



## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Etude de l'interrelation entre l'apoptose et l'autophagie dans le cadre de la mort cellulaire induite par la staurosporine dans des cellules cybrides portant la mutation mitochondriale MERRF

Michaux, Alexandre

*Award date:*  
2009

*Awarding institution:*  
Universite de Namur

[Link to publication](#)

#### General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

#### Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



FACULTES UNIVERSITAIRES NOTRE-DAME DE LA PAIX  
NAMUR

**Faculté des Sciences**

**Etude de l'interrelation entre l'apoptose et l'autophagie dans le cadre de la mort cellulaire induite par la staurosporine dans des cellules cybrides portant la mutation mitochondriale MERRF**

**Mémoire présenté pour l'obtention  
du grade académique de master en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Alexandre MICHAUX

Janvier 2009

**Facultés Universitaires Notre-Dame de la Paix**  
**FACULTE DES SCIENCES**  
Secrétariat du département de biologie  
Rue de Bruxelles 61 – 5000 Namur  
Téléphone : + 32(0)81.72.44 – Téléfax= + 32(0)81.72.44.20  
E-mail : joelle.jonet@fundp.ac.be - <http://www.fundp.ac.be.html>

**Etude de l'interrelation entre l'apoptose et l'autophagie dans le cadre de la mort cellulaire induite par la staurosporine dans des cellules cybrides portant la mutation mitochondriale MERRF**

Michaux Alexandre

Résumé

Le dysfonctionnement mitochondrial est associé à ou responsable de nombreuses pathologies neurodégénératives et neuromusculaires. Il est maintenant reconnu que l'apoptose joue un rôle très important dans les manifestations cliniques liées aux maladies mitochondriales humaines. Récemment, plusieurs études ont également montré que l'autophagie pourrait également jouer un rôle dans la mort de cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial induite par des molécules pro-apoptotiques. Cependant, les mécanismes qui régulent la réponse autophagique dans ces conditions et l'effet de l'autophagie sur la survie ou la mort des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial sont encore peu connus. Cette étude visait à mieux caractériser l'autophagie induite par un agent pro-apoptotique comme la staurosporine dans la mort de cellules cybrides sauvages ou portant la mutation A8344G à l'état homoplasmique dans le gène codant pour l'ARNt<sup>Lys</sup> du génome mitochondrial. Dans cette étude, nous montrons que la staurosporine induit l'autophagie dans les deux lignées cellulaires. De plus, nous observons que la réponse autophagique est corrélée à une activation de l'AMPK et à une diminution de la voie dépendante de mTOR. Enfin, nous montrons que si la protéine p53 n'est probablement pas impliquée dans la réponse, les cellules cybrides sauvages pourraient être plus résistantes que les cellules cybrides mutées à l'apoptose induite en raison d'une plus forte activation de la Ser/Thr kinase Akt/PKB observée dans ces cellules en réponse à une stimulation par la staurosporine. Enfin, des résultats intéressants mais préliminaires nous permettent de penser que, dans les cellules cybrides mutées, l'autophagie pourrait exercer un léger effet protecteur dans la mort cellulaire induite par la STS. En effet, une inhibition de l'autophagie par la 3-méthyladénine dans les cellules stimulées par la staurosporine conduit, spécifiquement dans ces cellules, à une fragmentation de l'ADN génomique plus importante que celle observée en réponse à une incubation en présence de l'alcaloïde seul.

Mémoire de master en biochimie et biologie cellulaire et moléculaire

Janvier 2009

**Promoteur** : T. Arnould

**Co-promoteur : P. Renard**

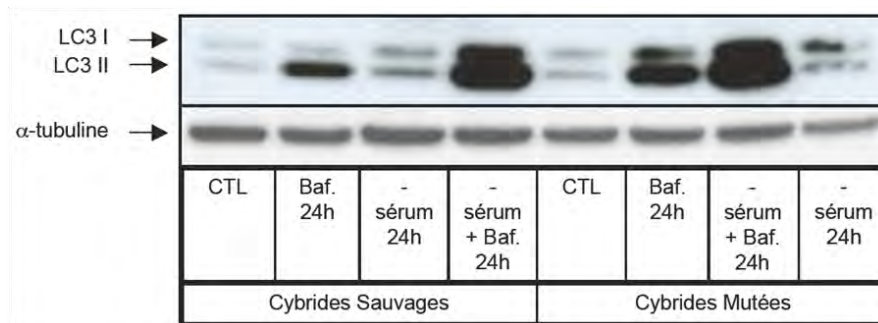
## Errata

Etude de l'interrelation entre l'apoptose et l'autophagie dans le cadre de la mort cellulaire induite par la staurosporine dans des cellules cybrides portant la mutation mitochondriale MERRF

Veillez trouver ci-dessous la liste des erreurs relevées dans ce mémoire

- Au verso de la page 41, à la figure 3.2.A. veuillez lire dans la légende de la septième piste du western blot : « - sérum + Baf. 24 h », à la place de « - sérum 24 h ».
- Au verso de la page 41, à la figure 3.2.A. veuillez lire dans la légende de la huitième piste du western blot : « - sérum 24 h », à la place de « -sérum + Baf. 24 h ».

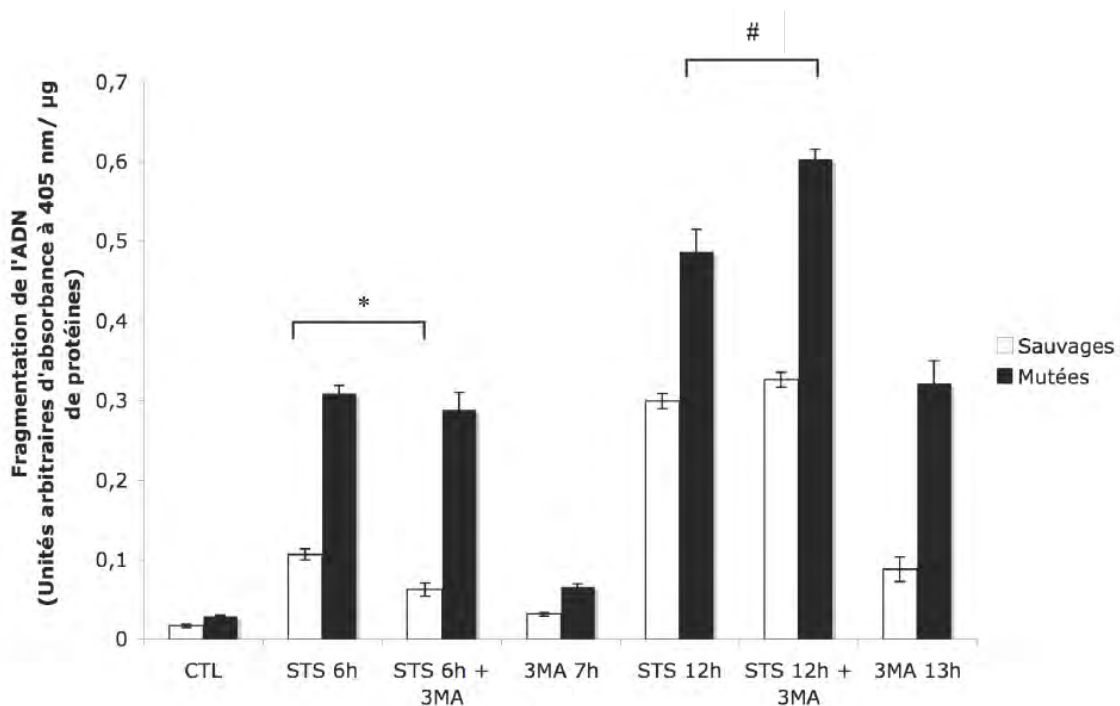
A.



**Figure 3.2 : Caractérisation de l'autophagie par la détection de la protéine LC3.**

(A) Analyse par Western Blotting de l'abondance de la protéine autophagosomale LC3 I et LC3 II dans des lysats totaux préparés à partir de cellules incubées dans des conditions connues pour stimuler l'autophagie. Les cellules cybrides sauvages et mutées ont été incubées en présence (CTL) ou en absence de sérum (- sérum) pendant 24 heures ou mises en présence de bafilomycine A1 (Baf.) à 100 nM pendant 24 h. Dans certaines conditions, l'absence de sérum est combinée à la bafilomycine pour stimuler au maximum la réponse autophagique (- sérum + Baf.). Au terme des incubations, des lysats totaux sont préparés et l'abondance des formes LC3 I et LC3 II est détectée par Western Blotting réalisé sur 20 µg de protéines grâce à un anticorps monoclonal de souris anti-LC3. La détection des protéines d'intérêt est révélée en chémoluminescence (ECL). Les photons émis impriment des films radiographiques qui ont ensuite été développés, fixés et séchés puis scannés. La charge protéique est vérifiée par l'immunodétection de l'α-tubuline.

- Au verso de la page 56, veuillez lire : « Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance normalisées par la quantité de protéines et représentent la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour  $n=3$ . \* : statistiquement significativement différent des cellules cybrides sauvages avec  $p<0,05$  comme déterminé par un test t-de Student. # : statistiquement significativement différent des cellules cybrides mutées avec  $p<0,05$  comme déterminé par un test t-de Student. Les cellules contrôles (CTL) sont constituées de cellules incubées en absence de STS pendant 7 heures. » à la place de « Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance normalisées par la quantité de protéines et représentent la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour  $n=3$ . \* : statistiquement significativement différent des cellules cybrides sauvages avec  $p<0,05$  comme déterminé par un test t-de Student. Les cellules contrôles (CTL) sont constituées de cellules incubées en absence de STS pendant 7 heures. »



**Figure 3.16 : Effet du 3-méthyladénine sur la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine durant 6 et 12 h.**

Test de fragmentation d'ADN. Les cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) ont été pré-incubées en présence ou en absence de 3 méthyladénine à 10 mM durant 1 heure. Ensuite la staurosporine a été ajoutée (STS + 3-MA) ou non (3-MA 7h et 13h) à la concentration de 500 nM durant 6 heures ou 12 heures avant de mesurer la fragmentation d'ADN à l'aide d'un kit de détection de type ELISA (voir matériel et méthodes). Le principe du test repose sur la détection des petits fragments d'ADN dans les échantillons par des anticorps dirigés contre les histones dont l'abondance est révélée en présence d'anticorps conjugués à la HRP dans une réaction colorimétrique conduisant à la formation d'un chromogène. L'absorbance du produit de la réaction est alors mesurée au spectrophotomètre à 605 nm. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance normalisées par la quantité de protéines et représentent la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour  $n=3$ . \* : statistiquement significativement différent des cellules cybrides sauvages avec  $p<0,05$  comme déterminé par un test t-de Student. # : statistiquement significativement différent des cellules cybrides mutées avec  $p<0,05$  comme déterminé par un test t-de Student. Les cellules contrôles (CTL) sont constituées de cellules incubées en absence de STS pendant 7 heures.

- Au verso de la page 52, à la figure 3.13. veuillez lire dans la légende de la treizième piste du western blot : « STS 2 h », à la place de « TS 2 h ».



## Liste des abréviations

3-MA	3-méthyladénine
ADNmt	ADN mitochondrial
AICAR	5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside
AIF	Apoptosis-Inducing Factor
Akt/PKB	Akt/Protéine Kinase B
AMPK	AMP-activated Kinase
ANT	Adénine Nucléotide Translocase
Apaf-1	Apoptosis Protease Activating Factor
ARNm	ARN messenger
ARNr	ARN ribosomiale
ARNt	ARN de transfert
Bcl-2	B-Cell Lymphoma-2
BH	Bcl-2-Homology
BSA	Bovine Serum Albumine
CaMKK $\beta$	Calmoduline Kinase $\beta$
CARD	Caspase Activation and Recruitment Domain
CoQ	Coenzyme Q10
CPEO	Chronic Progressive External Ophthalmopelia
CREB	cAMP Response Element Binding
Cyp D	Cyclophilin D
Cyt c	Cytochrome c
DED	Death Effector Domain
DHG	Dulbecco modified eagle's Medium-High Glucose
DISC	Death Induced Signaling Complex
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Medium
DRAM	Damage- Regulated Autophagy Modulator
Drp1	Dynamin-related protein 1
ETC	Electron Transport Chain
FADD	Fas-Associated Death Domain
FAD	Flavine Adénine Dinucléotide
GAP	GTPase Activating Protein
GFP	Green Fluorescence Protein
GPx	Gluthatione Peroxydase
HAT	Histones Acétyltransférase
HRP	Horse Raddish Peroxidase
KSS	Kearnes-Sayres syndrome
LC3	microtubule-associated protein Light Chain 3
MDR	Multi Drug Resistance
MELAS	Myopathy Encephalopathy Lactic Acidosis and Stroke-like episodes
MERRF	Myoclonic Epilepsy associated with Ragged Red Fibers
Mfn1, 2	Mitofusines 1, 2



MME	Membrane Mitochondriale Externe
MMI	Membrane Mitochondriale Interne
MOMP	Mitochondrial Outer Membrane Permeabilisation
mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1, 2	mammalian Target Of Rapamycin Complex 1, 2
NADH	Nicotinamide Adénine Dinucléotide
NARP	Neurogenic muscle weakness, Ataxia, and Retinus Pigmentosa
NFκB	Nuclear Factor kappa B
PARP	Poly (ADP-Ribose) Polymérase
PBS	Phosphate Buffer Saline
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase de classe III
PIB	Phosphatase Inhibitor Buffer
PIC	Protéase Inhibitor Cocktail
PKC	Protéine Kinase C
PtdIns3P	Phosphatidylinositol-3-Phosphate
PTP	Permeability Transition Pore
ROS	Reactive Oxygen Species
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
SOD	SuperOxyde Dismutase
STS	Staurosporine
SVF	Sérum de Veau Fœtal
TIM	Translocase of Inner Membrane
TNF	Tumor Necrosis Factor
TNFR I, II	Tumor Necrosis Factor Receptor I, II
TOM	Translocase of Outer Membrane
TOR	Target Of Rapamycin
TRAIL	TNF-Related Apoptosis-Inducing Ligand
UVRAG	UV irradiation Resistance-Associated tumour suppressor Gene
VDAC	Volage-Dependent Anion Chanel

