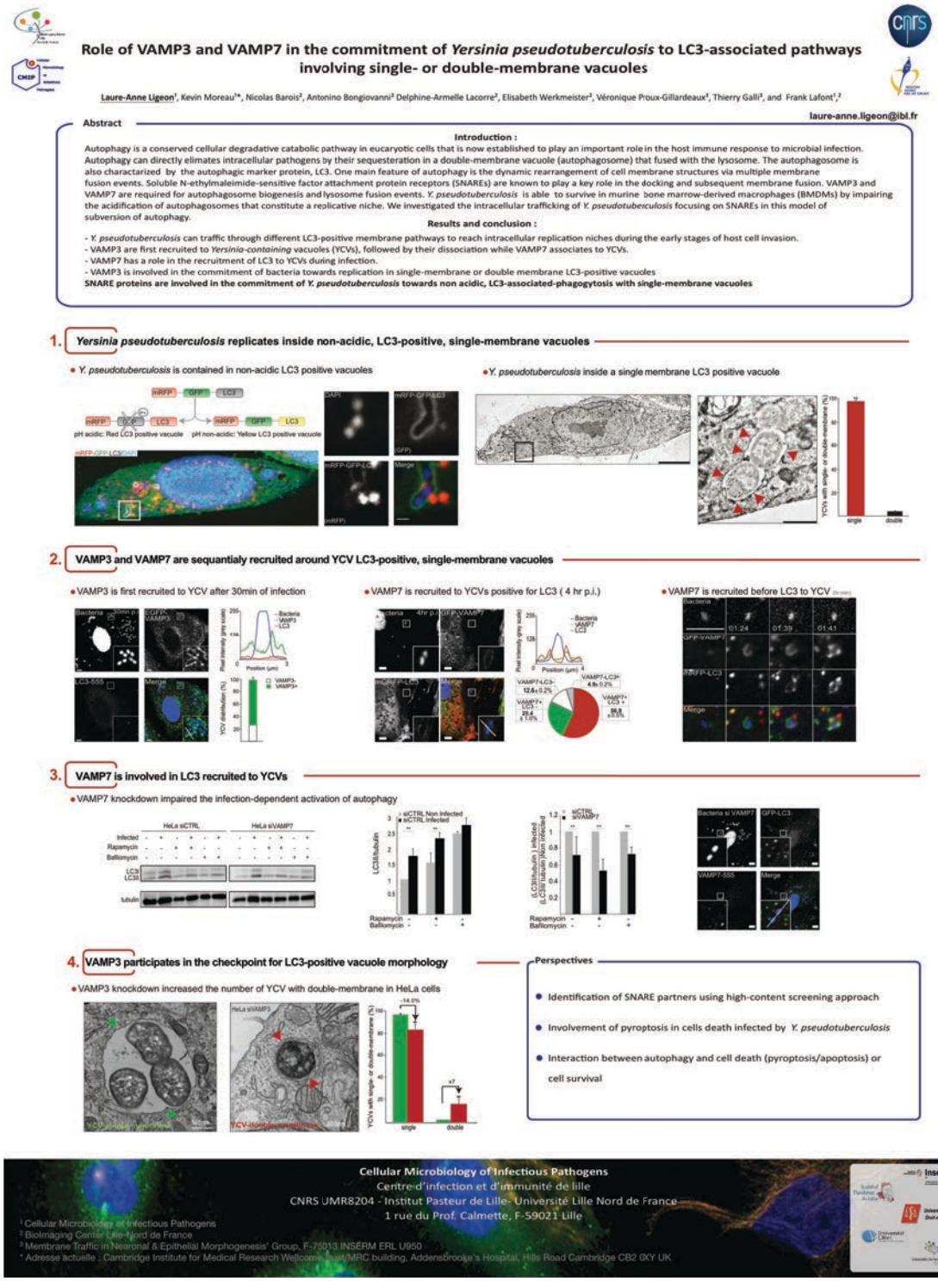


Figure 39 : Quantification automatisée du nombre de bactéries extracellulaires, intracellulaires et colocalisées avec le Lysotracker. Les cellules HeLa sont infectées (5, 15, 30, 60, 120 et 240 min) par *Y. pseudotuberculosis* et marquées au Lysotracker 2 h avant fixation, puis analysées à l'aide d'un microscope confocal automatique. Les données représentent la moyenne de trois puits de microplaque 96 puits pour chaque condition d'une unique expérience.

VII. Communication écrite :

- CIIL2013: 1st International Symposium on Innate Immunity

  7-9 Octobre 2013: Lille, France



VIII. Communications orales :

12ème Journées André Verbert (*Prix de la meilleure communication orale)*

11 Septembre 2012; Lille, France

Les v-SNARE, VAMP3 et VAMP7, sont impliquées dans l'usurpation de la voie autophagique par *Yersinia pseudotuberculosis*

L'autophagie est un processus de dégradation cellulaire conservé dans les cellules eucaryotes. Ce mécanisme, est à l'origine de la séquestration de composants cytoplasmiques, d'organelles et également de pathogènes dans une vésicule à double membrane appelée autophagosome. Le contenu des autophagosomes est ensuite dégradé par fusion avec les lysosomes. La formation des autophagosomes est sous le contrôle d'une trentaine de gènes ATG (AuTophagy Genes) codant pour des protéines pouvant interagir avec de multiples protéines impliquées dans le trafic intracellulaire telles que les SNARE (Nair et *al* 2011). En effet, la fusion de la protéine ATG16L1 et de la v-SNARE VAMP7 intervient dans les stades précoces de la formation de l'autophagosome (Moreau et *al*, 2011).
Notre étude consiste à caractériser le mécanisme d'usurpation de l'autophagie par l'entérobactérie *Yersinia pseudotuberculosis.* En effet, la réplication de *Y. pseudotuberculosis,* dans les macrophages, *in vitro*, peut être associée à sa capacité de se répliquer au sein d'un autophagosme en bloquent sa maturation (Pujol and Bliscka, 2003 ; Moreau et *al,* 2010).
Pour caractériser ce mécanisme, nous étudions l'implication et le rôle de deux protéines SNARE VAMP3 et VAMP7 dans le trafic intracellulaire et l'usurpation de l'autophagie par *Y. pseudotuberculosis* dans les macrophages.
Nos résultats montrent que la protéine VAMP3 est recrutée dans les premiers temps de l'infection au niveau de la vacuole de *Yersinia pseudotuberculosis* (YCV), puis est en suite relayée par la protéine VAMP7. De plus, nous avons montré par immunofluorescence que la protéine VAMP7 est co-distribuée avec le marqueur de l'autophagie, LC3, autour de YCV. Les analyses biochimiques ont démontré que l'inhibition de l'expression de VAMP7 diminue non seulement l'autophagie induite par des inducteurs d'autophagie, mais également celle liée à *Y. pseudotuberculosis*. Ainsi, Vamp7 joue un rôle important dans la régulation du trafic intracellulaire de ce pathogène.

2ème Journées Scientifique du Club Francophone de L'AuTophaGie

23-25 Septembre 2013, La Grande Motte, France

Les v-SNARE, VAMP3 et VAMP7, sont impliquées dans l'usurpation de la voie autophagique par *Yersinia pseudotuberculosis*

La réplication de *Yersinia. pseudotuberculosis,* dans les macrophages, *in vitro*, peut être associée à sa capacité de se répliquer au sein d'un autophagosome en bloquent sa maturation[1,2].
Afin de caractériser le mécanisme d'usurpation de l'autophagie par cette entérobactérie, nous étudions l'implication et le rôle de deux protéines SNARE, VAMP3 et VAMP7.
Nos résultats montrent que la protéine VAMP3 est recrutée dans les stades très précoces de l'infection au niveau de la vacuole contenant *Y. pseudotuberculosis* (YCV) puis est en suite relayée par la protéine VAMP7. De plus, la protéine VAMP7 co-distribue avec le marqueur de l'autophagie, LC3, autour des YCV. Nos analyses biochimiques ont confirmé que l'inhibition de l'expression de VAMP7 diminue l'autophagie induite par *Y. pseudotuberculosis*. Ainsi, VAMP7 joue-t-elle un rôle important dans la régulation du trafic intracellulaire de ce pathogène.