# Table des matières

<b>1</b>	<b>Introduction</b>	<b>4</b>
<b>1.1</b>	<b>La mitochondrie</b>	<b>4</b>
1.1.1	Origine et structure des mitochondries	4
1.1.2	Fonctions des mitochondries	5
1.1.2.1	La production d'énergie par la phosphorylation oxydative	6
1.1.2.2	La mitochondrie et les dérivés réactionnels de l'oxygène (ROS)	6
1.1.2.3	La mitochondrie et l'homéostasie du calcium	7
<b>1.2</b>	<b>Le dysfonctionnement mitochondrial</b>	<b>8</b>
1.2.1	Les pathologies mitochondriales	8
1.2.2	Le syndrome MERRF (Myoclonic Epilepsy associated with Ragged Red Fibers)	10
1.2.3	Les cellules cybrides portant la mutation mitochondriale MERRF (A8344G)	11
<b>1.3</b>	<b>Le dysfonctionnement mitochondrial et l'apoptose</b>	<b>11</b>
1.3.1	L'apoptose	11
1.3.1.1	Les caspases	12
1.3.1.2	La voie intrinsèque de l'apoptose	13
1.3.1.3	La voie extrinsèque de l'apoptose	14
1.3.2	Controverse sur la sensibilité différentiel à l'apoptose des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial	15
1.3.3	L'apoptose induite par la staurosporine	16
<b>1.4</b>	<b>Le dysfonctionnement mitochondrial et l'autophagie</b>	<b>16</b>
1.4.1	L'autophagie	17
1.4.2	Le paradoxe de l'autophagie : mécanisme de survie ou de mort cellulaire	17
1.4.2.1	L'autophagie et la survie cellulaire	17
1.4.2.2	L'autophagie ou mort cellulaire de type II	18
1.4.3	Mécanismes moléculaires de l'autophagie	19
1.4.3.1	Induction de l'autophagie	19
1.4.3.2	Régulation de l'autophagie	19
<b>1.5</b>	<b>Voies effectrices et régulateurs moléculaires communs à l'apoptose et à l'autophagie</b>	<b>21</b>
1.5.1	Connexions moléculaires entre l'apoptose et l'autophagie	21
1.5.1.1	La famille des protéines BH-3 only	21
1.5.1.2	La protéine autophagique ATG5	21
1.5.1.3	Stress oxydatif et concentration calcique	22
1.5.2	Voies régulatrices partagées par l'apoptose et l'autophagie	23
1.5.2.1	La voie des PI3K / Akt/PKB cible la voie de mTOR	23
1.5.2.2	La voie de l'AMPK	24
1.5.2.3	La protéine p53	25
1.5.2.4	La dynamique mitochondriale	26
<b>1.6</b>	<b>Contexte de la recherche et objectifs du mémoire</b>	<b>26</b>
1.6.1	Contexte	26
1.6.2	Objectifs du mémoire	27

<b>2</b>	<b>Matériel et méthodes</b>	<b>28</b>
<b>2.1</b>	<b>La culture cellulaire</b>	<b>28</b>
2.1.1	Modèle cellulaire utilisé	28
2.1.2	Maintien des cultures et repiquages cellulaires	28
<b>2.2</b>	<b>Le modèle d'apoptose induite par la staurosporine</b>	<b>28</b>
<b>2.3</b>	<b>Dosage de protéines par la méthode de Bradford</b>	<b>29</b>
<b>2.4</b>	<b>Dosage de l'activité de la caspase-3</b>	<b>29</b>
2.4.1	Principe	29
2.4.2	Réactifs :	29
2.4.3	Méthode :	30
2.4.3.1	Lyse cellulaire	30
2.4.3.2	Dosage	30
<b>2.5</b>	<b>Microscopie électronique à transmission (MET)</b>	<b>30</b>
2.5.1	Méthode :	30
<b>2.6</b>	<b>Préparation de lysats protéiques totaux</b>	<b>31</b>
2.6.1	Réactifs	31
2.6.2	Méthode :	31
<b>2.7</b>	<b>Fractionnement cellulaire et préparation des lysats</b>	<b>31</b>
2.7.1	Matériel :	32
2.7.2	Méthode	32
<b>2.8</b>	<b>Western blotting</b>	<b>32</b>
2.8.1	Principe	32
2.8.2	Préparation des échantillons protéiques	33
2.8.3	Migration	33
2.8.3.1	Les gels Nu Page (polyacrylamide gel electrophoresis)	33
2.8.3.2	Les gels Tris-Glycine	33
2.8.4	Transfert des protéines sur la membrane de PVDF	34
2.8.4.1	Matériel pour les gels Nu Page :	34
2.8.4.2	Matériel pour gel Tris-Glycine:	34
2.8.4.3	Méthode :	34
2.8.5	Blocage de la membrane et révélation	35
2.8.5.1	Matériel :	35
2.8.5.2	Méthode :	35
<b>2.9</b>	<b>Marquage en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale</b>	<b>35</b>
2.9.1	Matériel :	35
2.9.2	Marquage :	36
<b>2.10</b>	<b>Marquage des mitochondries et des lysosomes à l'aide de sonde fluorescentes et visualisation en microscopie confocale</b>	<b>36</b>
2.10.1	Matériel :	36
2.10.2	Méthode :	36
<b>2.11</b>	<b>Méthode de transfection cellulaire et surexpression de LC3-GFP</b>	<b>37</b>
2.11.1	Principe	37
2.11.2	Méthode :	37
<b>2.12</b>	<b>Méthode de transfection cellulaire et système rapporteur pour l'activité de p53</b>	<b>38</b>

2.12.1	Principe	38
2.12.2	Matériel :	38
2.12.3	Méthode :	38
<b>2.13</b>	<b>Dosage de la fragmentation d'ADN induite par la staurosporine</b>	<b>39</b>
2.13.1	Principe	39
2.13.2	Méthode :	39

### **3 Résultats et discussions 41**

#### **3.1 Étude de l'effet du 3-MA, un inhibiteur de l'autophagie sur l'activation de la caspase-3 induite par la staurosporine 41**

#### **3.2 Caractérisation et validation de marqueurs autophagiques dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées en absence de sérum ou en présence de bafilomycine A<sub>1</sub>. 42**

3.2.1	Caractérisation et validation de marqueurs autophagiques dans des cellules répondant à une privation de sérum ou à la bafilomycine A <sub>1</sub> .	42
3.2.2	Caractérisation des effets de la staurosporine sur l'accumulation de LC3-II dans des cellules cybrides sauvages et mutées	44
3.2.3	Mise en évidence de vacuoles autophagiques dans des cellules sauvages et mutées incubées avec la bafilomycine <sub>A1</sub> en absence de sérum ou traitées par la staurosporine	44
3.2.4	Étude de la cinétique d'accumulation de la protéine LC3-II au cours du temps dans des cellules sauvages et mutées (MERRF) en présence de staurosporine	46
3.2.5	Mise en évidence du processus de mitophagie dans des cellules cybrides sauvages et mutées répondant à des inducteurs de l'autophagie : recherche de la co-localisation de mitochondries et de lysosomes suite aux marquages des organites par les sondes Mitotracker Green et LysoTracker Red	47

#### **3.3 Effets de la STS sur l'activité de certains acteurs moléculaires impliqués dans les réponses apoptotiques et autophagiques induites dans des cellules cybrides sauvages et mutées 49**

3.3.1	Étude de l'état d'activité de mTOR dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées en présence de staurosporine ou en absence de sérum par l'analyse de la phosphorylation de son substrat : la protéine kinase p70S6 (p70S6K)	49
3.3.2	Étude de l'état d'activité de l'AMPK dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées en présence de staurosporine ou en absence de sérum par la recherche de la forme phosphorylée (Thr172)	51
3.3.3	Effets de la staurosporine sur l'activation d'Akt/PKB dans des cellules cybrides sauvages et mutées	52
3.3.4	Effet de la staurosporine sur l'abondance et l'activité du facteur de transcription p53 dans des cellules cybrides sauvages et mutées	54
3.3.4.1	Analyse de l'abondance de p53 dans des fractions cellulaires nucléaires, mitochondriales et cytosoliques en réponse à la STS dans des cellules cybrides sauvages et mutées	54
3.3.4.2	Étude de l'activité du facteur de transcription p53 dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées en présence de STS	55

#### **3.4 Étude préliminaire et tentative de mise en évidence d'une relation éventuelle entre l'apoptose et l'autophagie dans des cellules cybrides sauvages et mutées MERRF incubées en présence de staurosporine 56**

3.4.1	Recherche d'un effet éventuel du 3-MA sur la fragmentation de l'ADN génomique induite par la STS dans des cellules cybrides sauvages et mutées	57
-------	--	----

### **4 Conclusion et perspectives 59**

### **5 Bibliographie 66**

# 1 Introduction

## 1.1 La mitochondrie

### 1.1.1 Origine et structure des mitochondries

D'un point de vue évolutif, la mitochondrie semble être apparue il y a environ 1,5 milliards d'années à partir d'une interrelation symbiotique entre une cellule pro-eucaryote et la bactérie oxydative : *Rickettsia prowazeki* qui lui a donné naissance (Andersson *et al.*, 1998). Les mitochondries modernes ont en effet gardé un certain nombre de caractéristiques de cette origine endosymbiotique comme une double membrane lipidique et un génome circulaire possédant ses propres systèmes de transcription, de traduction et d'assemblage protéique (Wallace, 1999).

Cependant, les mitochondries ont également évolué afin de s'adapter à leur « niche intracellulaire ». Afin d'augmenter leur taux de réplication, assurant une bonne transmission aux cellules filles lors de la mitose, le génome mitochondrial a dû, par exemple se réduire pour atteindre une taille d'environ 16500 paires de bases chez l'homme. Ceci a été permis par une délétion progressive au cours de l'évolution des gènes non-essentiels à la mitochondrie et le transfert d'un grand nombre de gènes essentiels vers le génome nucléaire (Andersson *et al.*, 1998). De ce fait, chez les mammifères, le génome mitochondrial moderne, ne contient plus que 37 gènes et seulement 13 d'entre eux codent pour des polypeptides participant à la formation des complexes impliqués dans les phosphorylations oxydatives (OXPHOS). L'ADN mitochondrial (ADNmt) code également pour 22 ARN de transfert (ARNt) et deux ARN ribosomiaux (ARNr) permettant la traduction des 13 polypeptides mitochondriaux (Schapira, 2006).

D'un point de vue structural, la mitochondrie possède quatre compartiments bien définis : une membrane mitochondriale interne (MMI), une membrane mitochondriale externe (MME), un espace inter-membranaire délimité par ces deux membranes et une matrice entourée par la membrane interne (Figure 1.1).

Cependant, la mitochondrie est composée d'environ 1500 protéines. Elle a donc dû mettre au point un système capable d'importer l'ensemble des protéines nécessaires à son fonctionnement. La plupart des gènes codant pour des protéines mitochondriales sont aujourd'hui transcrits en ARNm dans le noyau et traduits en protéines par les ribosomes dans le cytosol. Ces dernières sont ensuite importées sélectivement vers la mitochondrie. En effet, la mitochondrie a mis au point des systèmes complexes (TOM, translocase of outer membrane et TIM, translocase of inner membrane) lui permettant d'importer des protéines codées par des gènes nucléaires (Schatz, 1996). Par exemple pour les protéines matricielles, ces protéines contiennent une pré-séquence d'adressage non conservée en N-terminale (hélice- $\alpha$  amphiphile chargée positivement riche en acides aminés basiques) qui est reconnue par des récepteurs de la membrane mitochondriale externe (MME). Ces récepteurs et le pore TOM 40 sont capables de dérouler et permettent d'importer des protéines codées par le génome nucléaire avant leur assemblage dans un compartiment mitochondrial approprié (Schapira, 2006).

Pour le génome mitochondrial, il est important de noter qu'il existe, en fonction du type cellulaire considéré, de quelques dizaines à plusieurs milliers de molécules d'ADNmt par cellule (2 à 10 copies par mitochondrie) dont la plupart sont identiques (homoplasmie). Cependant, des mutations dans l'ADNmt peuvent apparaître et s'accumuler avec l'âge, ce qui pourrait jouer un rôle notamment dans la sénescence (Wallace, 1999). Les principales causes

de ces mutations sont 1) la proximité de l'ADNmt avec des dérivés réactionnels de l'oxygène (reactive oxygen species, ROS) engendrés par la chaîne de transport d'électrons mitochondrial (electron transport chain, ETC), 2) la présence de systèmes de réparation de l'ADN mitochondrial moins efficaces et 3) l'absence de protéines histones associées à l'ADNmt. Il peut donc coexister, chez un même individu, et même dans une même cellule, de l'ADNmt sauvage et de l'ADNmt muté. Cet état est appelé hétéroplasmie (Chinnery *et al.*, 1998, Wallace, 1999).

La plupart des cellules eucaryotes possèdent un réseau dynamique et branché de mitochondries. En effet, si par le passé, les mitochondries étaient considérées comme des organites isolés et indépendants, aujourd'hui, il est accepté que la mitochondrie est un organite réticulé et branché extrêmement dynamique dont la morphologie est régulée par des processus de fusion et de fission impliquant de nombreuses protéines comme, respectivement, les protéines mitofusines (Mfn1,2) et la « dynamin-related protein » (Drp1), une protéine possédant une activité GTP-asiq (Chen *et al.*, 2003) (Smirnova *et al.*, 2001) . Ces changements dans l'équilibre entre les évènements de fusion et de fission, expliquent, en grande partie, les aspects très variés de l'apparence morphologique adoptée par la population mitochondriale. La morphologie de la mitochondrie peut en effet passer d'une simple sphère (résultant de la fragmentation du réseau) à un réseau mitochondrial complexe et branché (encore appelé « mitochondrion ») (Chan, 2006a).