LC3-positive *Yersinia containing vacuoles* and SNAREs trafficking during invasion

Yersinia pseudotuberculosis is able to replicate inside macrophages inducing autophagosome acidification impairment. The membrane trafficking between *Yersinia-vacuoles-contain* (YCV) and LC3-positive vacuoles during infection remains poorly understood. We show that in epithelial cells *Y. pseudotuberculosis* is contained inside non-acidic and single membrane LC3-positive-vacuoles whereas, in bone-marrow-derived-macrophages (BMDM), bacteria are observed inside doubles membranes and LC3-positives vacuoles. Moreover, we show a precise kinetics of VAMP3 recruitment and dissociation of YCVs and the subsequent recruitment of VAMP7. By RNA silencing of VAMP7, we show its requirement for LC3 association with YCV. In macrophages, we found identical kinetics of VAMP3 association and dissociation with YCVs and VAMP7-dependent LC3 recruitment on YCVs. We also address the issue of the membrane donor compartment to the LC3-positive YCVs. Our results question the role of the SNARE dependence towards double or single membrane bacteria containing vacuoles.

Bibliographie

Abdel-Haq NM, Asmar BI, Abuhammour WM, Brown WJ (2000). Yersinia enterocolitica infection in children Pediatr Infect Dis J. Oct;19(10):954-8.

Achtman, M., Zurth, K., Morelli, G., Torrea, G., Guiyoule, A., and Carniel, E. (1999). Yersinia pestis, the cause of plague, is a recently emerged clone of Yersinia pseudotuberculosis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *96*, 14043–14048.

Antonin, W., Holroyd, C., Fasshauer, D., Pabst, S., Mollard, Von, G. F., and Jahn, R. (2000a). A SNARE complex mediating fusion of late endosomes defines conserved properties of SNARE structure and function. EMBO J *19*, 6453–6464.

Antonin, W., Holroyd, C., Tikkanen, R., Höning, S., and Jahn, R. (2000b). The R-SNARE endobrevin/VAMP-8 mediates homotypic fusion of early endosomes and late endosomes. Molecular Biology of the Cell *11*, 3289–3298.

Arasaki, K., and Roy, C. R. (2010). Legionella pneumophila promotes functional interactions between plasma membrane syntaxins and Sec22b. Traffic *11*, 587–600.

Arasaki, K., Toomre, D. K., and Roy, C. R. (2012). The Legionella pneumophila effector DrrA is sufficient to stimulate SNARE-dependent membrane fusion. Cell Host and Microbe *11*, 46–57.

Ashford, T. P., And Porter, K. R. (1962). Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes. The Journal of Cell Biology *12*, 198–202.

Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths, G., and Ktistakis, N. T. (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. The Journal of Cell Biology 182, 685–701.

Bacon, G. A., and Burrows, T. W. (1956). The basis of virulence in Pasteurella pestis: an antigen determining virulence. Br J Exp Pathol *37*, 481–493.

Ben-Efraim, S., and Bichowsky-Slomnichi, L. (1964). The ph 6 antigen in strains of pasteurella pseudotuberculosis and its relation to biological activitieS. Journal of Bacteriology *87*, 236–237.

Ben-Efraim, S., Aronson, M., and Bichowsky-Slomnicki, L. (1961). New antigenic component of pasteurella pestis formed under specified conditions of ph and temperature. Journal of Bacteriology *81*, 704–714.

Berg, T. O., Fengsrud, M., Strømhaug, P. E., Berg, T., and Seglen, P. O. (1998). Isolation and characterization of rat liver amphisomes. Evidence for fusion of autophagosomes with both early and late endosomes. J Biol Chem *273*, 21883–21892.

Bichowsky-Slomnicki, L., and Ben-Efraim, S. (1963). Biological activities in extracts of pasteurella pestis and their relation to the "ph 6 antigen". Journal of Bacteriology *86*, 101–111.

Birmingham, C. L., Canadien, V., Gouin, E., Troy, E. B., Yoshimori, T., Cossart, P., Higgins, D. E., and Brumell, J. H. (2007). Listeria monocytogenes evades killing by autophagy during colonization of host cells. Autophagy *3*, 442–451.

Birmingham, C. L., Canadien, V., Kaniuk, N. A., Steinberg, B. E., Higgins, D. E., and Brumell, J. H. (2008). Listeriolysin O allows Listeria monocytogenes replication in macrophage vacuoles. Nature *451*, 350–354.

Birmingham, C. L., smith, A. C., Bakowski, M. A., Yoshimori, T., and Brumell, J. H. (2006). Autophagy

controls Salmonella infection in response to damage to the Salmonella-containing vacuole. J Biol Chem *281*, 11374–11383.

Bliska, J. B., Wang, X., Viboud, G. I., and Brodsky, I. E. (2013). Modulation of innate immune responses by Yersinia type III secretion system translocators and effectors. Cellular Microbiology.

Blommaart, E.F., Krause, U., Schellens, J.P., Vreeling-Sindelarova, H., and Meijer, A.J. (1997). The phosphatidylinositol 3-kinase inhibitors wortmannin and LY294002 inhibit autophagy in isolated rat hepatocytes. Eur J Biochem 243, 240-246.

Blommaart, E.F., Luiken, J.J., Blommaart, P.J., van Woerkom, G.M., and Meijer, A.J. (1995). Phosphorylation of ribosomal protein S6 is inhibitory for autophagy in isolated rat hepatocytes. J Biol Chem 270, 2320-2326.

Block, M. R., Glick, B. S., Wilcox, C. A., Wieland, F. T., and Rothman, J. E. (1988). Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *85*, 7852–7856.

Boada-Romero, E., Letek, M., Fleischer, A., Pallauf, K., Ramón-Barros, C., and Pimentel-Muiños, F. X. (2013). TMEM59 defines a novel ATG16L1-binding motif that promotes local activation of LC3. EMBO J *32*, 566–582.

Bonifacino, J. S., and Glick, B. S. (2004). The mechanisms of vesicle budding and fusion. Cell *116*, 153–166.

Bottone, E. J. (1997). Yersinia enterocolitica: the charisma continues. Clinical microbiology reviews, *10*, 257–276.

Boyle, K. B., and Randow, F. (2013). The role of "eat-me" signals and autophagy cargo receptors in innate immunity. Current Opinion in Microbiology.

Brodsky, I. E., Palm, N. W., Sadanand, S., Ryndak, M. B., Sutterwala, F. S., Flavell, R. A., Bliska, J. B., and Medzhitov, R. (2010). A Yersinia effector protein promotes virulence by preventing inflammasome recognition of the type III secretion system. Cell Host and Microbe *7*, 376–387.

Brubaker RR. The genus Yersinia: biochemistry and genetics of virulence. Curr Top Microbiol Immunol. 1972;57:111-5

Butler T.(1994) Yersinia infections: centennial of the discovery of the plague bacillus Clin Infect Dis. Oct;19(4):655-61; quiz 662-3.

Butler, T. (2009). Plague into the 21st century. Clin. Infect. Dis. *49*, 736–742.

Brzostek, K., Raczkowska, A., and Zasada, A. (2003). The osmotic regulator OmpR is involved in the response of Yersinia enterocolitica O:9 to environmental stresses and survival within macrophages. FEMS Microbiol Lett 228, 265-271.

Cabrera, M., and Ungermann, C. (2010). Guiding endosomal maturation. Cell *141*, 404–406.

Cai, H., Reinisch, K., and Ferro-Novick, S. (2007). Coats, tethers, Rabs, and SNAREs work together to mediate the intracellular destination of a transport vesicle. Dev. Cell *12*, 671–682.

Carniel, E., Autenrieth, I., Cornelis, G., Fukushima, H., Guinet, F., Isberg, R., Pham, J., Prentice, M., Simonet, M., Skurnik, M., et al. (2006). The Prokaryotes M. Dworkin, S. Falkow, E. Rosenberg, K.-H. Schleifer, and E. Stackebrandt, eds. (Springer New York).

Cavanaugh, D. C., and Randall, R. (1959). The role of multiplication of Pasteurella pestis in mononuclear phagocytes in the pathogenesis of flea-borne plague. J. Immunol. *83*, 348–363.

Celli, J. (2012). LRSAM1, an E3 Ubiquitin ligase with a sense for bacteria. Cell Host and Microbe *12*, 735–736.

Cemma, M., and Brumell, J. H. (2012). Interactions of pathogenic bacteria with autophagy systems. Curr Biol *22*, R540–5.

Cepeda, V., and Fraile-Ramos, A. (2011). A role for the SNARE protein syntaxin 3 in human cytomegalovirus morphogenesis. Cellular Microbiology *13*, 846–858.

Chaineau, M., Danglot, L., and Galli, T. (2009). Multiple roles of the vesicular-SNARE TI-VAMP in post-Golgi and endosomal trafficking. FEBS Lett. *583*, 3817–3826.

Chan, S. N., and Tang, B. L. (2013). Location and membrane sources for autophagosome formation - from ER-mitochondria contact sites to Golgi-endosome-derived carriers. Mol. Membr. Biol.

Chang, Y.-Y., and Neufeld, T. P. (2010). Autophagy takes flight in Drosophila. FEBS Lett. *584*, 1342–1349.

Charnetzky, W. T., and Shuford, W. W. (1985). Survival and growth of Yersinia pestis within macrophages and an effect of the loss of the 47-megadalton plasmid on growth in macrophages. Infection and Immunity, *47*, 234–241.

Chen, Y., and Klionsky, D. J. (2011). The regulation of autophagy - unanswered questions. Journal of Cell Science *124*, 161–170.

Cheong, H., Yorimitsu, T., Reggiori, F., Legakis, J. E., Wang, C.-W., and Klionsky, D. J. (2005). Atg17 regulates the magnitude of the autophagic response. Molecular Biology of the Cell *16*, 3438–3453.

Christoforidis, S., McBride, H. M., Burgoyne, R. D., and Zerial, M. (1999). The Rab5 effector EEA1 is a core component of endosome docking. Nature *397*, 621–625.

Clark, S. L. (1957). Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. J Biophys Biochem Cytol *3*, 349–362.

Clary, D. O., and Rothman, J. E. (1990). Purification of three related peripheral membrane proteins needed for vesicular transport. J Biol Chem *265*, 10109–10117.

Codogno, P., Mehrpour, M., and Proikas-Cezanne, T. (2012). Canonical and non-canonical autophagy: variations on a common theme of self-eating? Nat Rev Mol Cell Biol *13*, 7–12.

Collins, C. A., De Mazière, A., van Dijk, S., Carlsson, F., Klumperman, J., and Brown, E. J. (2009). Atg5-Independent Sequestration of Ubiquitinated Mycobacteria. PLoS Pathog *5*, e1000430.

Conner, S. D., and Schmid, S. L. (2003). Regulated portals of entry into the cell. Nature *422*, 37–44.

Cornelis, G. R. (2002). Yersinia type III secretion: send in the effectors. The Journal of Cell Biology *158*, 401–408.

Cornelis, G. R., and Van Gijsegem, F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. Annu. Rev. Microbiol. *54*, 735–774.

Darsow, T., Rieder, S. E., and Emr, S. D. (1997). A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole. The Journal of Cell Biology *138*, 517–529.

de Duve, C. and Wattiaux R (1966). Fonctions of Lysosomes . Eur. J. Biochem. *137*, 391–397.

de Duve, C. (1983). Lysosomes revisited. Eur. J. Biochem. *137*, 391–397.

Delevoye, C., Nilges, M., Dehoux, P., Paumet, F., Perrinet, S., Dautry-Varsat, A., Subtil, A., and Valdivia, R. H. (2008). SNARE Protein Mimicry by an Intracellular Bacterium. PLoS Pathog *4*, e1000022.

Deretic, V., and Levine, B. (2009). Autophagy, immunity, and microbial adaptations. Cell Host and Microbe *5*, 527–549.

Dersch, P., and Isberg, R. R. (1999). A region of the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein enhances integrin-mediated uptake into mammalian cells and promotes self-association. EMBO J *18*, 1199–1213.

Dersch, P., and Isberg, R. R. (2000). An immunoglobulin superfamily-like domain unique to the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein is required for stimulation of bacterial uptake via integrin receptors. Infection and immunitY, *68*, 2930–2938.

Deter, R. L., and de Duve, C. (1967). Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes. The Journal of Cell Biology *33*, 437–449.

Dewoody, R. S., Merritt, P. M., and Marketon, M. M. (2013a). Regulation of the Yersinia type III secretion system: traffic control. Front Cell Infect Microbiol *3*, 4.

Dewoody, R., Merritt, P. M., and Marketon, M. M. (2013b). YopK controls both rate and fidelity of Yop translocation. Mol. Microbiol. *87*, 301–317.

Dong, X., and Levine, B. (2013). Autophagy and viruses: adversaries or allies? J Innate Immun *5*, 480–493.

Dortet, L., Mostowy, S., Louaka, A. S., Gouin, E., Nahori, M.-A., Wiemer, E. A. C., Dussurget, O., and Cossart, P. (2011). Recruitment of the major vault protein by InlK: a Listeria monocytogenes strategy to avoid autophagy. PLoS Pathog *7*, e1002168.

Dreux, M., Gastaminza, P., Wieland, S. F., and Chisari, F. V. (2009). The autophagy machinery is required to initiate hepatitis C virus replication. Proceedings of the National Academy of Sciences *106*, 14046–14051.

Drummond, N., Murphy, B. P., Ringwood, T., Prentice, M. B., Buckley, J. F., and Fanning, S. (2012). Yersinia enterocolitica: a brief review of the issues relating to the zoonotic pathogen, public health challenges, and the pork production chain. Foodborne Pathog. Dis. *9*, 179–189.

Dupont, N., Lacas-Gervais, S., Bertout, J., Paz, I., Freche, B., Van Nhieu, G. T., van der Goot, F. G., Sansonetti, P. J., and Lafont, F. (2009). Shigella Phagocytic Vacuolar Membrane Remnants Participate in the Cellular Response to Pathogen Invasion and Are Regulated by Autophagy. Cell Host and Microbe *6*, 137–149.

Dupont, N., Temime Smaali, N., and Lafont, F. (2010). How ubiquitination and autophagy participate in the regulation of the cell response to bacterial infection. Biol. Cell *102*, 621–634.

Eitel, J., and Dersch, P. (2002). The YadA protein of Yersinia pseudotuberculosis mediates high-efficiency uptake into human cells under environmental conditions in which invasin is repressed. INFECTION AND IMMUNITY, *70*, 4880–4891.

Eitel, J., Heise, T., Thiesen, U., and Dersch, P. (2005). Cell invasion and IL-8 production pathways initiated by YadA of Yersinia pseudotuberculosis require common signalling molecules (FAK, c-

Src, Ras) and distinct cell factors. Cellular Microbiology *7*, 63–77.

Elliott, a. m., and Bak, i. j. (1964). The fate of mitochondria during aging in tetrahymena pyriformis. The Journal of Cell Biology *20*, 113–129.

Ernst, R. K., Guina, T., and Miller, S. I. (1999). How intracellular bacteria survive: surface modifications that promote resistance to host innate immune responses. J. Infect. Dis. *179 Suppl 2*, S326–30.

Fader, C. M., and Colombo, M. I. (2008). Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. Cell Death Differ *16*, 70–78.

Fader, C. M., Sánchez, D. G., Mestre, M. B., and Colombo, M. I. (2009). TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. BBA - Molecular Cell Research *1793*, 1901–1916.

Fasshauer, D., Sutton, R. B., Brunger, A. T., and Jahn, R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *95*, 15781–15786.

Fällman, M., Deleuil, F., and McGee, K. (2002). Resistance to phagocytosis by Yersinia. Int. J. Med. Microbiol. *291*, 501–509.

Ferber, D. M., and Brubaker, R. R. (1981). Plasmids in Yersinia pestis. INFECTION AND IMMUNITY, *31*, 839–841.

Finegold, M. J. (1969). Pneumonic plague in monkeys. An electron microscopic study. Am. J. Pathol. *54*, 167–185.

Florey, O., Kim, S. E., Sandoval, C. P., Haynes, C. M., and Overholtzer, M. (2011). Autophagy machinery mediates macroendocytic processing and entotic cell death by targeting single membranes. Nature Cell Biology *13*, 1335–1343.

Forman, S., Wulff, C. R., Myers-Morales, T., Cowan, C., Perry, R. D., and Straley, S. C. (2008). yadBC of Yersinia pestis, a New Virulence Determinant for Bubonic Plague. Infection and immunity, *76*, 578–587.

Fratti, R. A., Chua, J., and Deretic, V. (2002). Cellubrevin alterations and Mycobacterium tuberculosis phagosome maturation arrest. J Biol Chem *277*, 17320–17326.

Fredriksson-Ahomaa, M., Stolle, A., and Korkeala, H. (2006). Molecular epidemiology of Yersinia enterocolitica infections. FEMS Immunology & Medical Microbiology *47*, 315–329.

Fujimura, Y., Kihara, T., and Mine, H. (1992). Membranous cells as a portal of Yersinia pseudotuberculosis entry into rabbit ileum. Journal of Clinical Electron Microscopy, 35-45.

Fujita, H., Tuma, P. L., Finnegan, C. M., Locco, L., and Hubbard, A. L. (1998). Endogenous syntaxins 2, 3 and 4 exhibit distinct but overlapping patterns of expression at the hepatocyte plasma membrane. Biochem. J. *329 (Pt 3)*, 527–538.