### **1.1.2 Fonctions des mitochondries**

Dans une cellule eucaryote, la mitochondrie intervient dans de nombreux processus cellulaires. Chaque compartiment mitochondrial est associé à une ou plusieurs fonctions. En contact avec le cytosol, la membrane mitochondriale externe (MME) est constituée d'une double couche lipidique perméable aux molécules dont le poids moléculaire est inférieur à 10 kDa. Différentes protéines du PTP (permeability transition pore) telles que VDAC (Voltage-Dependent Anion Chanel) mais également des protéines de la famille Bcl-2 sont localisés dans cette membrane. La membrane mitochondriale interne (MMI) possède, quant à elle, des replis (ou crêtes mitochondriales) permettant d'augmenter sa surface. Cette MMI est imperméable à la plupart des protéines. Le passage de protéines et de protons à travers cette membrane n'est possible qu'à travers des molécules de transport. C'est au sein de la membrane interne que l'on retrouve les différents complexes de la chaîne respiratoire et la F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATP synthase responsable de la production d'ATP (voir point 1.1.2.1) ainsi que divers transporteurs nécessaires au bon fonctionnement du cycle de Krebs. L'espace situé entre la MME et la MMI, où l'espace intermembranaire contient de nombreuses protéines délocalisables telles que des protéines pro-apoptotiques comme des pro-caspase (3, 7,...) ou AIF (apoptosis-inducing factor). Enfin, la matrice mitochondriale contient de nombreuses enzymes catalysant les réactions du cycle de Krebs ou de la  $\beta$ -oxydation des acides gras. De plus, cette matrice contient les molécules nécessaires à la machinerie de synthèse des protéines mitochondriales (ribosomes, ARNt) et de multiples copies de l'ADN mitochondrial.

Dans une cellule eucaryote, la mitochondrie intervient dans plusieurs processus cellulaires. Un des plus importants est de permettre la respiration aérobie et de fournir de l'énergie à la cellule sous la forme d'ATP. La mitochondrie intervient également dans plusieurs voies métaboliques cellulaires parmi lesquelles, le cycle de Krebs (ou cycle TCA ou cycle de l'acide cytrique), la  $\beta$ -oxydation des acides gras, la synthèse du cholestérol et le cycle de l'urée. De plus, elle joue un rôle majeur dans l'homéostasie du calcium (Brookes *et al.*,

2004). Elle est également impliquée dans la production de ROS. Enfin, elle est capable de répliquer son ADN et de synthétiser des ARNm, des ARNt, des ARNr et les 13 protéines de la chaîne respiratoire.

### ***1.1.2.1 La production d'énergie par la phosphorylation oxydative***

La mitochondrie est le principal site de production d'ATP. Les protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative composent les complexes I, II, III et IV de la chaîne de transport d'électrons et la F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATP synthase (complexe V) et sont localisées dans la membrane mitochondriale interne (Figure 1.2). La chaîne de transport d'électrons assure l'oxydation de NADH (nicotinamide adénine dinucléotide) et de FADH<sub>2</sub> (flavine adénine dinucléotide) obtenus par l'oxydation complète du glucose ou des acides gras après leur transformation en acétyl-CoA, et son oxydation dans le cycle de Krebs (Wallace, 1999).

Concrètement, lors de la respiration cellulaire aérobie, les électrons, portés par le NADH + H<sup>+</sup> glycolytique ou porté par le NADH + H<sup>+</sup> et le FADH<sub>2</sub> produits lors du cycle de Krebs, sont transférés au complexe I (NADH CoQ réductase) puis au coenzyme Q<sub>10</sub> (CoQ). Les électrons portés par le succinate provenant du cycle de Krebs sont, quant à eux, transférés au complexe II (succinate CoQ réductase) puis au coenzyme Q<sub>10</sub>. Ensuite, à partir du coenzyme Q<sub>10</sub>, les électrons transitent par le complexe III (coenzyme Q - cytochrome-c-réductase), le cytochrome C (Cyt c), le complexe IV (cytochrome C oxydase, COX), puis sont finalement acceptés par l'oxygène.

L'énergie libérée par les réactions d'oxydo-réduction lors de ce transfert d'électrons permet le passage de protons (H<sup>+</sup>) de la matrice dans l'espace inter-membranaire au niveau des complexes I, III et IV créant un gradient électrochimique ( $\Delta\psi$ ) de part et d'autre de la MMI. Cette force protonmotrice va pousser les protons à retourner dans la matrice via le canal à protons de la partie F<sub>0</sub> de la F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATP synthase (Figure 1.3). La F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATP synthase ou (complexe V) est composée de deux sous-unités : la sous-unité F<sub>0</sub> (inhibable par l'oligomycine) permet le passage des protons et la sous-unité F<sub>1</sub> permet la phosphorylation de l'ADP (adénosine diphosphate), pour former de l'ATP. L'ATP produit est alors exporté dans le cytosol par l'ANT (adénine nucléotide translocase), un anti-porteur qui échange un ATP<sup>4-</sup> contre un ADP<sup>3-</sup>. De cette manière, selon la théorie chimiosmotique de Mitchell, la consommation d'oxygène par la chaîne de transport d'électrons est couplée à la phosphorylation d'un ADP par la F<sub>0</sub>-F<sub>1</sub> ATP synthase grâce au gradient électrochimique ( $\Delta\psi$ ) (Kakkar & Singh, 2007).

### ***1.1.2.2 La mitochondrie et les dérivés réactionnels de l'oxygène (ROS)***

Les dérivés réactionnels de l'oxygène regroupent un ensemble de dérivés radicalaires de l'oxygène mais également non radicalaires comme le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) et les hydroperoxydes (ROSH). La chaîne de transport d'électrons mitochondriale est une source importante de ROS dans la cellule eucaryote (O<sub>2</sub><sup>(-)</sup>, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, ·OH), produits toxiques de la respiration cellulaire. Les radicaux superoxydes (O<sub>2</sub><sup>(-)</sup>) sont produits lorsque la chaîne de transport d'électrons ne fonctionne pas de manière optimale. Les électrons s'accumulent alors au niveau des complexes I, III et du CoQ où ils peuvent être directement donnés à l'O<sub>2</sub> pour

former l'anion superoxide ( $O_2^{\cdot-}$ ) une molécule très instable et réactive (Figure 1.4) (Kakkar & Singh, 2007). Cependant, même dans les conditions normales, 2 à 3 % de l'oxygène consommé est utilisé pour la formation d' $O_2^{\cdot-}$  (Vergani *et al.*, 2004). De plus, la mitochondrie est non seulement une source mais la première cible de ces ROS. En effet, l'ADNmt est particulièrement sensible à l'attaque des ROS étant donné sa proximité par rapport à la source des ROS, l'absence de protéine histone et la faible efficacité des systèmes de réparation de l'ADN. De plus, une forte exposition aux ROS peut inactiver les centres Fe-S des complexes I, II et III de la chaîne de transport d'électrons résultant en une chute de la production d'ATP. Les ROS sont également responsables de l'oxydation de certains acides aminés comme les cystéine, ce qui peut entraîner la perte de la structure tertiaire des protéines. Le radical hydroxyl ( $\cdot OH$ ) est, quant à lui responsable de peroxydation lipidique. En effet, les acides gras représentent une des cibles privilégiées des ROS (Orrenius, 2007).

En tant que site important de la production de ROS, la mitochondrie possède également des mécanismes de protection permettant la dismutation et la détoxification des ces dérivés. L'anion superoxide est dismuté par la MnSOD/SOD<sub>2</sub> (superoxyde dismutase mitochondriale) faisant partie de la famille des SOD avec la CuSOD/SOD<sub>1</sub> cytosolique pour donner le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ). Le  $H_2O_2$  est une molécule oxydante stable capable de diffuser à travers les membranes biologiques, qui peut alors être convertie en  $H_2O$  par la glutathione peroxydase (GPx) et les peroxyrédoxines III et IV mitochondriales. La catalase permet également la conversion de  $H_2O_2$  en  $H_2O$ . Le  $H_2O_2$ , en présence de métaux réduits ( $Fe^{2+}$ ,  $Cu^+$ ), peut également être converti en radical hydroxyl ( $\cdot OH$ ), extrêmement réactif, par la réaction de Fenton et la réaction d'Haber-Weiss (Kakkar & Singh, 2007).

Il est important de souligner que les ROS, malgré leurs effets toxiques exercés, à haute concentration, jouent également un rôle physiologique essentiel dans de nombreuses voies de signalisation intracellulaires comme celles contrôlant la division cellulaire (Brookes *et al.*, 2004).

### ***1.1.2.3 La mitochondrie et l'homéostasie du calcium***

Le calcium ( $Ca^{2+}$ ) joue un rôle prépondérant dans de nombreux processus cellulaires comme la mort cellulaire programmée (Brini, 2003). De plus, la mitochondrie est un des principaux régulateurs de la concentration en calcium cytosolique libre ( $[Ca^{2+}]_c$ ) dans une cellule (Brookes *et al.*, 2004). En effet, elle est capable d'accumuler le calcium cytosolique dans sa matrice lorsque la concentration  $[Ca^{2+}]_c$  devient trop importante. De plus, le calcium permet d'augmenter la production d'énergie sous la forme d'ATP et de NADH lors de demandes énergétiques cellulaires accrues. Le calcium est en effet capable de réguler l'activité de trois enzymes du métabolisme mitochondrial : l'isocitrate déshydrogénase, l' $\alpha$ -cétoglutarate déshydrogénase (deux enzymes impliquées dans le cycle de Krebs) et la pyruvate déshydrogénase (Brini, 2003). Le calcium mitochondrial est également capable d'activer la production de NADH par l'activation de la Fo-F1 ATP synthase ainsi que l'ANT. Ces différents effets ont pour conséquence positive l'augmentation de la production d'ATP par la mitochondrie (Brookes *et al.*, 2004). L'entrée et la sortie du calcium dans la mitochondrie sont constitutives et se déroulent par deux processus différents. Le premier implique principalement un canal uniport inséré dans la MMI qui permet le passage du calcium selon son gradient de concentration et dépendant du potentiel électrochimique. Le second fait intervenir un canal antiport au sein duquel le passage des ions de calcium est possible en échange d'ions sodium ou de protons (Brookes *et al.*, 2004).



Cependant, une forte augmentation de la concentration en calcium dans la matrice mitochondriale  $[Ca^{2+}]_m$  peut déclencher la perméabilisation de la membrane mitochondriale interne via l'activation de la cyclophiline D, protéine appartenant au PTP (permeability transition pore), complexe qui contrôle la perméabilisation de la MMI (voir point 1.3.1.2). Celle-ci étant capable de se lier à l'ANT (Adenine Nucleotide Translocator) également impliquée dans l'ouverture du PTP (Gunter *et al.*, 2004). Cette perméabilisation membranaire pourra alors entraîner la libération cytosolique de facteurs pro-apoptotiques et peut, de ce fait, induire la mort cellulaire (voir point 1.3.1.2).

## ***1.2 Le dysfonctionnement mitochondrial***

### **1.2.1 Les pathologies mitochondriales**

Des dysfonctionnements dans le métabolisme d'origine mitochondriale sont à l'origine de nombreuses pathologies telles que des maladies dégénératives telles que des encéphalomyopathies, mais joueraient également un rôle dans le vieillissement et l'apparition de certains types de cancers (Wallace, 1999). L'étude des maladies mitochondriales a montré une grande complexité dans l'étiologie des maladies causées par, ou associées à, un dysfonctionnement mitochondrial. En effet, le dysfonctionnement de l'activité bioénergétique de l'organite peut résulter de mutations dans le génome mitochondrial et/ou dans le génome nucléaire (DiMauro, 2004).

Les pathologies associées à un dysfonctionnement mitochondrial causé par des mutations dans le génome nucléaire sont nombreuses. En effet, le génome nucléaire code pour un nombre important de protéines mitochondriales (environ 99 % des 1500 protéines actuellement prédites). Il code notamment pour de nombreuses sous-unités de la chaîne respiratoire (DiMauro, 2004), pour des protéines impliquées dans l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire mais également pour des protéines impliquées dans le transport des protéines mitochondriales codées par l'ADN nucléaire (Fenton, 1995). Il code également pour des protéines assurant le contrôle de la morphologie et de la dynamique mitochondriales (Delettre *et al.*, 2000).