Fujita, N., Morita, E., Itoh, T., Tanaka, A., Nakaoka, M., Osada, Y., Umemoto, T., Saitoh, T., Nakatogawa, H., Kobayashi, S., et al. (2013). Recruitment of the autophagic machinery to endosomes during infection is mediated by ubiquitin. The Journal of Cell Biology.

Furuta, N., and Amano, A. (2010). Cellular machinery to fuse antimicrobial autophagosome with lysosome. Communicative & Integrative Biology *3*, 385–387.

Furuta, N., Fujita, N., Noda, T., Yoshimori, T., and Amano, A. (2010). Combinational soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor proteins VAMP8 and Vti1b mediate fusion of antimicrobial and canonical autophagosomes with lysosomes. Molecular Biology of the Cell *21*, 1001–1010.

Galimand, M., Carniel, E., and Courvalin, P. (2006). Resistance of Yersinia pestis to antimicrobial agents. Antimicrob. Agents Chemother. *50*, 3233–3236.

Galimand, M., Guiyoule, A., Gerbaud, G., Rasoamanana, B., Chanteau, S., Carniel, E., and Courvalin, P. (1997). Multidrug resistance in Yersinia pestis mediated by a transferable plasmid. N. Engl. J. Med. *337*, 677–680.

Galindo, C. L., Rosenzweig, J. A., Kirtley, M. L., and Chopra, A. K. (2011). Pathogenesis of Y. enterocolitica and Y. pseudotuberculosis in Human Yersiniosis. J Pathog *2011*, 182051.

Gong, L., Cullinane, M., Treerat, P., Ramm, G., Prescott, M., Adler, B., Boyce, J. D., Devenish, R. J., and Chakravortty, D. (2011). The Burkholderia pseudomallei Type III Secretion System and BopA Are Required for Evasion of LC3-Associated Phagocytosis. PLoS ONE *6*, e17852.

Gorvel, J. P., Chavrier, P., Zerial, M., and Gruenberg, J. (1991). rab5 controls early endosome fusion in vitro. Cell *64*, 915–925.

Grabenstein, J. P., Fukuto, H. S., Palmer, L. E., and Bliska, J. B. (2006). Characterization of phagosome trafficking and identification of PhoP-regulated genes important for survival of Yersinia pestis in macrophages. Infection And Immunity, *74*, 3727–3741.

Grabenstein, J. P., Marceau, M., Pujol, C., Simonet, M., and Bliska, J. B. (2004). The response regulator PhoP of Yersinia pseudotuberculosis is important for replication in macrophages and for virulence. Infection And Immunity, *72*, 4973–4984.

Groisman, E. A. (2001). The pleiotropic two-component regulatory system PhoP-PhoQ. Journal of Bacteriology *183*, 1835–1842.

Grosshans BL, Ortiz D, Novick P.(2006) Rabs and their effectors: acheving specificity in membrane traffic. Proc Natl Acad Sci U S A. 103(32):11821-7.

Gutierrez, M. G., Munafó, D. B., Berón, W., and Colombo, M. I. (2004). Rab7 is required for the normal progression of the autophagic pathway in mammalian cells. Journal of Cell Science *117*, 2687–2697.

Gutierrez, M. G., Saka, H. A., Chinen, I., Zoppino, F. C. M., Yoshimori, T., Bocco, J. L., and Colombo, M. I. (2007). Protective role of autophagy against Vibrio cholerae cytolysin, a pore-forming toxin from V. cholerae. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *104*, 1829–1834.

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. (2013). Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. Nature.

Hamon, M. A., Ribet, D., Stavru, F., and Cossart, P. (2012). Listeriolysin O: the Swiss army knife of Listeria. Trends Microbiol. *20*, 360–368.

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. Nature Cell Biology 11, 1433–1437.

He, C., and Klionsky, D. J. (2009). Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. Annu. Rev. Genet. *43*, 67–93.

He, C., Song, H., Yorimitsu, T., Monastyrska, I., Yen, W.-L., Legakis, J. E., and Klionsky, D. J. (2006). Recruitment of Atg9 to the preautophagosomal structure by Atg11 is essential for selective autophagy in budding yeast. The Journal of Cell Biology *175*, 925–935.

Heise, T., and Dersch, P. (2006). Identification of a domain in Yersinia virulence factor YadA that is crucial for extracellular matrix-specific cell adhesion and uptake. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *103*, 3375–3380.

Heesemann, J., Gross, U., and Gruter, L. (1987). Genetic manipulation of virulence of Yersinia enterocolitica. Contrib Microbiol Immunol 9, 312-316.

Ho, Y. H. S., Cai, D. T., Wang, C.-C., Huang, D., and Wong, S. H. (2008). Vesicle-associated membrane protein-8/endobrevin negatively regulates phagocytosis of bacteria in dendritic cells. J. Immunol. *180*, 3148–3157.

Hohl, T. M., Parlati, F., Wimmer, C., Rothman, J. E., Söllner, T. H., and Engelhardt, H. (1998). Arrangement of subunits in 20 S particles consisting of NSF, SNAPs, and SNARE complexes. Molecular Cell *2*, 539–548.

Hoiczyk, E., Roggenkamp, A., Reichenbecher, M., Lupas, A., and Heesemann, J. (2000). Structure and sequence analysis of Yersinia YadA and Moraxella UspAs reveal a novel class of adhesins. EMBO J *19*, 5989–5999.

Hong, W. (2005). SNAREs and traffic. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research *1744*, 120–144.

Hopkins, C. R. (1983). Intracellular routing of transferrin and transferrin receptors in epidermoid carcinoma A431 cells. Cell *35*, 321–330.

Huang, J., Canadien, V., Lam, G. Y., Steinberg, B. E., Dinauer, M. C., Magalhaes, M. A. O., Glogauer, M., Grinstein, S., and Brumell, J. H. (2009). Activation of antibacterial autophagy by NADPH oxidases. Proceedings of the National Academy of Sciences *106*, 6226–6231.

Huett, A., Heath, R. J., Begun, J., Sassi, S. O., Baxt, L. A., Vyas, J. M., Goldberg, M. B., and Xavier, R. J. (2012). The LRR and RING Domain Protein LRSAM1 Is an E3 Ligase Crucial for Ubiquitin-Dependent Autophagy of Intracellular Salmonella Typhimurium. Cell Host and Microbe *12*, 778–790.

Huotari, J., and Helenius, A. (2011). Endosome maturation. EMBO J *30*, 3481–3500.
FEMS Microbiol Lett. 1993 Dec 1;114(2):173-7.

Ibrahim A, Goebel BM, Liesack W, Griffiths M, Stackebrandt E. FEMS Microbiol Lett. 1993 Dec 1;114(2):173-7.FEMS Microbiol Lett. 1993 Dec 1;114(2):173-7.

Iriarte, M., and Cornelis, G. R. (1999). Identification of SycN, YscX, and YscY, three new elements of the Yersinia yop virulon. Journal of Bacteriology *181*, 675–680.

Isberg, R. R., and Leong, J. M. (1990). Multiple beta 1 chain integrins are receptors for invasin, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. Cell *60*, 861–871.

Isberg, R. R., Hamburger, Z., and Dersch, P. (2000). Signaling and invasin-promoted uptake via integrin receptors. Microbes and Infection *2*, 793–801.

Isberg, R. R., Voorhis, D. L., and Falkow, S. (1987). Identification of invasin: a protein that allows enteric bacteria to penetrate cultured mammalian cells. Cell *50*, 769–778.

Itakura, E., and Mizushima, N. (2013). Syntaxin 17: The autophagosomal SNARE. Autophagy *9*.

Itakura, E., Kishi-Itakura, C., and Mizushima, N. (2012). The Hairpin-type Tail-Anchored SNARE Syntaxin 17 Targets to Autophagosomes for Fusion with Endosomes/Lysosomes. Cell *151*, 1256–1269.

Jahn, R., and Scheller, R. H. (2006). SNAREs--engines for membrane fusion. Nat Rev Mol Cell Biol *7*, 631–643.

Jäger, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominami, E., Saftig, P., and Eskelinen, E.-L. (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. Journal of Cell Science *117*, 4837–4848.

Jo, E.-K., Yuk, J.-M., Shin, D.-M., and Sasakawa, C. (2013). Roles of autophagy in elimination of intracellular bacterial pathogens. Front Immunol *4*, 97.

Johansen, T., and Lamark, T. (2011). Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. Autophagy *7*, 279–296.

Joubert, P.-E., Meiffren, G., GrEgoire, I. P., Pontini, G., Richetta, C., Flacher, M., Azocar, O., Vidalain, P.-O., Vidal, M., Lotteau, V., et al. (2009). Autophagy induction by the pathogen receptor CD46. Cell Host and Microbe *6*, 354–366.

Juris, S. J., Rudolph, A. E., Huddler, D., Orth, K., and Dixon, J. E. (2000). A distinctive role for the Yersinia protein kinase: actin binding, kinase activation, and cytoskeleton disruption. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *97*, 9431–9436.

Kabeya, Y., Mizushima, N., Ueno, T., Yamamoto, A., Kirisako, T., Noda, T., Kominami, E., Ohsumi, Y., and Yoshimori, T. (2000). LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. EMBO J *19*, 5720–5728.

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.

Kapperud, G., Namork, E., Skurnik, M., and Nesbakken, T. (1987). Plasmid-mediated surface fibrillae of Yersinia pseudotuberculosis and Yersinia enterocolitica: relationship to the outer membrane protein YOP1 and possible importance for pathogenesis. Infection And Immunity, *55*, 2247–2254.

Kawamura, N., Sun-Wada, G.-H., Aoyama, M., Harada, A., Takasuga, S., Sasaki, T., and Wada, Y. (2012). Delivery of endosomes to lysosomes via microautophagy in the visceral endoderm of mouse embryos. Nat Commun *3*, 1071.

Klionsky, D. J. (2005). The molecular machinery of autophagy: unanswered questions. Journal of Cell Science *118*, 7–18.

Klionsky, D. J., Abdalla, F. C., Abeliovich, H., Abraham, R. T., Acevedo-Arozena, A., Adeli, K., Agholme, L., Agnello, M., Agostinis, P., Aguirre-Ghiso, J. A., et al. (2012). Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. Autophagy *8*, 445–544.

Klionsky, D. J., Baehrecke, E. H., Brumell, J. H., Chu, C. T., Codogno, P., Cuervo, A. M., Debnath, J., Deretic, V., Elazar, Z., Eskelinen, E.-L., et al. (2011). A comprehensive glossary of autophagy-related molecules and processes (2nd edition).

Knapp W Mesenteric adenitis due to Pasteurella pseudotuberculosis in young people. (1958) N Engl J Med. Oct 16;259(16):776-8.

Lam, G. Y., Cemma, M., Muise, A. M., Higgins, D. E., and Brumell, J. H. (2013). Host and bacterial factors that regulate LC3 recruitment to Listeria monocytogenes during the early stages of macrophage infection. Autophagy *9*.

LaRock, C. N., and Cookson, B. T. (2012). The Yersinia virulence effector YopM binds caspase-1 to arrest inflammasome assembly and processing. Cell Host and Microbe *12*, 799–805.

Legakis, J. E., Yen, W.-L., and Klionsky, D. J. (2007). A cycling protein complex required for selective autophagy. Autophagy *3*, 422–432.

Levine, B. (2005). Eating oneself and uninvited guests: autophagy-related pathways in cellular defense. Cell *120*, 159–162.

Levine, B., and Kroemer, G. (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. Cell *132*, 27–42.

Li, L., Kim, E., Yuan, H., Inoki, K., Goraksha-Hicks, P., Schiesher, R. L., Neufeld, T. P., and Guan, K.-L. (2010). Regulation of mTORC1 by the Rab and Arf GTPases. Journal of Biological Chemistry *285*, 19705–19709.

Li, W.-W., Li, J., and Bao, J.-K. (2012). Microautophagy: lesser-known self-eating. Cell. Mol. Life Sci. *69*, 1125–1136.

Lian, C. J., Hwang, W. S., and Pai, C. H. (1987). Plasmid-mediated resistance to phagocytosis in Yersinia enterocolitica. Infection and Immunity, *55*, 1176–1183.

Liang, X.H., Jackson, S., Seaman, M., Brown, K., Kempkes, B., Hibshoosh, H., and Levine, B. (1999). Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. Nature 402, 672-676.

Liang, C., Lee, J.-S., Inn, K.-S., Gack, M. U., Li, Q., Roberts, E. A., Vergne, I., Deretic, V., Feng, P., Akazawa, C., et al. (2008). Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. Nature Cell Biology *10*, 776–787.

Ligeon, L.-A., Temime-Smaali, N., and Lafont, F. (2011). Ubiquitylation and autophagy in the control of bacterial infections and related inflammatory responses. Cellular Microbiology *13*, 1303–1311.

Lilo, S., Zheng, Y., and Bliska, J. B. (2008). Caspase-1 activation in macrophages infected with Yersinia pestis KIM requires the type III secretion system effector YopJ. Infection And Immunity, *76*, 3911–3923.

Lindler, L. E., Klempner, M. S., and Straley, S. C. (1990). Yersinia pestis pH 6 antigen: genetic, biochemical, and virulence characterization of a protein involved in the pathogenesis of bubonic plague. Infection And Immunity, *58*, 2569–2577.

Lipatova, Z., Belogortseva, N., Zhang, X. Q., Kim, J., Taussig, D., and Segev, N. (2012). Regulation of

selective autophagy onset by a Ypt/Rab GTPase module. Proceedings of the National Academy of Sciences *109*, 6981–6986.

Liu, S. T. H., Sharon-Friling, R., Ivanova, P., Milne, S. B., Myers, D. S., Rabinowitz, J. D., Brown, H. A., and Shenk, T. (2011). Synaptic vesicle-like lipidome of human cytomegalovirus virions reveals a role for SNARE machinery in virion egress. Proceedings of the National Academy of Sciences *108*, 12869–12874.

Mallard, F., Tang, B. L., Galli, T., Tenza, D., Saint-Pol, A., Yue, X., Antony, C., Hong, W., Goud, B., and Johannes, L. (2002). Early/recycling endosomes-to-TGN transport involves two SNARE complexes and a Rab6 isoform. The Journal of Cell Biology *156*, 653–664.

Malsam, J., Kreye, S., and Söllner, T. H. (2008). Membrane fusion: SNAREs and regulation. Cell. Mol. Life Sci. *65*, 2814–2832.

Mari, M., Griffith, J., Rieter, E., Krishnappa, L., Klionsky, D. J., and Reggiori, F. (2010). An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. The Journal of Cell Biology *190*, 1005–1022.

Martinez-Arca, S., Rudge, R., Vacca, M., Raposo, G. A., Camonis, J., Gillardeaux, V. R. P., Daviet, L., Formstecher, E., Hamburger, A., Filippini, F., et al. (2011). "A dual mechanism controlling the localization and function of exocytic v-SNAREs." PNAS *100*, 1–6.

Mashima, H., Suzuki, J., Hirayama, T., Yoshikumi, Y., Ohno, H., Ohnishi, H., Yasuda, H., Fujita, T., and Omata, M. (2008). Involvement of vesicle-associated membrane protein 7 in human gastric epithelial cell vacuolation induced by Helicobacter pylori-produced VacA. Infection and immunity, *76*, 2296–2303.

Massey, A. C., Zhang, C., and Cuervo, A. M. (2006). Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. Curr. Top. Dev. Biol. *73*, 205–235.

Matheoud, D., Moradin, N., Bellemare-Pelletier, A., Shio, M. T., Hong, W. J., Olivier, M., Gagnon, É., Desjardins, M., and Descoteaux, A. (2013). Leishmania evades host immunity by inhibiting antigen cross-presentation through direct cleavage of the SNARE VAMP8. Cell Host and Microbe *14*, 15–25.

Mauthe, M., Jacob, A., Freiberger, S., Hentschel, K., Stierhof, Y.-D., Codogno, P., and Proikas-Cezanne, T. (2011). Resveratrol-mediated autophagy requires WIPI-1-regulated LC3 lipidation in the absence of induced phagophore formation. Autophagy *7*, 1448–1461.

Maxfield FR, McGraw TE. (2004).Endocytic recycling. Nat Rev Mol Cell Biol. (2):121-32.

Mayor, S., and Pagano, R. E. (2007). Pathways of clathrin-independent endocytosis. Nat Rev Mol Cell Biol *8*, 603–612.

Mazzolini, J., Herit, F., Bouchet, J., Benmerah, A., Benichou, S., and Niedergang, F. (2010). Inhibition of phagocytosis in HIV-1-infected macrophages relies on Nef-dependent alteration of focal delivery of recycling compartments. Blood *115*, 4226–4236.

McPhee, J. B., Mena, P., Zhang, Y., and Bliska, J. B. (2012). Interleukin-10 Induction Is an Important Virulence Function of the Yersinia pseudotuberculosis Type III Effector YopM. INFECTION AND IMMUNITY, *80*, 2519–2527.