Les maladies mitochondriales, *sensu stricto*, proviennent uniquement de mutations s'accumulant dans les multiples copies du génome mitochondrial. A ce jour, plus de 100 mutations ponctuelles et autres altérations dans l'ADNmt telles que des délétions, des insertions, des substitutions ont été décrites (voir tableau 1.1). Ces altérations sont susceptibles d'affecter aussi bien les gènes codant pour les peptides de la chaîne respiratoire que les ARNt et les ARNr mitochondriaux (Servidei, 2004). Les manifestations cliniques des symptômes associés à ces modifications du génome mitochondrial sont extrêmement hétérogènes et dépendent principalement de la nature de l'altération (mutation ponctuelle, délétion, duplication,...), du taux d'hétéroplasmie de l'ADNmt muté et du tissu (ou organe) affecté (Wallace, 1999). Parmi les différents symptômes engendrés par les mutations dans l'ADN mitochondrial, nous pouvons mentionner le syndrome MELAS (myopathy encephalopathy lactic acidosis and stroke-like episodes) causé par des mutations au niveau des nucléotides 3243 et 3271 de l'ARNt portant la leucine et qui provoque une myopathie, des anomalies cardiaques, des migraines et de la démence, la pathologie MERRF (myoclonic epilepsy associated with ragged red fibers) est due à une mutation dans l'ARNt codant pour la lysine. Cette pathologie sera détaillée dans la suite de ce travail au point 1.2.2. Il existe

également le syndrome Leigh qui est causé par la mutation T8993G, une substitution de A en G dans le gène codant pour la sous-unité 6 de la Fo-F1 ATP synthase. Cette mutation est hétéroplasmique et, lorsqu'elle est présente à un faible pourcentage (< 75 %), cause le syndrome NARP (neurogenic muscle weakness, ataxia, and retinus pigmentosa), par contre, lorsqu'elle est présente à un pourcentage élevé (> 95 %), elle est responsable du syndrome de Leigh. Celui-ci est associé cliniquement à un retard dans le développement, une atrophie du nerf optique et une ataxie.

Des réarrangements dans le génome mitochondrial peuvent aussi être responsables de pathologies. Ainsi, des délétions plus ou moins importantes sont responsables des syndromes CPEO (chronic progressive external ophthalmoplegia) et KSS (Kearns-Sayres syndrome) caractérisés par des ataxies, des problèmes cardiaques et de la démence. (Wilson *et al.*, 2004).

Il existe plusieurs caractéristiques du génome mitochondrial qui contribuent à l'apparition et au développement des maladies mitochondriales. Premièrement, mentionnons que l'ADNmt est hérité uniquement de la mère (hérédité maternelle et non mendélienne). En effet, les éventuelles mitochondries des spermatozoïdes éventuellement transmises lors de la syngamie sont éliminées lors des premières étapes de l'embryogenèse. Les maladies causées par des altérations du génome mitochondrial sont donc uniquement transmises par la lignée maternelle.

De plus, comme déjà mentionné précédemment, des copies d'ADNmt de séquences différentes peuvent co-exister dans une même cellule ou dans différents tissus de l'organisme (Chinnery *et al.*, 1998). Cette condition est appelée hétéroplasmie et explique le fait que c'est la proportion des copies d'ADNmt mutées par rapport au nombre de copies d'ADNmt sauvages qui contribue à l'expression phénotypique de la maladie. Ce concept fondamental est à prendre en compte dans l'étude du développement des maladies mitochondriales. En effet, lorsque le rapport entre l'ADNmt mutant et sauvage dépasse un seuil critique, la respiration cellulaire est affectée, ce qui mène à l'apparition des symptômes. De plus, le seuil à partir duquel les symptômes se manifestent dépend du tissu considéré. Ainsi, dans les tissus qui consomment beaucoup d'énergie tels que les muscles, le cerveau, le cœur ou le foie, le seuil critique est plus bas que dans des tissus présentant une faible demande énergétique (Schmiedel *et al.*, 2003). Ces tissus sont donc plus généralement affectés par le dysfonctionnement mitochondrial. Des données récentes de la littérature montrent que la biogenèse et la dynamique mitochondriale sont synchronisées par rapport au cycle cellulaire (Martinez-Diez *et al.*, 2006). Cependant, une autre caractéristique de l'ADNmt est le fait que celui-ci est répliqué continuellement, même dans des cellules qui ne se divisent pas. Chez des patients atteints d'une maladie mitochondriale, la réplication du génome mitochondrial peut donc modifier le taux d'hétéroplasmie dans le tissu musculaire squelettique ou le tissu nerveux (Schmiedel *et al.*, 2003). Une autre caractéristique est que les mitochondries ne sont pas réparties de manière uniforme dans les cellules filles lors de la division cellulaire. Ceci peut résulter en une distribution asymétrique de l'ADNmt muté dans les cellules filles et expliquer pourquoi un individu peut avoir des proportions complètement différentes d'ADNmt normaux et mutés dans différents tissus (Schmiedel *et al.*, 2003). Enfin, le génome mitochondrial, se trouvant dans un environnement oxydant et n'étant pas associés aux histones capables de protéger l'ADN, les dommages dans l'ADN s'accumulent plus rapidement que dans le génome nucléaire. De plus, ce dernier possède une machinerie de réparation nettement plus efficace que celle retrouvée dans la matrice mitochondriale (Bohr *et al.*, 2002). Ces différentes caractéristiques permettent donc de comprendre que l'on peut trouver une accumulation de mutations mitochondriales corrélée à l'âge ainsi que des « ragged red fibers » ou « fibres rouges déchiquetées » chez des personnes âgées (Wang *et al.*,

2001). Ces fibres rouges déchiquetées représentent l'accumulation de mitochondries sous le sarcolème de cellules musculaires squelettiques présentant des mutations comme la mutation A8344G responsable de syndrome MERRF (Figure 1.5) (Schmiedel et al., 2003).

En conclusion, les maladies mitochondriales sont donc très difficiles à diagnostiquer. En effet, une même mutation peut produire différents phénotypes et inversement, un même phénotype peut provenir de différentes mutations dans l'ADNmt. Ajoutons encore qu'il n'existe pas de traitement thérapeutique efficace pour traiter les maladies mitochondriales (Schmiedel et al., 2003).

### **1.2.2 Le syndrome MERRF (Myoclonic Epilepsy associated with Ragged Red Fibers)**

Le syndrome MERRF est une maladie neurodégénérative chronique qui touche environ 1 personne sur 100 000 et se manifeste, le plus souvent, à un âge compris entre 10 et 30 ans (Schmiedel et al., 2003). Histologiquement, il est caractérisé par la présence de « fibres rouges déchiquetées » dans les muscles (Figure 1.5). Ceci suggère que la population mitochondriale est augmentée chez les patients présentant le syndrome MERRF et conduit donc à penser que la biogenèse de l'organite est stimulée en réponse à un dysfonctionnement mitochondrial dans les cellules musculaires de ces patients. Cliniquement, les patients présentent des symptômes tels que des épilepsies myocloniques, des ataxies, une cardiomyopathie, une neuropathie, une atrophie du nerf optique et une perte neurosensorielle de l'audition (Schmiedel et al., 2003).

D'un point de vue génétique, plusieurs mutations ponctuelles telles que les mutations A8344G, T8356C et G8363A ont été identifiées comme suffisantes pour conduire à l'apparition du syndrome MERRF (Schmiedel et al., 2003). Ces trois mutations peuvent apparaître dans un gène codant pour l'ARNt<sup>Lys</sup>. Approximativement 80 % des patients sont atteints, à l'état hétéroplasmique, par la mutation A8344G. Les deux autres mutations sont plus rares. La substitution d'une adénine (A) par une guanine (G) à la position 8344 dans le gène mitochondrial codant pour l'ARNt<sup>Lys</sup> induit une perte de la modification post-transcriptionnelle de l'uridine en position « wobble » sur l'anticodon de l'ARN de transfert (Figure 1.6) (Yasukawa *et al.*, 2001). Les cellules portant la mutation MERRF (A8344G) dans leur ARNt<sup>Lys</sup> mitochondrial sont incapables de transcrire les codons AAA et AAG. Cette perturbation de la traduction des transcrits mitochondriaux affecte donc la synthèse protéique mitochondriale. C'est d'ailleurs Chomyn et ses collaborateurs qui ont montré, pour la première fois, une diminution du taux de traduction des transcrits mitochondriaux dans des cellules portant une mutation mitochondriale MERRF (Chomyn *et al.*, 1991). De plus, dans les cellules affectées par la mutation A8344G, les 13 polypeptides mitochondriaux de la chaîne respiratoire peuvent être synthétisés sous des formes tronquées par la machinerie de traduction mitochondriale (Enriquez *et al.*, 1995).

La mutation affecte principalement les complexes de la chaîne respiratoire I et IV de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale. L'impact biochimique de cette mutation sera principalement une déficience énergétique. En effet, ces deux complexes contiennent respectivement 7 et 3 sous-unités codées par l'ADN mitochondrial. Cette mutation aura donc pour conséquence une diminution de la phosphorylation oxydative entraînant une diminution de la production d'ATP (Wallace *et al.*, 1988) et une augmentation de la production de ROS. De plus, la diminution du ratio ATP/ADP va inactiver des Ca<sup>2+</sup>-ATPases et la diminution du potentiel de membrane mitochondrial va ralentir l'accumulation du calcium dans la matrice

mitochondriale. Ces deux phénomènes causés par le dysfonctionnement mitochondrial vont donc entraîner une accumulation de calcium dans le cytosol des cellules (James *et al.*, 1999).

### **1.2.3 Les cellules cybrides portant la mutation mitochondriale MERRF (A8344G)**

Environ un an avant la découverte de la mutation A8344G dans le génome mitochondrial, la première lignée cellulaire dépourvue d'ADNmt a été générée par King et Attardi (King & Attardi, 1989). Cette lignée de cellules complètement déplétées en ADNmt (ou cellules  $\rho^0$ ) possède toujours des structures mitochondriales, capables de maintenir un potentiel membranaire. Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer le maintien du potentiel de membrane comme l'utilisation de l'ATP/ADP translocase et l'ATP produite de manière glycolytique (Buchet & Godinot, 1998).

De plus, les cellules  $\rho^0$  peuvent être repeuplées avec des mitochondries exogènes par fusion avec des cytoplasmes de cellules énucléées ou par micro-injections de mitochondries. Ces deux approches permettent la création de cellules cybrides, un modèle intéressant pour étudier les maladies mitochondriales (Chomyn, 1998). Au laboratoire, nous travaillons sur un modèle cellulaire de dysfonctionnement mitochondrial constitué de cellules cybrides portant la mutation ponctuelle A8344G responsable du syndrome MERRF. Ces cellules forment une population à l'état homoplasmique pour la mutation A8344G et proviennent de la fusion entre des cellules 143B d'ostéosarcome humain totalement déplétées en ADNmt (cellules  $\rho^0$  143B) et des plaquettes de patients porteurs de la mutation A8344G responsable du syndrome MERRF (= cellules cybrides mutées) ou avec des plaquettes d'individus sains (= cellules cybrides sauvages).

## ***1.3 Le dysfonctionnement mitochondrial et l'apoptose***

La mitochondrie est impliquée dans de nombreuses voies de signalisation cellulaires et joue notamment un rôle essentiel d'intégration de signaux dans les voies de signalisation en rapport avec la survie ou la mort cellulaire par apoptose (ou mort cellulaire de type 1). Il a d'ailleurs déjà été montré, à de multiples reprises, qu'un dysfonctionnement mitochondrial peut influencer et modifier la réponse aux inducteurs apoptotiques (Liu *et al.*, 2004). Dans la physiopathologie du syndrome MERRF, caractérisé par un dysfonctionnement mitochondrial chronique, l'hypothèse d'une perte progressive des fibres musculaires par apoptose a également été proposée. Avant de décrire spécifiquement la réponse apoptotique de cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial, nous allons décrire brièvement les effecteurs moléculaires et les mécanismes impliqués dans les voies apoptotiques canoniques (pour une revue, (Jin & El-Deiry, 2005).

### **1.3.1 L'apoptose**

L'apoptose est un mécanisme qui fait entièrement partie de la vie des organismes multicellulaires. Cette réponse cellulaire joue un rôle capital dans le développement et l'homéostasie des tissus. Vu son importance, l'apoptose est régulée et contrôlée de manière très fine à de nombreux endroits par de nombreux effecteurs (Jin & El-Deiry, 2005). Des altérations dans ces mécanismes de régulation conduisent à l'apparition de diverses pathologies telles que les cancers, les maladies auto-immunes ou neurodégénératives.

Morphologiquement, l'apoptose se caractérise par un rétrécissement cellulaire et nucléaire (pyknose), la condensation de la chromatine, une fragmentation du noyau et de l'ADN (karyorrhexis) et la formation de corps apoptotiques (Jin & El-Deiry, 2005).

L'apoptose se distingue de la nécrose. En effet, cette dernière se caractérise par une perte de l'intégrité de la membrane plasmique de la cellule menant à la libération du contenu cellulaire dans le milieu environnant induisant des dommages aux cellules environnantes ainsi qu'une forte réponse inflammatoire. L'apoptose, quant à elle, est un processus régulé qui permet, par la formation de corps apoptotiques et leur phagocytose subséquente, un recyclage des constituants cellulaire et l'absence de réponse inflammatoire.

Chez les mammifères, un grand nombre de molécules et de conditions de stress peuvent initier au moins une des deux voies apoptotiques cellulaires majeures : la voie extrinsèque (encore appelée voie dépendante des récepteurs de mort) et la voie intrinsèque (ou voie mitochondriale) (Jin & El-Deiry, 2005). Ajoutons dès maintenant que les données les plus récentes de la littérature montrent que ces deux voies sont interconnectées par des molécules comme tBid et ne sont donc pas complètement indépendantes l'une de l'autre (Figure 1.7). La voie extrinsèque est activée, dans la plupart des cas, par la fixation d'un ligand pro-apoptotique sur un récepteur de mort qui permet l'activation des caspases en aval comme la caspase-8. Parmi ces stimuli pro-apoptotiques mentionnons les cytokines pro-inflammatoires comme le TNF $\alpha$ . La voie intrinsèque est, quant à elle, médiée par divers stimuli pro-apoptotiques qui convergent vers la mitochondrie. Parmi ces stimuli, citons les dommages à l'ADN ou la libération des cathepsines lysosomales dans le cytosol (Jin & El-Deiry, 2005). La libération du Cytochrome c par la mitochondrie dans le cytosol va initier une cascade conduisant à l'activation des caspases.

La dernière étape de l'apoptose consiste en l'empaquetage du contenu cellulaire dans des corps apoptotiques et leur phagocytose. En effet, les cellules apoptotiques montrent des marqueurs de surface pour la reconnaissance intercellulaire. Parmi ces marqueurs, le passage (« flip-flop ») de la phosphatidylsérine dans le feuillet externe de la membrane plasmique permet aux macrophages et aux cellules voisines de phagocyter les corps apoptotiques (Jin & El-Deiry, 2005).

### ***1.3.1.1 Les caspases***

Les caspases (pour cysteinyl aspartate proteases) appartiennent à une famille de protéases initiatrices et effectrices de l'apoptose et leur activation est une étape fondamentale qui constitue un marqueur reconnu de l'apoptose (Figure 1.8). Actuellement, 14 protéines de cette famille ont été identifiées (Jin & El-Deiry, 2005). Elles sont classées en 3 groupes sur base de leur(s) fonction(s) connue(s) ou supposée(s). Le premier groupe de caspases contient les caspases inflammatoires (caspases 1, 4, 5, 11, 12, 13 et 14). Le second comporte les caspases initiatrices, caractérisées par la présence d'un pro-domaine effecteur de mort (death effector domain, DED) (caspases 8 et 10) ou un pro-domaine d'activation et de recrutement (caspase activation and recruitment domain, CARD) (caspases 2 et 9) qui permet leur interaction avec des molécules effectrices en aval. Le dernier groupe contient les caspases effectrices (caspases 3, 6, 7) qui sont caractérisées par un pro-domaine plus court. Ces dernières sont reconnues et activées par des caspases initiatrices et sont responsables des phases d'exécution de l'apoptose médiées par le clivage de divers substrats cellulaires tels que des médiateurs et des régulateurs de l'apoptose, des protéines de structure, des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN et des protéines régulatrices du cycle cellulaire. La plupart des caspases sont activées par des clivages protéolytiques sur deux sites présents dans

des zymogènes. Ces sites de clivage permettent parfois une auto-activation des caspases ou (le plus souvent) une réponse de type « cascade de caspases » (Figure 1.9) (Jin & El-Deiry, 2005).

### ***1.3.1.2 La voie intrinsèque de l'apoptose***

La mitochondrie est un régulateur central de la voie intrinsèque de l'apoptose. Au niveau biochimique, l'apoptose dépendante de la mitochondrie est souvent (mais pas toujours) caractérisée par la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (mitochondrial outer membrane permeabilisation, MOMP) régulée par le PTP (permeability transition pore) et les membres de la famille Bcl-2 (Ferri & Kroemer, 2001). La composition moléculaire du PTP n'est probablement pas encore complètement connue. Cependant, il serait composé de plusieurs protéines en interactions dynamiques comme VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel, ANT (Adenine Nucleotide Translocator) et Cyp D (cyclophilin D) capables de réguler l'ouverture et la fermeture du pore (Figure 1.10). Cette perméabilisation est suivie d'une délocalisation de protéines pro-apoptotiques comme le Cyt c ou AIF et d'une activation des caspases (caspases 3, 6, 7, 9). La mitochondrie est donc un régulateur central pour l'initiation de l'apoptose et les différents mécanismes impliqués dans cette voie sont présentés à la figure 1.7.

Les protéines de la famille Bcl-2 sont les principaux régulateurs de la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (MOMP) (Figure 1.11). Cette famille regroupe les protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-XL, ...) qui contiennent 4 domaines BH (Bcl-2-homology) (BH 1, 2, 3, 4), les protéines pro-apoptotiques (Bax, Bak, ...) qui contiennent 3 domaines BH (BH 1, 2, 3) et les protéines pro-apoptotiques « BH3-only » (Bid, Bad, ...).

Certains membres de ces différentes sous-familles possèdent également un domaine transmembranaire additionnel « COOH-terminal » qui leur permet une insertion dans la membrane mitochondriale externe (MME). En effet, le principal site d'action des protéines de la famille Bcl-2 se situe dans la membrane mitochondriale externe. En général, les protéines contenant 4 domaines BH (Bcl-2, Bcl-XL) résident principalement dans la MME où elles jouent un rôle protecteur contre la perméabilisation de la membrane externe. Leur mécanisme d'action principal consiste à se lier à Bax et Bak et à neutraliser les effets pro-apoptotiques de ces protéines capables d'induire la perméabilisation de la membrane mitochondriale externe (Kroemer *et al.*, 2007).

Plusieurs hypothèses permettent d'expliquer les mécanismes de perméabilisation de la membrane mitochondriale externe. Premièrement, Bax serait capable de perméabiliser la MME par multimérisation en formant un pore de manière indépendante, ou par association avec Bak ou tBid (Kuwana *et al.*, 2002). Bax pourrait également en s'associer à une molécule formant le PTP comme l'ANT ou VDAC (Kroemer *et al.*, 2007). Cependant, de nouvelles données ont mis en évidence que l'ouverture du PTP induite par Bax était toujours observée dans des cellules de souris VDAC<sup>-/-</sup> (Baines *et al.*, 2007). L'ouverture du PTP entraîne une dépolarisation de la MMI (de - 220 à - 180 mV en conditions normales) et le découplage de la phosphorylation oxydative libérant, de ce fait, plusieurs facteurs pro-apoptotiques dans le cytosol (Kroemer *et al.*, 2007).

L'espace intermembranaire mitochondrial contient un grand nombre de facteurs pro-apoptotiques tels que le Cyt c, le facteur AIF (apoptosis inducing factor, une flavoprotéine), l'endonucléase G, les antagonistes des IAPs (inhibitor of apoptosis): Smac Diablo et Omi/HtrA2 ainsi que les pro-caspases 9, 3 et 2 (Kroemer et al., 2007). Après l'ouverture du PTP, certaines de ces molécules, libérées de la mitochondrie dans le cytosol, vont conduire à l'activation des caspases et/ou induire directement ou indirectement la fragmentation de l'ADN. Parmi ces facteurs, le Cyt c cytosolique contribue à la formation de l'apoptosome par sa liaison à Apaf-1, un processus nécessitant de l'ATP. L'apoptosome recrute ensuite la caspase-9 permettant son activation par oligomérisation et trans-clivage protéolytique. Une fois activée, celle-ci va conduire à l'activation des caspases effectrices -3, -6 et -7. Ces dernières sont responsables de la dégradation de nombreuses molécules telles que des protéines structurales comme la lamine nucléaire, des protéines de réparation de l'ADN tel que PARP (Poly (ADP-ribose) polymérase) et des protéines liées au cycle cellulaire comme Cdc27 (Jin & El-Deiry, 2005). Un second groupe de protéines libérées à partir de la mitochondrie est le groupe comprenant les antagonistes des IAPs (inhibitor of apoptosis proteins). Parmi ceux-ci, on trouve Smac/DIABLO et Omi/HtrA2. Ces molécules sont capables de neutraliser les inhibiteurs endogènes des caspases (les IAPs) permettant l'activation des caspases. Il faut ajouter que la mitochondrie libère également des protéines pro-apoptotiques dont le mécanisme d'action est indépendant de l'activation des caspases. Par exemple, AIF, une fois libéré dans le cytosol, transloque dans le noyau et induit une condensation de la chromatine et une fragmentation de l'ADN (Susin *et al.*, 2000). Enfin, Endo G est également capable de cibler le noyau et d'induire une fragmentation de l'ADN génomique (Jin & El-Deiry, 2005). En résumé, dans la voie canonique de l'apoptose, la cellule, en réponse à un stress, peut voir sa MME être perméabilisée par l'action des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. Ceci conduira à la libération de facteurs pro-apoptotiques contenus dans l'espace intermembranaire. L'activation des caspases qui s'en suit mènera alors, directement ou indirectement, à la mort cellulaire par apoptose et à ses marqueurs caractéristiques comme la pycknose et la karyorrhexie.

### ***1.3.1.3 La voie extrinsèque de l'apoptose***

Brièvement, la voie extrinsèque ou voie des récepteurs de mort (Figure 1.7) est déclenchée par l'activation d'un récepteur de mort de la membrane plasmique lié à son ligand. Parmi ces récepteurs, citons le récepteur au TNF- $\alpha$  (TNFR I ou II, tumor necrosis factor receptor I ou II) et le récepteur Fas/CD95. Ces récepteurs, lorsqu'ils sont activés, vont recruter plusieurs protéines et conduire à la formation d'un complexe de mort intracellulaire comme DISC (death induced signaling complexes) capables d'activer des caspases effectrices tel que la caspase-8. Celle-ci va, à son tour, cliver des caspases effectrices en aval telles que les caspases 3 et 7. La caspase 8 peut également cliver la protéine Bid. Cette protéine tronquée (tBid) permet l'activation de la voie intrinsèque suite à la perméabilisation de la MME (Degterev & Yuan, 2008) (Kroemer et al., 2007).

### **1.3.2 Controverse sur la sensibilité différentiel à l'apoptose des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial**

La perméabilisation de la membrane mitochondriale externe et la mort cellulaire qui en résulte peuvent être provoquées par une augmentation de la concentration mitochondriale en calcium, une augmentation de l'exposition aux ROS et/ou une diminution de la production d'énergie par la mitochondrie (Mirabella *et al.*, 2000). Ces différents changements étant observés dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial, l'hypothèse d'une mort progressive de fibres musculaires par apoptose dans le contexte du syndrome MERRF a donc été proposée (Aure *et al.*, 2006).

Dans la littérature, il existe deux questions très controversées qui sont liées à l'apoptose dans des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial. La première est de savoir si ces cellules présentent ou non une mortalité spontanée accrue comparée à des cellules saines (Mirabella *et al.*, 2000). La seconde est de savoir si ces cellules ont une sensibilité accrue ou diminuée face aux inducteurs apoptotiques (Liu *et al.*, 2004).

Plusieurs études *in vivo* ont tenté de déterminer si les cellules de patients atteints par un dysfonctionnement mitochondrial étaient sujettes à une mortalité spontanée et si elles présentaient des marqueurs apoptotiques. Ces études ont été réalisées sur des biopsies musculaires de patients atteints d'encéphalomyopathies mitochondriales telles que MELAS ou MERRF et ont montré la présence de marqueurs apoptotiques dans ces cellules (Aure *et al.*, 2006, Mirabella *et al.*, 2000, Umaki *et al.*, 2002). D'autre part, certaines études n'ont pas mis en évidence cette apoptose dans des biopsies musculaires de patients souffrant de myopathies mitochondriales (Sciaccio *et al.*, 2001). Une étude réalisée par l'équipe du Dr Lombès a permis de réconcilier, du moins, en partie ces résultats contradictoires. Cette étude a porté sur un grand nombre de biopsies musculaires provenant de patients porteurs d'une large délétion dans l'ADNmt ou de patients porteurs de la mutation MELAS (A3243G). L'analyse individuelle de plusieurs milliers de fibres musculaires de ces patients a pu mettre en évidence le fait que l'apoptose se déroulait principalement dans les cellules de fibres musculaires présentant une forte accumulation de mitochondries (ragged red fibers) (Aure *et al.*, 2006). Il existerait donc un lien entre la régulation de la population mitochondriale et l'apoptose.

Des études *in vitro* ont également été réalisées afin de comprendre si les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial étaient plus sensibles ou plus résistantes face à un inducteur apoptotique. Ainsi, Liu *et al.* ont pu mettre en évidence une sensibilité accrue à l'apoptose de cellules 143B  $\rho^0$  en réponse à un traitement à la staurosporine (STS) ou à une exposition aux UV en étudiant l'abondance de marqueurs apoptotiques dans ces cellules (fragmentation d'ADN, activité de la caspase-3 et libération du Cyt c). Cette équipe a également montré que des cellules 143B  $\rho^0$  repeuplées avec des mitochondries possédant la mutation MERRF (cellules cybrides) présentent également une sensibilité accrue à l'apoptose dans les mêmes conditions (Liu *et al.*, 2004). D'autre part, des cellules musculaires murines déplétées en ADN mitochondrial (C2C12  $\rho^0$ ) sont, quant à elles, plus résistantes face à l'apoptose induite par l'étoposide (Biswas *et al.*, 1999). Enfin, une récente étude a démontré que des cellules HCT-8 déplétées en ADNmt présentaient un phénotype MDR (multi drug resistance) induit par la stabilisation accrue des ARNm codant pour MDR1 (Lee *et al.*, 2008). La résistance de cellules déplétées en ADNmt pourrait donc être simplement causée par une meilleure expulsion de la molécule pro-apoptotique.



### 1.3.3 L'apoptose induite par la staurosporine

La staurosporine (STS) est un alcaloïde isolé à partir de la bactérie *Streptomyces staurosporeus*. Cette molécule, composée d'un sucre et d'un cycle plan, est capable de s'insérer dans le site de liaison à l'ATP de très nombreuses protéines kinases et inhibe donc leur activité (Ohizumi, 1997). Elle est donc utilisée comme un inhibiteur très efficace mais très peu spécifique de protéines kinases (large spectre) capable d'induire la mort cellulaire par apoptose.

Son effet pro-apoptotique est médié par au moins trois mécanismes (Figure 1.12) (Liu et al., 2004). Premièrement, la STS est capable d'inhiber les protéines kinases de type C (PKCs) capables de phosphoryler Bad et d'empêcher sa translocation mitochondriale et donc d'inhiber son effet pro-apoptotique. En effet, suite à une deuxième phosphorylation par AKT/PKB, la protéine est séquestrée dans le cytosol par la protéine 14-3-3 (Gross et al., 1999). Mentionnons que Bad est une protéine dont la fonction est d'inhiber Bcl-XL au niveau de la membrane mitochondriale externe (MME) induisant une augmentation de sa perméabilité. L'inhibition des PKCs va donc favoriser la localisation de Bad en MME et donc son action pro-apoptotique.