Meijer, A., and Codogno, P. (2004). regulation and role of autophagy in mammalian cells. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 1–18.

Mellman, I. (1996). Endocytosis and molecular sorting. Annu Rev Cell Dev Biol *12*, 575–625.

Mikula, K. M., Kolodziejczyk, R., and Goldman, A. (2012). Yersinia infection tools-characterization of structure and function of adhesins. Front Cell Infect Microbiol *2*, 169.

Miller, V. L., and Falkow, S. (1988). Evidence for two genetic loci in Yersinia enterocolitica that can promote invasion of epithelial cells. Infection and immunity, *56*, 1242–1248.

Miller, V. L., Farmer, J. J., Hill, W. E., and Falkow, S. (1989). The ail locus is found uniquely in Yersinia enterocolitica serotypes commonly associated with disease. INFECTION AND IMMUNITY, *57*, 121–131.

Mills, S. D., and Finlay, B. B.(1998) Isolation and characterization of Salmonella typhimurium and Yersinia pseudotuberculosis-containing phagosomes from infected mouse macrophages: Y. pseudotuberculosis traffics to terminal lysosomes where they are degraded. European Journal of Cell Biology *77*, 35–47.

Mitchener, J. S., Shelburne, J. D., Bradford, W. D., and Hawkins, H. K. (1976). Cellular autophagocytosis induced by deprivation of serum and amino acids in HeLa cells. Am. J. Pathol. *83*, 485–492.

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

Moore, E. R., Mead, D. J., Dooley, C. A., Sager, J., and Hackstadt, T. (2011). The trans-Golgi SNARE syntaxin 6 is recruited to the chlamydial inclusion membrane. Microbiology (Reading, Engl.) *157*, 830–838.

Moreau, K., and Rubinsztein, D. C. (2012). The plasma membrane as a control center for autophagy. Autophagy *8*, 861–863.

Moreau, K., Lacas-Gervais, S., Fujita, N., Sebbane, F., Yoshimori, T., Simonet, M., and Lafont, F. (2010). Autophagosomes can support Yersinia pseudotuberculosis replication in macrophages. Cellular Microbiology *12*, 1108–1123.

Moreau, K., Ravikumar, B., Renna, M., Puri, C., and Rubinsztein, D. C. (2011). Autophagosome Precursor Maturation Requires Homotypic Fusion. Cell *146*, 303–317.

Moreau, K., Renna, M., and Rubinsztein, D. C. (2013). Connections between SNAREs and autophagy. Trends in Biochemical Sciences.

Morelli, G., Song, Y., Mazzoni, C. J., Eppinger, M., Roumagnac, P., Wagner, D. M., Feldkamp, M., Kusecek, B., Vogler, A. J., Li, Y., et al. (2010a). Yersinia pestis genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. Nat. Genet. *42*, 1140–1143.

Morelli, G., Song, Y., Mazzoni, C. J., Eppinger, M., Roumagnac, P., Wagner, D. M., Feldkamp, M., Kusecek, B., Vogler, A. J., Li, Y., et al. (2010b). Yersinia pestis genome sequencing identifies patterns of global phylogenetic diversity. Nat. Genet. *42*, 1140–1143.

Mostowy, S., Sancho-Shimizu, V., Hamon, M., Simeone, R., Brosch, R., Johansen, T., and Cossart, P. (2011). p62 and NDP52 target Intracytosolic Shigella and Listeria to different autophagy pathways. Journal of Biological Chemistry, 1–16.

Muhlinen, von, N., Akutsu, M., Ravenhill, B. J., Foeglein, Á., Bloor, S., Rutherford, T. J., Freund, S. M. V., Komander, D., and Randow, F. (2012). LC3C, Bound Selectively by a Noncanonical LIR Motif in NDP52, Is Required for Antibacterial Autophagy. Molecular Cell *48*, 329–342.

Nair, U., and Klionsky, D. J. (2011). Autophagosome biogenesis requires SNAREs. Autophagy *7*, 1570–1572.

Nair, U., Jotwani, A., Geng, J., Gammoh, N., Richerson, D., Yen, W.-L., Griffith, J., Nag, S., Wang, K., Moss, T., et al. (2011). SNARE Proteins Are Required for Macroautophagy. Cell *146*, 290–302.

Nakagawa, I., Amano, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Yamaguchi, H., Kamimoto, T., Nara, A., Funao, J., Nakata, M., Tsuda, K., et al. (2004). Autophagy defends cells against invading group A Streptococcus. Science *306*, 1037–1040.

Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2009a). Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. Nature *461*, 654–658.

Nishida, Y., Arakawa, S., Fujitani, K., Yamaguchi, H., Mizuta, T., Kanaseki, T., Komatsu, M., Otsu, K., Tsujimoto, Y., and Shimizu, S. (2009b). Discovery of Atg5/Atg7-independent alternative macroautophagy. Nature *461*, 654–658.

Niu, H., Yamaguchi, M., and Rikihisa, Y. (2008). Subversion of cellular autophagy by Anaplasma phagocytophilum. Cellular Microbiology *10*, 593–605.

Nixon, R. A. (2013). The role of autophagy in neurodegenerative disease. Nature Medicine *19*, 983–997.

Noda, T., Fujita, N., and Yoshimori, T. (2008). The Ubi brothers reunited. Autophagy *4*, 540–541.

Noda, T., Kim, J., Huang, W. P., Baba, M., Tokunaga, C., Ohsumi, Y., and Klionsky, D. J. (2000). Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt and autophagy pathways. The Journal of Cell Biology *148*, 465–480.

O'Loughlin, J. L., Spinner, J. L., Minnich, S. A., and Kobayashi, S. D. (2010). Yersinia pestis two-component gene regulatory systems promote survival in human neutrophils. Infection and Immunity, *78*, 773–782.

Ogawa, M. (2005). Escape of Intracellular Shigella from Autophagy. Science *307*, 727–731.

Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Kobayashi, T., Mimuro, H., Fukumatsu, M., Kiga, K., Piao, Z., Ashida, H., Yoshida, M., Kakuta, S., et al. (2011). A Tecpr1-dependent selective autophagy pathway targets bacterial pathogens. Cell Host and Microbe *9*, 376–389.

Orenstein, S. J., and Cuervo, A. M. (2010). Chaperone-mediated autophagy: molecular mechanisms and physiological relevance. Semin. Cell Dev. Biol. *21*, 719–726.

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.

Orvedahl, A., Alexander, D., TallOczy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, D. A., and Levine, B. (2007). HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Beclin 1 autophagy protein. Cell Host and Microbe *1*, 23–35.

Oyston, P. C., Dorrell, N., Williams, K., Li, S. R., Green, M., Titball, R. W., and Wren, B. W. (2000). The response regulator PhoP is important for survival under conditions of macrophage-induced stress

and virulence in Yersinia pestis. Infection and Immunity, *68*, 3419–3425.

Paquette, N., Conlon, J., Sweet, C., Rus, F., Wilson, L., Pereira, A., Rosadini, C. V., Goutagny, N., Weber, A. N. R., Lane, W. S., et al. (2012). Serine/threonine acetylation of TGFβ-activated kinase (TAK1) by Yersinia pestis YopJ inhibits innate immune signaling. Proceedings of the National Academy of Sciences *109*, 12710–12715.

Paumet, F., and Wesolowski, J. (2010). SNARE motif: A common motif used by pathogens to manipulate membrane fusion. virulence *4*, 319–324.

Perrin, A. J., Jiang, X., Birmingham, C. L., So, N. S. Y., and Brumell, J. H. (2004). Recognition of bacteria in the cytosol of Mammalian cells by the ubiquitin system. Curr Biol *14*, 806–811.

Perskvist, N., Roberg, K., Kulyté, A., and Stendahl, O. (2002). Rab5a GTPase regulates fusion between pathogen-containing phagosomes and cytoplasmic organelles in human neutrophils.

Pfeifer, U. (1977). Inhibition by insulin of the physiological autophagic breakdown of cell organelles. Acta Biol Med Ger 36, 1691-1694.

Pierson, D. E., and Falkow, S. (1990). Nonpathogenic isolates of Yersinia enterocolitica do not contain functional inv-homologous sequences. Infection and Immunity, *58*, 1059–1064.

Pocard, T., Le Bivic, A., Galli, T., and Zurzolo, C. (2007). Distinct v-SNAREs regulate direct and indirect apical delivery in polarized epithelial cells. Journal of Cell Science *120*, 3309–3320.

Poteryaev, D., Datta, S., Ackema, K., Zerial, M., and Spang, A. (2010). Identification of the switch in early-to-late endosome transition. Cell *141*, 497–508.