La staurosporine est également capable d'induire une augmentation de la concentration en calcium libre dans le cytosol  $[Ca^{2+}]_c$  (Liu et al., 2004). Cette augmentation de la  $[Ca^{2+}]_c$  active différentes voies pro-apoptotiques telles que l'activation des calpaines. Ces enzymes sont des protéases capables de cliver les protéines Bid en tBid (protéolyse activatrice) et Bcl-2 (protéolyse inhibitrice) ce qui renforce encore la perméabilisation de la MME et la libération de facteurs pro-apoptotiques par la mitochondrie. Cette augmentation de la  $[Ca^{2+}]_c$  entraîne également une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_{mt}$  conduisant à la mort cellulaire de type I (voir point 1.1.2.3). Enfin, la staurosporine induit également l'augmentation de la production de ROS pouvant également mener à la mort cellulaire (voir paragraphe 1.1.2.2).

Ces différents mécanismes activés par la STS conduisent donc à une réponse cellulaire caractérisée par la libération de facteurs pro-apoptotiques de la mitochondrie dans le cytosol induisant l'activation des caspases et, de ce fait, la mort par apoptose (type I).

## 1.4 *Le dysfonctionnement mitochondrial et l'autophagie*

Historiquement, les types de mort cellulaire ont été classés en deux groupes selon que les mécanismes qui y conduisent sont régulés ou non-régulés. C'est ainsi que l'apoptose, comme nous l'avons vu, est une forme de mort cellulaire régulée exécutée par une machinerie cellulaire complexe. La nécrose est, quant à elle, une mort cellulaire qui repose sur des mécanismes non-régulés et est observée en réponse à de nombreux stress extérieurs à la cellule qui sont incompatibles avec la survie cellulaire (Jin & El-Deiry, 2005). Actuellement, un grand nombre d'arguments expérimentaux suggèrent que ces deux mécanismes n'expliquent pas, à eux seuls, l'ensemble des mécanismes menant à la mort cellulaire. Récemment, l'autophagie, ou mort cellulaire de type II, a été identifiée comme un mécanisme pouvant également mener à la mort cellulaire (Gozuacik & Kimchi, 2007). Cependant, les relations qui existent entre l'autophagie et les autres mécanismes de mort cellulaire sont encore peu connues (Maiuri et al., 2007b). C'est la raison pour laquelle, dans le cadre de ce travail, nous nous sommes intéressés aux mécanismes conduisant à l'autophagie induite par la STS dans des cellules portant la mutation mitochondriale MERRF. Dans le paragraphe qui

suit, pour terminer cette introduction, nous allons tenter de préciser le rôle que joue l'autophagie dans la mort cellulaire.

#### **1.4.1 L'autophagie**

L'autophagie (du Grec « se manger soi-même ») est un processus de dégradation et de recyclage des constituants cellulaires. Trois formes d'autophagie ont été décrites : 1) la micro autophagie, processus par lequel la membrane de vacuoles lysosomales est capable de s'invaginer pour séquestrer une partie des constituants cytosoliques 2) l'autophagie médiée par les chaperonnes, mécanisme par lequel des protéines chaperonnes sont capables de lier des protéines cytosoliques et les délivrer aux lysosomes par l'intermédiaire de la protéine membranaire Lamp2a (Yang *et al.*, 2005) 3) la macroautophagie (pour revue : (Maiuri *et al.*, 2007b, Yorimitsu & Klionsky, 2005). Dans la suite de ce travail, le terme autophagie sera utilisé pour désigner la macroautophagie. Cette forme de l'autophagie est responsable du recyclage de parties de cytoplasme ou d'organites endommagée, n'étant plus nécessaires à la cellule ou présentant un dysfonctionnement. Lors du processus autophagique, les structures à dégrader sont séquestrées dans des vésicules entourées d'une double membrane appelée autophagosome (les différentes étapes de l'autophagie sont présentées à la figure 1.13). La formation de l'autophagosome nécessite, au préalable, la création d'une structure composée d'une double membrane pré-autophagosomale (appelée phagophore). Celle-ci va croître et finalement séquestrer des parties de cytoplasme et des organites pour former l'autophagosome. Une fois formés, les autophagosomes vont fusionner avec des lysosomes (vacuole chez la levure) pour former une vésicule appelée autophagolysosome ou autolysosome. La membrane interne de celui-ci et son contenu sont ensuite dégradés par les hydrolases lysosomales (Levine & Yuan, 2005).

#### **1.4.2 Le paradoxe de l'autophagie : mécanisme de survie ou de mort cellulaire**

##### ***1.4.2.1 L'autophagie et la survie cellulaire***

Dès 1977, l'autophagie a été décrite comme un mécanisme de survie cellulaire (Mortimore & Schworer, 1977). Il a aujourd'hui été confirmé par de nombreuses études que l'inactivation de gènes essentiels de l'autophagie dans plusieurs types cellulaires ou organismes induisait une mort cellulaire accrue (Levine & Yuan, 2005). La fonction de survie de l'autophagie est un processus ancien du point de vue évolutif, conservé de la levure jusqu'aux mammifères, qui est bien caractérisé dans les conditions de privation de nutriments (Levine & Yuan, 2005). Cependant, l'autophagie se déroule également, à un niveau basal, dans les cellules afin de réaliser des fonctions d'homéostasie cellulaire (comme le turnover de molécules du cytosol et d'organites). L'autophagie peut cependant être rapidement stimulée lorsque les cellules ont besoin de générer des nutriments et de l'énergie.

Lors d'une privation en nutriments, la dégradation des membranes lipidiques et des protéines dans l'autolysosome va permettre de recycler des acides gras et des acides aminés permettant la production mitochondriale d'énergie sous forme d'ATP et un maintien de la synthèse protéique (Figure 1.14). Cette fonction de recyclage de composés cellulaires par l'autophagie est probablement liée à la capacité de la cellule de survivre en absence de nutriment (Levine & Yuan, 2005). Ajoutons encore que la privation de facteurs de croissance conduit également à inhiber la prise de nutriments par les cellules et à diminuer la concentration intracellulaire de ceux-ci et donc à activer l'autophagie.

Il est intéressant de noter que dans les cellules HeLa le silencage (knock-down) de gènes codant pour des protéines impliquées dans l'autophagie comme *beclin1*, *atg5*, *atg10* et *atg12* augmente la mort cellulaire par apoptose dans des conditions de privation de nutriments. Ce phénomène n'est cependant pas observé lorsque les cellules HeLa sont incubées en présence de staurosporine (Boya *et al.*, 2005). Bien que, le(s) mécanisme(s) par le(s)quel(s) les gènes de l'autophagie maintiendraient la survie cellulaire en absence de nutriment soi(en)t peu connu(s), il(s) pourrai(en)t impliquer, au moins en partie, la suppression de l'activation de la voie canonique de l'apoptose. L'autophagie est également impliquée dans la dégradation d'organites non fonctionnels ou endommagés comme les mitochondries, dans la dégradation de pathogènes intracellulaires et dans la dégradation d'agrégats protéiques (agrégasomes) trop grands pour être dégradés par le protéasome (Levine & Yuan, 2005).

Ces différentes fonctions de l'autophagie pourraient donc promouvoir la survie cellulaire dans le cadre du vieillissement, des maladies infectieuses et dans les processus neurodégénératifs. En effet, très récemment, il a été montré que la protéine Parkin, une ubiquitine ligase codée par le gène *Park2* muté dans la maladie de Parkinson, est une protéine qui recrute sélectivement les mitochondries non fonctionnelles et médie leur internalisation par les autophagosomes et donc leur dégradation subséquente (Narendra *et al.*, 2008).

#### ***1.4.2.2 L'autophagie ou mort cellulaire de type II***

L'autophagie peut donc protéger la cellule contre la mort cellulaire. Cependant, dans certaines conditions, elle est également capable de provoquer la mort des cellules (Baehrecke, 2005). L'effet de l'autophagie dans la mort cellulaire peut s'expliquer par l'effet autodestructeur potentiel d'une autophagie massive ou mal régulée (mort cellulaire de type II). La stimulation des processus autophagiques pourrait donc détruire de large portions de cytosol et/ou de nombreux organites (mitophagie, peroxyphagie, reticulophagie,...) qui, à partir d'un certain seuil, pourrait provoquer une atrophie irréversible de la cellule avec pour conséquence l'arrêt des fonctions cellulaires vitales. En effet, lors d'une autophagie importante, le volume occupé par les vacuoles autophagiques pourrait atteindre, voire dépasser, le volume occupé par le cytosol « libre » (Baehrecke, 2005).

Plusieurs arguments suggèrent aussi que l'autophagie pourrait constituer une réponse primaire à un stimulus de stress qui se transformera en une réponse conduisant à l'apoptose ou à la nécrose. Par exemple, des cellules T CD4<sup>+</sup> qui interagissent avec l'enveloppe glycolytique du virus HIV-1 vont, dans un premier temps, débiter une réponse autophagique puis mourir par apoptose. Dans ce modèle, la déplétion de beclin-1 ou ATG7 (qui comme nous allons le voir dans la paragraphe suivant sont des molécules nécessaires au processus autophagique) inhibe l'apoptose démontrant ainsi la nécessité d'une phase primaire autophagique pour induire la mort par apoptose dans ces conditions (Espert *et al.*, 2006). Il a également été montré, qu'en absence de sérum, l'inhibition de l'autophagie peut induire la mort cellulaire par un mécanisme dépendant de la perméabilisation de la MME et l'activation subséquente des caspases (Boya *et al.*, 2005). L'effet de l'autophagie permettant la survie cellulaire a également été montré par l'inhibition de la formation de vacuoles autophagiques, en réponse à des siARN spécifiques dirigés contre des molécules nécessaires au processus autophagique (*Atg5*, *Atg6/Becline1*, *Atg10* et *Atg12*) ou en utilisant des inhibiteurs chimiques de l'autophagie comme la 3-méthyladénine (3-MA) (Boya *et al.*, 2005). Dans ces conditions, les cellules meurent directement par apoptose sans montrer aucun signe de vacuolisation

autophagique (Boya et al., 2005). Cependant, en absence de sérum, l'inhibition de la fusion entre le lysosome et les vacuoles autophagiques induite par la bafilomycine<sub>A1</sub>, molécule capable de réduire le pH lysosomal ou l'utilisation de siRNA dirigés contre l'ARNm de la molécule lysosomal LAMP2 va induire une accumulation du nombre de vacuoles autophagiques dans la cellule. Suite à une absence prolongée de sérum en présence de ces inhibiteurs de fusion, les cellules vont donc présenter des caractéristiques apoptotiques (pyknose, karyorrhexie) (Boya et al., 2005, Gonzalez-Polo *et al.*, 2005). Ces résultats suggèrent une interrelation entre les deux types de mort cellulaire et qu'il n'existe pas de délimitation claire entre l'apoptose et l'autophagie.

### **1.4.3 Mécanismes moléculaires de l'autophagie**

#### **1.4.3.1 Induction de l'autophagie**

L'autophagie, bien qu'étant un processus continu, peut être divisé en 6 grandes étapes (Figure 1.15). L'ensemble des étapes et les acteurs moléculaires associés au processus autophagique sont décrits dans la légende de la figure 1.16.

#### **1.4.3.2 Régulation de l'autophagie**

##### **a) La voie mTOR**

La Ser/Thr kinase TOR (Target Of Rapamycin), cible de nombreuses voies de régulation de l'autophagie. Cette enzyme régule la croissance cellulaire, la progression du cycle cellulaire, l'importation de nutriments, la synthèse protéique et l'autophagie (Arsham & Neufeld, 2006) (Figure 1.17). Chez la levure, il existe deux gènes TOR (TOR1 et TOR2) mais il apparaît que tous les génomes de mammifères étudiés à ce jour ne contiennent qu'un seul gène codant pour la protéine TOR (mTOR, pour mammalian Target Of Rapamycin). mTOR est une protéine de haut poids moléculaire (280 kDa) qui appartient à la famille des phosphatidylinositol-related kinase (PIKK). Les membres de cette famille contiennent un domaine COOH-terminal partageant un haut degré de similarité avec le domaine catalytique des phosphatidylinositol-3 et phosphatidylinositol-4 kinases (Yang & Guan, 2007). Pour simplifier, on peut dire que mTOR existe sous la forme de deux complexes différents, mTORC1 et mTORC2. Ces deux complexes sont tous deux conservés au cours de l'évolution tant du point de vue structural que fonctionnel. Le complexe mTORC1 est sensible à la rapamycine et est composé de mTOR, d'une protéine de régulation associée à mTOR (Raptor) et d'une protéine apparentée à la sous-unité  $\beta$  du complexe protéique G/LST8 (mLST8/G $\beta$ L) (Kim *et al.*, 2002). Le complexe insensible à la rapamycine (mTORC2) est, quant à lui, composé de mTOR, de la protéine associée à mTOR qui est insensible à la rapamycine (Rictor), de G $\beta$ L, et de la protéine kinase activée par le stress (mSIN1) (Sarbasov *et al.*, 2004).

D'un point de vue fonctionnel, il est connu que mTORC1 contrôle la biogenèse des ribosomes, la synthèse protéique, l'importation de nutriments et l'autophagie. Des études ont montré que, dans des cellules de mammifères, deux protéines, la kinase p70S6K et la protéine 4E-BP1, liaient mTORC1 au contrôle de la traduction des ARN messagers (Arsham &

Neufeld, 2006) (voir point 1.5.2.1). Les fonctions de mTORC2 sont moins bien connues que celles de mTORC1 mais ce complexe pourrait être impliqué dans la régulation de la configuration du cytosquelette d'actine ainsi que dans la régulation d'Akt/PKB (Yang & Guan, 2007). En effet, il a récemment été montré que mTORC2 est également capable de phosphoryler Akt/PKB sur le résidu Ser473 (phosphorylation activatrice). Comme Akt/PKB agit en amont de mTORC1, il a été suggéré que mTORC2 pourrait donc réguler l'activité du complexe mTORC1 (Patingre *et al.*, 2008).

Le complexe mTORC1 est régulé négativement par l'hétérodimère TSC1/TSC2 (tuberous sclerosis factor 1, 2). En effet, la petite GTPase Rheb, lorsqu'elle est active (lie le GTP), est capable de réguler positivement l'action de mTORC1 par une interaction directe. Cependant, l'activité de Rheb est régulée par le complexe TSC1/TSC2 qui forme un GAP (GTPase activating protein) capable de convertir la forme active de Rheb en sa forme inactive et, de cette façon, inhibe la régulation positive de Rheb exercée sur mTORC1. De plus, la voie mTOR est contrôlée par les voies de signalisation activées par les facteurs de croissance via la voie de la PI3K de classe I.

Le senseur énergétique AMPK (AMP-activated kinase), qui est activé lors d'une augmentation du rapport AMP/ATP, est une enzyme capable d'inactiver mTORC1 par l'activation de TSC2 et donc l'inhibition de la GTPase Rheb (voir point 1.5.2.2). De plus, l'activation du suppresseur de tumeurs p53 est capable d'inhiber mTOR en activant l'AMPK (point 1.5.2.3). Ces différents mécanismes de régulation de mTOR seront abordés dans le prochain chapitre.

#### **b) La voie PI3K/Akt/PKB**

Comme nous l'avons déjà mentionné, l'autophagie est principalement régulée par la voie de signalisation des phosphatidylinositol 3-kinase de classe III (PI3K), modulée par la présence de nutriments, qui conduit, lorsqu'elle est activée à inhiber mTOR et à lever l'effet inhibiteur de cette dernière sur l'autophagie (Figure 1.17). La PI3K de classe I, activée en réponse aux facteurs de croissance comme l'insuline, est un régulateur négatif de l'autophagie. En effet, elle est activée indirectement suite à la liaison de l'insuline à son récepteur. Concrètement, l'activation de la PI3K de classe I permet la phosphorylation de lipides de la membrane plasmique qui vont recruter et activer la Ser/Thr kinase Akt/protéine kinase B (PKB), régulateur négatif de l'autophagie. PTEN (tumour suppressor phosphatase and tension homologue) déphosphoryle les phosphatidylinositols (3,4,5)-trisphosphates. Cette déphosphorylation prévient donc l'activation de la voie Akt/PKB. L'activation de la Ser/Thr kinase Akt/PKB inhibe alors deux régulateurs de la voie mTOR, TSC1 et TSC2 (tuberous sclerosis factor 1 et 2) (Baehrecke, 2005). Ces deux régulateurs positifs de l'autophagie inhibent, comme nous l'avons vu, la petite protéine GTPasique Rheb essentielle à l'activation de mTOR. En conclusion, l'effet de l'insuline se traduit par une inhibition de l'autophagie.

## ***1.5 Voies effectrices et régulateurs moléculaires communs à l'apoptose et à l'autophagie***

### **1.5.1 Connexions moléculaires entre l'apoptose et l'autophagie**

Comme nous venons de le voir, les mécanismes moléculaires et l'identification des voies de régulation impliquées dans l'autophagie sont de mieux en mieux décrites et le processus autophagique prend une place de plus en plus importante dans de nombreuses études portant sur la mort cellulaire (Maiuri et al., 2007b). Récemment, plusieurs voies reliant les machineries et les mécanismes de l'apoptose et de l'autophagie ont été mises en évidence. La relation fonctionnelle qui existe entre l'apoptose et l'autophagie est complexe dans le sens où, dans certaines conditions de stress, l'autophagie constitue un mécanisme d'adaptation et de protection qui permet à la cellule d'éviter la mort cellulaire (et *de facto* de supprimer l'apoptose). Cependant, comme expliqué précédemment, l'autophagie peut aussi constituer une voie alternative menant à la mort cellulaire (Baehrecke, 2005). De plus, il semble que des stimuli comparables (ROS,  $[Ca^{2+}]$ ,...) peuvent aussi bien induire l'apoptose que l'autophagie. Il a également été démontré que plusieurs effecteurs jouent un rôle dans les deux voies de mort cellulaire (Maiuri et al., 2007b).

#### ***1.5.1.1 La famille des protéines BH-3 only***

Les membres de la famille protéique « BH-3 only » comme Bid, Bik et Bad sont capables de se lier aux domaines BH-3 des protéines de la famille Bcl<sub>2</sub>. Cette interaction permet d'inhiber les effets anti-apoptotiques des membres de la famille Bcl<sub>2</sub> tels que Bcl<sub>2</sub> et Bcl<sub>XL</sub> ou d'activer la fonction pro-apoptotique d'autres membres de cette famille comme que Bax et Bak. La protéine autophagique Becline-1 a récemment été identifiée comme étant une protéine de type « BH-3 only » (Patingre & Levine, 2006). Comme les autres membres de cette famille, Becline-1 est capable d'interagir avec les protéines anti-apoptotiques de la famille Bcl<sub>2</sub> via son domaine BH-3. Bcl-2 et Bcl-XL jouent donc un rôle d'inhibition de l'autophagie en se fixant et en séquestrant la protéine Becline-1 (Patingre & Levine, 2006). Les domaines BH-3 d'autres protéines appartenant à la famille des protéines « BH-3 only » telles que Bad ont également été décrits comme étant capables de disrupter, de manière compétitive, l'interaction entre Becline-1 et Bcl<sub>2</sub> ou Bcl-XL. Cette interaction conduit à la libération de Becline-1 de son complexe inhibiteur et donc l'activation subséquente de l'autophagie médiée par l'activation de Vps34 (Figure 1.18) (Maiuri *et al.*, 2007a).

#### ***1.5.1.2 La protéine autophagique ATG5***

La protéine Atg5, impliquée dans la formation de l'autophagosome (voir point 1.4.3.1), semble également jouer un rôle important tant dans l'apoptose que dans l'autophagie (Yousefi *et al.*, 2006). En effet, il a été montré qu'une surexpression ectopique d'Atg5 induit l'autophagie. Il est également observé que dans des expériences de « knockout » ou « knockdown » visant à invalider le gène codant pour Atg5, l'autophagie est inhibée mais que la réponse apoptotique est également plus faible dans des cellules cancéreuses humaines

traitées en présence de staurosporine ou de doxorubicine (Yousefi et al., 2006). La protéine Atg5 pourrait donc avoir des rôles dans l'autophagie et dans l'apoptose. Ce « double rôle » est médié par une protéolyse régulée de la protéine Atg5 (Figure 1.19) (Yousefi et al., 2006). Ces auteurs montrent que suite à un stress létal, la protéine Atg5 (33 kDa) est clivée par les calpaïnes (activées en réponse à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique) en un fragment de 24 kDa (forme tronquée d'Atg5). Suite à ce clivage, ce fragment perd son activité pro-autophagique et acquiert une fonction pro-apoptotique. En effet, ce fragment peut être transloqué dans la membrane mitochondriale externe où il participe à l'ouverture du PTP. Cette ouverture du PTP par le fragment de 24 kDa d'Atg5 est médiée par l'inhibition de l'action de Bcl-XL sur le pore. Un deuxième mécanisme identifié propose que Atg5 interagisse directement avec FADD (Fas-Associated Death Domain) induisant la mort cellulaire par un mécanisme dépendant des caspases comme la caspase-8 (Pyo *et al.*, 2005). De plus, il a été montré que l'interaction « protéine-protéine » avec FADD est nécessaire pour l'induction de l'apoptose mais pas pour permettre l'étape de vacuolisation dans l'autophagie. La protéine Atg5 est donc capable d'induire l'apoptose par différents mécanismes mais est également un effecteur moléculaire central impliqué dans la connexion entre l'apoptose et l'autophagie.

### ***1.5.1.3 Stress oxydatif et concentration calcique***

Le stress oxydatif est un stress qui permet l'activation de l'apoptose et de l'autophagie (Brookes et al., 2004, Hoyer-Hansen & Jaattela, 2007). Comme expliqué précédemment, le stress oxydatif a un rôle pro-apoptotique car les ROS favorisent la perméabilisation de la membrane mitochondriale suite à l'ouverture du PTP entraînant la libération de facteurs pro-apoptotiques. Cependant, ce stress est également capable d'augmenter l'activité protéolytique d'Atg4 favorisant de cette manière l'autophagie (Scherz-Shouval *et al.*, 2007).

Un autre élément important capable de réguler les deux réponses de mort cellulaire est la concentration en calcium cytosolique. En effet, une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_c$ , résultant d'un efflux du réticulum endoplasmique ou d'un influx de calcium extracellulaire peut mener à une augmentation de la concentration en calcium dans la matrice mitochondriale ( $[Ca^{2+}]_{mt}$ ) constituant un signal pro-apoptotique (Rizzuto & Pozzan, 2006). D'autre part, il a également été montré qu'une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_c$  peut induire l'autophagie par un mécanisme dépendant de la calmoduline kinase  $\beta$  (CaMKK $\beta$ ) une enzyme qui active les calmodulines kinases (Hoyer-Hansen & Jaattela, 2007). La calmoduline kinase  $\beta$  activerait également l'AMPK qui, à son tour, inhiberait mTOR permettant ainsi de lever l'effet inhibiteur exercé par cette enzyme sur le déclenchement de l'autophagie (Maiuri et al., 2007b).

## **1.5.2 Voies régulatrices partagées par l'apoptose et l'autophagie**

### **1.5.2.1 La voie des PI3K / Akt/PKB cible la voie de mTOR**

#### **a) La voie PI3K et Akt/PKB**

La voie de signalisation PI3K/Akt/PKB est aujourd'hui reconnue comme une voie essentielle de la régulation de la survie cellulaire. Comme déjà mentionné au paragraphe 1.4.3.2, Akt/PKB est une Ser/Thr kinase activée en aval de la PI3K et capable d'inhiber l'autophagie par son action activatrice sur mTOR (Figure 1.17). Cependant, la voie PI3K / Akt/PKB est également décrite comme étant une voie qui permet à la cellule de résister aux stimuli apoptotiques (Yao & Cooper, 1995). Cet effet anti-apoptotique de la voie PI3K / Akt/PKB peut être expliqué par au moins deux mécanismes principaux. Le premier concerne la protéine pro-apoptotique Bad (membre de la famille Bcl-2 capable de se lier aux protéines Bcl-2 et Bcl-XL et d'inhiber leur activité anti-apoptotique). En effet, Akt/PKB est capable de phosphoryler Bad sur la Ser136 empêchant sa liaison avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL. Cette absence de séquestration des molécules anti-apoptotiques par les molécules pro-apoptotiques comme Bad protégerait donc la cellule de l'apoptose (Datta *et al.*, 1999). Un deuxième mécanisme par lequel Akt/PKB pourrait inhiber l'apoptose serait sa capacité à inhiber la caspase-9. En effet, Akt/PKB peut phosphoryler la caspase-9 sur la Ser196 ce qui entraîne une diminution de son activité (Song *et al.*, 2005).

#### **b) La voie mTOR**

De nombreux arguments de la littérature sont en faveur de l'hypothèse selon laquelle mTOR agirait comme un régulateur principal dans le catabolisme et l'anabolisme cellulaires (Arsham & Neufeld, 2006). En effet, mTOR est capable de phosphoryler et d'activer les kinases ribosomales S6 (p70S6K1 et p70S6K2), nécessaires à l'augmentation de la traduction de certains ARNm. De plus mTOR phosphoryle et inactive la protéine 4E-BP1 permettant, de cette manière, la traduction d'ARNm possédant une coiffe en 5'. Enfin, mTOR peut induire indirectement la déphosphorylation du facteur d'élongation eucaryote eIF2 $\alpha$ , favorisant la traduction (Inoki & Guan, 2006). Ces différentes actions démontrent que l'activation de mTOR favorise la synthèse protéique, la croissance et la prolifération cellulaire exerce un effet inhibiteur sur l'autophagie (voir paragraphe 1.4.3.2).

Cependant, il a également été montré que mTOR est impliquée dans le contrôle de l'apoptose (Castedo *et al.*, 2002). Il est en effet possible, du moins dans certaines conditions, que la voie mTOR soit inactivée durant l'apoptose. Il a notamment été rapporté qu'un traitement des cellules 3T3 et HEK 293 (human embryonic kidney cells 293) avec la staurosporine mène à la déphosphorylation de p70S6K et 4E-BP1, deux cibles en aval de mTOR. Ces auteurs montrent que cette inhibition de mTOR par la STS qui se produit bien avant l'activation des caspases, n'est pas le résultat d'une inhibition directe de mTOR et ne dépend pas de l'inhibition des PKCs (Tee & Proud, 2001).

La protéine mTOR pourrait également agir comme un inhibiteur de l'apoptose (Figure 1.20). En effet, certaines études ont montré que la rapamycine (inhibiteur de mTOR) est capable d'induire l'apoptose dans certains types cellulaires par exemple, dans des cellules T CD4<sup>+</sup> qui interagissent avec l'enveloppe glycolytique du virus HIV-1 (voir point 1.4.2.2). Mécanistiquement, il semble que la protéine p70S6K, à l'instar d'Akt/PKB, serait capable de phosphoryler Bad sur la Ser136 empêchant de ce fait sa liaison aux protéines anti-



apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL en membrane mitochondriale. De plus, dans ces conditions, mTOR serait capable de migrer dans le noyau et de phosphoryler la protéine p53 sur la sérine 15, étape essentielle mais non suffisante à son activation (Pietsch *et al.*, 2008b). Cette phosphorylation aura pour effet l'activation transcriptionnelle de p53 conduisant à l'expression de protéines pro-apoptotiques comme Bax et la mort cellulaire par la voie mitochondriale (Castedo *et al.*, 2002).