Pryor, P. R., Mullock, B. M., Bright, N. A., Lindsay, M. R., Gray, S. R., Richardson, S. C. W., Stewart, A., James, D. E., Piper, R. C., and Luzio, J. P. (2004). Combinatorial SNARE complexes with VAMP7 or VAMP8 define different late endocytic fusion events. EMBO Rep *5*, 590–595.

Pujol, C., and Bliska, J. (2003). The Ability To Replicate in Macrophages Is Conserved between Yersinia pestis and Yersinia pseudotuberculosis. Infection and Immunity, 5892–5899.

Pujol, C., and Bliska, J. B. (2005). Turning Yersinia pathogenesis outside in: subversion of macrophage function by intracellular yersiniae. Clin. Immunol. *114*, 216–226.

Pujol, C., Grabenstein, J. P., Perry, R. D., and Bliska, J. B. (2005). Replication of Yersinia pestis in interferon gamma-activated macrophages requires ripA, a gene encoded in the pigmentation locus. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *102*, 12909–12914.

Pujol, C., Klein, K. A., Romanov, G. A., Palmer, L. E., Cirota, C., Zhao, Z., and Bliska, J. B. (2009). Yersinia pestis can reside in autophagosomes and avoid xenophagy in murine macrophages by preventing vacuole acidification. Infection and immunity, *77*, 2251–2261.

Queval, C. J., Nicolas, V., and Beau, I. (2011). Role of Src kinases in mobilization of glycosylphosphatidylinositol-anchored decay-accelerating factor by Dr fimbria-positive adhering bacteria. Infection and immunity, *79*, 2519–2534.

Randow, F., and Münz, C. (2012). Autophagy in the regulation of pathogen replication and adaptive immunity. Trends Immunol. *33*, 475–487.

Rao, S. K., Huynh, C., Proux-Gillardeaux, V., Galli, T., and Andrews, N. W. (2004). Identification of SNAREs involved in synaptotagmin VII-regulated lysosomal exocytosis. J Biol Chem *279*, 20471–20479.

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

Rebeil, R., Jarrett, C. O., Driver, J. D., Ernst, R. K., Oyston, P. C. F., and Hinnebusch, B. J. (2013). Induction of the Yersinia pestis PhoP-PhoQ regulatory system in the flea and its role in producing a transmissible infection. Journal of Bacteriology *195*, 1920–1930.

Reggiori, F., Monastyrska, I., Verheije, M. H., Calì, T., Ulasli, M., Bianchi, S., Bernasconi, R., de Haan, C. A. M., and Molinari, M. (2010). Coronaviruses Hijack the LC3-I-positive EDEMosomes, ER-derived vesicles exporting short-lived ERAD regulators, for replication. Cell Host and Microbe *7*, 500–508.

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. Dev. Cell *6*, 79–90.

Renna, M., Schaffner, C., Winslow, A. R., Menzies, F. M., Peden, A. A., Floto, R. A., and Rubinsztein, D. C. (2011). Autophagic substrate clearance requires activity of the syntaxin-5 SNARE complex. Journal of Cell Science *124*, 469–482.

Richetta, C., Grégoire, I. P., Verlhac, P., Azocar, O., Baguet, J., Flacher, M., Tangy, F., Rabourdin-Combe, C., and Faure, M. (2013). Sustained Autophagy Contributes to Measles Virus Infectivity. PLoS Pathog *9*, e1003599.

Rink, J., Ghigo, E., Kalaidzidis, Y., and Zerial, M. (2005). Rab conversion as a mechanism of progression from early to late endosomes. Cell *122*, 735–749.

Romano, P. S., Gutierrez, M. G., Berón, W., Rabinovitch, M., and Colombo, M. I. (2007). The autophagic pathway is actively modulated by phase II Coxiella burnetii to efficiently replicate in the host cell. Cellular Microbiology *9*, 891–909.

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. EMBO J *31*, 4304–4317.

Ronzone, E., and Paumet, F. (2013). Two Coiled-Coil Domains of Chlamydia trachomatis IncA Affect Membrane Fusion Events during Infection. PLoS ONE *8*, e69769.

Rosqvist, R., Forsberg, A., and Wolf-Watz, H. (1991). Intracellular targeting of the Yersinia YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. INFECTION AND IMMUNITY, *59*, 4562–4569.

Saftig, P., and Klumperman, J. (2009). Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. Nat Rev Mol Cell Biol *10*, 623–635.

Sahu, R., Kaushik, S., Clement, C. C., Cannizzo, E. S., Scharf, B., Follenzi, A., Potolicchio, I., Nieves, E., Cuervo, A. M., and Santambrogio, L. (2011). Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes. Dev. Cell *20*, 131–139.

Saltman, L. H., Lu, Y., Zaharias, E. M., and Isberg, R. R. (1996). A region of the Yersinia pseudotuberculosis invasin protein that contributes to high affinity binding to integrin receptors. J Biol Chem *271*, 23438–23444.

Sanjuan, M. A., Dillon, C. P., Tait, S. W. G., Moshiach, S., Dorsey, F., Connell, S., Komatsu, M., Tanaka, K., Cleveland, J. L., Withoff, S., et al. (2007). Toll-like receptor signalling in macrophages links the autophagy pathway to phagocytosis. Nature *450*, 1253–1257.

Sanjuan, M. A., Milasta, S., and Green, D. R. (2009). Toll-like receptor signaling in the lysosomal pathways. Immunol Rev *227*, 203–220.

Sato, T. K., Darsow, T., and Emr, S. D. (1998). Vam7p, a SNAP-25-like molecule, and Vam3p, a syntaxin homolog, function together in yeast vacuolar protein trafficking. Mol. Cell. Biol. *18*, 5308–5319.

Shahnazari, S., and Brumell, J. H. (2011). Mechanisms and consequences of bacterial targeting by the autophagy pathway. Current Opinion in Microbiology *14*, 68–75.

Shahnazari, S., Namolovan, A., Klionsky, D. J., and Brumell, J. H. (2011). A role for diacylglycerol in antibacterial autophagy. Autophagy *7*, 331–333.

Shahnazari, S., Yen, W.-L., Birmingham, C. L., Shiu, J., Namolovan, A., Zheng, Y. T., Nakayama, K., Klionsky, D. J., and Brumell, J. H. (2010). A diacylglycerol-dependent signaling pathway contributes to regulation of antibacterial autophagy. Cell Host and Microbe *8*, 137–146.

Shaid, S., Brandts, C. H., Serve, H., and Dikic, I. (2012). Ubiquitination and selective autophagy. Cell Death Differ *20*, 21–30.

Shimizu, S., Arakawa, S., and Nishida, Y. (2010). Autophagy takes an alternative pathway. Autophagy *6*, 290–291.

Silva, M. T., and Pestana, N. T. S. (2013). The in vivo extracellular life of facultative intracellular bacterial parasites: role in pathogenesis. Immunobiology *218*, 325–337.

Simonet, M., and Falkow, S. (1992). Invasin expression in Yersinia pseudotuberculosis. Infection And Immunity, *60*, 4414–4417.

Simonet, M., Richard, S., and Berche, P. (1990). Electron microscopic evidence for in vivo extracellular localization of Yersinia pseudotuberculosis harboring the pYV plasmid. Infection And Immunity, *58*, 841–845.

Simonet, M., Riot, B., Fortineau, N., and Berche, P. (1996). Invasin production by Yersinia pestis is abolished by insertion of an IS200-like element within the inv gene. Infection And Immunity, *64*, 375–379.

Skurnik, M., and Toivanen, P. (1992). LcrF is the temperature-regulated activator of the yadA gene of Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis. Journal of Bacteriology *174*, 2047–2051.

Smego, R. A., Frean, J., and Koornhof, H. J. (1999). Yersiniosis I: microbiological and clinicoepidemiological aspects of plague and non-plague Yersinia infections. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. *18*, 1–15.

smith, A. C., Cirulis, J. T., Casanova, J. E., Scidmore, M. A., and Brumell, J. H. (2005). Interaction of the Salmonella-containing vacuole with the endocytic recycling system. J Biol Chem *280*, 24634–24641.

Sorg, J. A., Blaylock, B., and Schneewind, O. (2006). Secretion signal recognition by YscN, the Yersinia type III secretion ATPase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. *103*, 16490–16495.

Söllner, T., Bennett, M. K., Whiteheart, S. W., Scheller, R. H., and Rothman, J. E. (1993a). A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation, and fusion. Cell *75*, 409–418.

Söllner, T., Whiteheart, S. W., Brunner, M., Erdjument-Bromage, H., Geromanos, S., Tempst, P., and

Rothman, J. E. (1993b). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. Nature *362*, 318–324.

Starr, T., Child, R., Wehrly, T. D., Hansen, B., Hwang, S., López-Otin, C., Virgin, H. W., and Celli, J. (2012). Selective subversion of autophagy complexes facilitates completion of the Brucella intracellular cycle. Cell Host and Microbe *11*, 33–45.

Steele, S., Brunton, J., Ziehr, B., Taft-Benz, S., Moorman, N., and Kawula, T. (2013). Francisella tularensis Harvests Nutrients Derived via ATG5-Independent Autophagy to Support Intracellular Growth. PLoS Pathog *9*, e1003562.

Stein, M.-P., Müller, M. P., and Wandinger-Ness, A. (2012). Bacterial Pathogens Commandeer Rab GTPases to Establish Intracellular Niches. Traffic.

Stow, J. L., Manderson, A. P., and Murray, R. Z. (2006). SNAREing immunity: the role of SNAREs in the immune system. Nat Rev Immunol *6*, 919–929.

Straley, S. C., and Harmon, P. A. (1984). Yersinia pestis grows within phagolysosomes in mouse peritoneal macrophages. Infection And Immunity, *45*, 655–659.

Su, W.-C., Chao, T.-C., Huang, Y.-L., Weng, S.-C., Jeng, K.-S., and Lai, M. M. C. (2011). Rab5 and class III phosphoinositide 3-kinase Vps34 are involved in hepatitis C virus NS4B-induced autophagy. J. Virol. *85*, 10561–10571.

Sun, W., Yan, Q., Vida, T. A., and Bean, A. J. (2003). Hrs regulates early endosome fusion by inhibiting formation of an endosomal SNARE complex. The Journal of Cell Biology *162*, 125–137.

Suzuki, K. (2013). Selective autophagy in budding yeast. Cell Death Differ *20*, 43–48.

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.

Tai, G., Lu, L., Wang, T.L., Tang, B.L., Goud, B., Johannes, L., and Hong, W. (2004). Participation of the syntaxin 5/Ykt6/GS28/GS15 SNARE complex in transport from the early/recycling endosome to the trans-Golgi network. Mol Biol Cell 15, 4011-4022.

Tahir, El, Y., and Skurnik, M. (2001). YadA, the multifaceted Yersinia adhesin. Int. J. Med. Microbiol. *291*, 209–218.

Takats, S., Nagy, P., Varga, A., Pircs, K., Karpati, M., Varga, K., Kovacs, A. L., Hegedus, K., and Juhasz, G. (2013). Autophagosomal Syntaxin17-dependent lysosomal degradation maintains neuronal function in Drosophila. The Journal of Cell Biology *201*, 531–539.

Takeshige, 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.

Tanaka, Y., Guhde, G., Suter, A., ESKELINEN, E.-L., Hartmann, D., Lüllmann-Rauch, R., Janssen, P. M., Blanz, J., Figura, von, K., and Saftig, P. (2000). Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. Nature *406*, 902–906.

Terebiznik, M. R., Raju, D., Vázquez, C. L., Torbricki, K., Kulkarni, R., Blanke, S. R., Yoshimori, T., Colombo, M. I., and Jones, N. L. (2009). Effect of Helicobacter pylori's vacuolating cytotoxin on the autophagy pathway in gastric epithelial cells. Autophagy *5*, 370–379.

Thurston, T. L. M., Ryzhakov, G., Bloor, S., Muhlinen, N. V., and Randow, F. (2009). The TBK1

adaptor and autophagy receptor NDP52 restricts the proliferation of ubiquitin-coated bacteria. Nat Immunol *10*, 1215–1221.

Thurston, T. L. M., Wandel, M. P., Muhlinen, von, N., Foeglein, Á., and Randow, F. (2012). Galectin 8 targets damaged vesicles for autophagy to defend cells against bacterial invasion. Nature *482*, 414–418

Tran Van Nhieu, G., and Isberg, R.R. (1993). Bacterial internalization mediated by beta 1 chain integrins is determined by ligand affinity and receptor density. EMBO J 12, 1887-189

Une, T. (1977). Studies on the pathogenicity of Yersinia enterocolitica. II. Interaction with cultured cells in vitro. Microbiol Immunol 21, 365-377.

Van Noyen R, Selderslaghs R, Bekaert J, Wauters G, Vandepitte J (1991). Causative role of Yersinia and other enteric pathogens in the appendicular syndrome Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Sep;10(9):735-41.

Vázquez, C. L., and Colombo, M. I. (2010). Coxiella burnetii modulates Beclin 1 and Bcl-2, preventing host cell apoptosis to generate a persistent bacterial infection. Cell Death Differ *17*, 421–438.

Veiga, E., and Cossart, P. (2005). Ubiquitination of intracellular bacteria: a new bacteria-sensing system? Trends in Cell Biology *15*, 2–5.

Viboud, G. I., and Bliska, J. B. (2005). Yersinia outer proteins: role in modulation of host cell signaling responses and pathogenesis. Annu. Rev. Microbiol. *59*, 69–89.

Wachtel, M. R., and Miller, V. L. (1995). In vitro and in vivo characterization of an ail mutant of Yersinia enterocolitica. INFECTION AND IMMUNITY, *63*, 2541–2548.

Wang, C.-W., and Klionsky, D. J. (2003). The molecular mechanism of autophagy. Mol. Med. *9*, 65–76.

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

Wild, P., Farhan, H., Mcewan, D. G., Wagner, S., Rogov, V. V., Brady, N. R., Richter, B., Korac, J., Waidmann, O., Choudhary, C., et al. (2011). Phosphorylation of the autophagy receptor optineurin restricts Salmonella growth. Science *333*, 228–233.

Williamson, E. D., and Oyston, P. C. F. (2012). The natural history and incidence of Yersinia pestis and prospects for vaccination. J. Med. Microbiol. *61*, 911–918.

Wong, K.-W., and Isberg, R. R. (2005). Emerging views on integrin signaling via Rac1 during invasin-promoted bacterial uptake. Current Opinion in Microbiology *8*, 4–9.

Wren, B. W. (2003). The yersiniae--a model genus to study the rapid evolution of bacterial pathogens. Nat. Rev. Microbiol. *1*, 55–64.

Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., and Tashiro, Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuoles by inhibiting fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hepatoma cell line, H-4-II-E cells. Cell Struct. Funct. *23*, 33–42.

Yamamoto, 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.

Yamamoto, T., Hanawa, T., Ogata, S., and Kamiya, S. (1996). Identification and characterization of the Yersinia enterocolitica gsrA gene, which protectively responds to intracellular stress induced by macrophage phagocytosis and to extracellular environmental stress. INFECTION AND IMMUNITY, *64*, 2980–2987.

Yamashita, S., Lukacik, P., Barnard, T. J., Noinaj, N., Felek, S., Tsang, T. M., Krukonis, E. S., Hinnebusch, B. J., and Buchanan, S. K. (2011). Structural insights into Ail-mediated adhesion in Yersinia pestis. Structure *19*, 1672–1682.

Yang, Y., and Isberg, R. R. (1993). Cellular internalization in the absence of invasin expression is promoted by the Yersinia pseudotuberculosis yadA product. Infection and Immunity, *61*, 3907–3913.

Yang, Y., Merriam, J. J., Mueller, J. P., and Isberg, R. R. (1996). The psa locus is responsible for thermoinducible binding of Yersinia pseudotuberculosis to cultured cells. Infection and Immunity, *64*, 2483–2489.

Yang, Z., and Klionsky, D. J. (2010). Eaten alive: a history of macroautophagy. Nature Cell Biology *12*, 814–822.

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.

Yoshikawa, Y., Ogawa, M., Hain, T., Yoshida, M., Fukumatsu, M., Kim, M., Mimuro, H., Nakagawa, I., Yanagawa, T., Ishii, T., et al. (2009). Listeria monocytogenes ActA-mediated escape from autophagic recognition. Nature Cell Biology *11*, 1233–1240.

Zerial, M., and McBride, H. (2001). Rab proteins as membrane organizers. Nat Rev Mol Cell Biol *2*, 107–117.

Zheng, Y. T., Shahnazari, S., Brech, A., Lamark, T., Johansen, T., and Brumell, J. H. (2009). The Adaptor Protein p62/SQSTM1 Targets Invading Bacteria to the Autophagy Pathway. The Journal of Immunology *183*, 5909–5916.

Zheng, Y., Lilo, S., Mena, P., and Bliska, J. B. (2012). YopJ-induced caspase-1 activation in Yersinia-infected macrophages: independent of apoptosis, linked to necrosis, dispensable for innate host defense. PLoS ONE *7*, e36019.