L'ensemble de ces données bibliographiques montrent que les voies PI3K et mTOR peuvent jouer un rôle tant dans l'apoptose que dans l'autophagie mais en plus que les effets de ces voies de signalisation peuvent conduire à des réponses différentes en fonction du stimulus considéré et du type cellulaire étudié.

### **1.5.2.2 La voie de l'AMPK**

L'AMPK (AMP kinase) est une protéine intracellulaire décrite comme étant le senseur énergétique de la cellule (Hadad *et al.*, 2008). Celle-ci est inactive en conditions basales et est activée par phosphorylation (Thr 172) par une kinase en amont (AMPKK ou LKB1) en réponse à un stress cellulaire énergétique (Hoyer-Hansen & Jaattela, 2007). Une augmentation du rapport AMP/ATP entraîne une activation allostérique de l'enzyme qui devient alors sensible à la kinase activatrice en amont. L'activation de l'AMPK est induite par un manque de glucose ou un stress oxydatif. Une fois activée, l'AMPK peut restaurer le niveau énergétique de la cellule en stimulant les voies cataboliques et en réduisant la consommation d'ATP suite à la répression d'activités consommatrices en ATP telles que la synthèse d'acides gras, de cholestérol et de protéines (Hadad *et al.*, 2008). D'autre part, il a également été montré qu'une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_c$  peut induire l'autophagie en activant la CaMKK $\beta$  capable d'activer la voie AMPK $\beta$ -TSC1/2-Rheb-mTORC1 (Figure 1.21) (Hoyer-Hansen & Jaattela, 2007).

Des études réalisées *in vitro* montrent que l'apoptose induite par une perte d'énergie cellulaire est due à l'activation de la voie mitochondriale suite à la translocation de Bax dans la MME. Le mécanisme par lequel une diminution du contenu en ATP peut induire la translocation de Bax n'est pas complètement élucidé. Une hypothèse proposée est que l'AMPK pourrait jouer un rôle important. En effet, des études ont montré que la translocation de Bax durant l'ischémie de cardiomyocytes est un processus en aval de l'activation de l'AMPK et nécessite la p38 MAPK activée par l'AMPK (Capano & Crompton, 2006) De plus, l'AMPK contribue également à induire l'apoptose de kératinocytes humains exposés aux UV ou à l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> par un mécanisme dépendant de l'activité de p38 MAPK et de la phosphorylation de p53 sur la Ser 15 (Cao *et al.*, 2008).

L'AMPK joue donc non seulement un rôle dans le maintien de la survie cellulaire mais également dans la réponse apoptotique causée par un déficit en énergie dans la cellule.

Il est donc légitime de se poser la question de savoir qu'elle est la place de l'AMPK dans la réponse autophagique ? Depuis plusieurs années, on sait que mTOR peut agir comme un senseur énergétique. Par exemple, des cellules cultivées dans un milieu pauvre en glucose montrent une forte diminution de la phosphorylation de la protéine p70S6K médiée par mTOR. Dans ces conditions, la diminution de la traduction protéique impliquerait l'AMPK affectant l'activation de mTOR. En effet, en condition de stress énergétiques cellulaires, l'AMPK phosphoryle et active TSC2 ce qui a pour conséquence principale d'inhiber l'activité de mTORC1 menant à l'inhibition de la traduction protéique et à l'activation de l'autophagie (Yang & Guan, 2007).

### 1.5.2.3 La protéine p53

Le facteur suppresseur de tumeurs p53 est un élément essentiel dans le maintien de l'intégrité génomique et le contrôle de la prolifération cellulaire (Pietsch et al., 2008b). L'expression du gène codant pour la protéine p53 et l'activité de cette dernière sont extrêmement régulées. Par exemple, en réponse à un stress causé par des agents capables d'endommager l'ADN, et de provoquer des cassures double brins, p53 est stabilisé et activé de manière transitoire. Cette activation a pour effet d'inhiber la progression du cycle cellulaire et d'induire la sénescence ou l'apoptose (Pietsch et al., 2008b).

Le rôle de p53 dans l'apoptose peut être décrit par, au moins, deux grands mécanismes. Tout d'abord, il existe une forte régulation de l'expression du gène p53 et donc une forte régulation de l'abondance de la protéine. De plus, la stabilité de la protéine est régulée par Mdm2 (Zamzami & Kroemer, 2005). Le mécanisme le mieux décrit pour expliquer le rôle de p53 dans l'apoptose est la voie dépendante de la transcription (Pietsch et al., 2008b). Le facteur de transcription p53 activé se lie aux promoteurs de gènes cibles. Parmi ceux-ci, on retrouve des gènes codant pour des protéines à fonction pro-apoptotiques telles que Apaf-1, Bax, la caspase-1, la caspase-6, la cathepsine D et des protéines BH-3 only (PUMA, NOXA). Une fois lié aux régions promotrices des gènes cibles, p53 recrute d'autres facteurs de transcription ainsi que des co-facteurs pourvus d'une activité « histones acétyltransférase » (HAT) capable d'acétyler les résidus lysines des histones et d'augmenter l'accessibilité de l'ADN à la machinerie de transcription (Pietsch et al., 2008b).

Différentes études ont également montré que p53 induit également l'apoptose par des mécanismes indépendants de la transcription (Pietsch et al., 2008b). Ainsi, il a été montré que p53 peut directement activer des protéines de la machinerie apoptotique suite à sa translocation dans la mitochondrie. Cette translocation est suivie d'une perte du potentiel de la membrane mitochondriale, de l'activation des caspases et de la réponse apoptotique (Marchenko *et al.*, 2000). Cette régulation de l'apoptose au niveau de la mitochondrie par p53 se ferait par une régulation impliquant des changements de conformations des membres de la famille Bcl-2 (parragraphe 1.3.1.2).

Dans ces conditions, la protéine p53 semble avoir un mécanisme d'action analogue aux protéines « BH3-only ». En effet, p53 interagit avec les protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl2 et est capable de moduler leur(s) fonction(s). La protéine p53 interagit physiquement avec Bak permettant, suite à un changement de conformation, sa dissociation de la protéine inhibitrice Mcl-1. La protéine p53 induit également des modifications conformationnelles permettant l'oligomérisation de Bak dans la MME et la libération du Cyt c de la mitochondrie (Pietsch *et al.*, 2008a). Il a également été montré que p53 provoque l'oligomérisation de Bax et la libération du Cyt c en disruptant l'interaction entre Bax et la protéine anti-apoptotique Bcl-XL (Chipuk *et al.*, 2004). Ce facteur, bien connu pour sa fonction de facteur de transcription, est donc également capable d'interagir physiquement et d'inhiber les membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 comme les protéines Bcl-2 et Bcl-XL.

L'autophagie est également un processus cellulaire régulé par p53 qui a été décrit très récemment (Levine & Abrams, 2008). En effet, plusieurs études ont montré que p53 régule positivement l'autophagie. Le mécanisme par lequel p53 serait capable d'induire l'autophagie n'est pas encore complètement élucidé mais il semble impliquer l'activation de l'AMPK par p53 et des fonctions dépendantes de la transcription telles que la surexpression d'inhibiteurs de la voie mTOR (PTEN, Phosphatase and TENsin homolog, TSC1, tuberous

sclerosis complex 1, DRAM, Damage- Regulated Autophagy Modulator) (Feng *et al.*, 2005) (Feng *et al.*, 2007). Ces différents effets de l'autophagie médiés par p53 sont spécifiques du stimulus ainsi que du type cellulaire (Levine & Abrams, 2008). Cependant, récemment, des auteurs ont remis en question le fait que p53 agisse toujours comme un effecteur positif de l'autophagie (Tasdemir *et al.*, 2008). Selon les conditions expérimentales, p53 serait donc capable de réguler l'autophagie de manière opposée (Figure 22. a et b).

#### ***1.5.2.4 La dynamique mitochondriale***

Pour terminer ajoutons que la dynamique du réseau mitochondrial contrôlé par les phénomènes de fusion/fission dont les effecteurs moléculaires sont respectivement les mitofusines 1 et 2 (Mfn1, Mfn2), Opa1 et Fis1, Drp1 n'ont pas que des impacts sur la morphologie de la population de l'organite. En effet, lors de la fusion/fission, les mitochondries échangent des composants membranaires et de l'ADNmt (Chan, 2006b). Des dommages dans une proportion de l'organite peuvent donc être restaurés par la fusion avec des mitochondries saines (Detmer & Chan, 2007). De plus, les parties non fonctionnelles et endommagées du réseau mitochondrial peuvent être séparées par la fission et sélectivement éliminées par autophagie. Ce mécanisme permettrait d'éviter la libération des protéines pro-apoptotiques et protégerait donc les cellules du dysfonctionnement mitochondrial (Kim *et al.*, 2007). La dynamique mitochondriale est également importante au cours de l'apoptose puisque l'organite subit une fragmentation massive au cours de ce processus (James *et al.*, 2003).

## ***1.6 Contexte de la recherche et objectifs du mémoire***

### **1.6.1 Contexte**

Avant de décrire les trois objectifs de ce mémoire, il est important de rappeler le contexte des recherches précédentes menées au laboratoire et portant sur la compréhension des mécanismes responsables de l'augmentation de la sensibilité à l'apoptose induite dans des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial. Premièrement, nous avons caractérisé l'apoptose de cellules complètement déplétées en ADNmt (cellules  $\rho^0$  143 B) en réponse à la STS (Ludovic Mercy : thèse de doctorat présentée en mars 2008). Dans ce travail, Ludovic Mercy a montré que les cellules complètement déplétées en ADNmt sont plus sensibles à la STS mais que le rôle de la caspase-3 dans l'apoptose de ces cellules pourrait être marginal. Par contre, une forte diminution de l'expression de Bcl-2 dans les cellules 143B  $\rho^0$  pourrait expliquer la plus forte activation de la caspase-3 dans ces conditions. Cependant, l'inhibition de l'activité des caspases à l'aide du Z-VAD-fmk ne protège pas les cellules déplétées en ADNmt de la mort cellulaire induite par la STS. De plus, une contribution de la cathepsine B, libérée à partir des lysosomes, pourrait également jouer un rôle dans l'apoptose des cellules déplétées en ADNmt induite par la STS. Dans le but d'étendre ces données, Guillaume Rommelaere (FRIA, thèse en cours) a également montré que des cellules présentant une diminution de l'activité mitochondriale telles que des cellules cybrides MERRF (cellules  $\rho^0$  143B repeuplées avec des mitochondries portant la mutation A8344G) présentent également une sensibilité plus importante aux inducteurs apoptotiques comme la STS (Figure 1.23 A et B). Ces données convergentes supportent le fait que les cellules présentant une diminution ou une absence d'activité mitochondriale sont moins résistantes (ou plus sensibles) à la mort cellulaire induite par des inducteurs apoptotiques. De plus, dans le

cadre de son mémoire, Jeremy Malaisse a cherché à savoir si les cellules cybrides portant la mutation mitochondriale MERRF sont également plus sensibles à la mort cellulaire induite par d'autres inducteurs apoptotiques que la STS comme le TNF- $\alpha$ , TRAIL ou l'étoposide. De plus, il a également montré que des cellules cybrides portant une autre mutation mitochondriale telle que la mutation A3243G (responsable du syndrome MELAS) sont également plus sensibles à l'apoptose induite.

Cependant, les mécanismes par lesquels la mort cellulaire se déroule en réponse à la staurosporine dans des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial, et la relation (éventuelle) qui existerait entre l'apoptose et l'autophagie dans le cadre de la mort cellulaire induite par l'alcaloïde dans ces cellules sont encore très peu connus.

## **1.6.2 Objectifs du mémoire**

Les découvertes récentes décrites dans cette introduction relatives à la relation entre l'apoptose et l'autophagie dans la mort cellulaire soulignent que les voies de mort cellulaires apoptotique et autophagique peuvent être interconnectées. Cette affirmation repose sur le fait que ces deux programmes de mort cellulaires partagent des mécanismes et des effecteurs en commun (Maiuri et al., 2007b). De plus, de nombreuses données de la littérature suggèrent que, dans plusieurs modèles de mort cellulaire, une relation entre l'apoptose et l'autophagie existe (Levine & Yuan, 2005). Dans ce mémoire, nous allons donc essayer de mettre en évidence d'éventuelles relations entre l'apoptose et l'autophagie dans la mort cellulaire induite par la staurosporine dans des cellules cybrides sauvages et dans des cellules cybrides mutées MERRF étant porteuses de la mutation ponctuelle A8344G dans l'ADN mitochondrial.

Les principaux objectifs de ce mémoire sont au nombre de trois. Le premier objectif étant de caractériser la réponse autophagique dans les deux lignées cellulaires lors d'une stimulation à la staurosporine et d'implémenter et/ou de développer les techniques nécessaires à la mise en évidence des marqueurs moléculaires permettant de l'étudier. Le deuxième objectif étant de tenter d'identifier et de déterminer l'état d'activité de certains effecteurs moléculaires par lesquels la staurosporine pourrait induire l'autophagie dans ces lignées cellulaires. Enfin, dans la troisième partie de ce mémoire, nous avons commencé à nous intéresser à la relation réciproque entre l'apoptose et l'autophagie dans les deux lignées cellulaires stimulées par la STS. Nous avons donc recherché les effets de l'inhibition d'une des voies de mort cellulaire (autophagie) et nous avons analysé les effets sur l'autre voie afin de mettre en évidence une éventuelle interrelation entre ces deux voies dans la mort cellulaire induite par la STS. Enfin, dans l'ensemble de ce travail, nous avons tenté de mettre en évidence et de caractériser une éventuelle réponse différentielle entre les cellules cybrides mutées MERRF et les cellules sauvages contrôles répondant à la STS.

## **2 Matériel et méthodes**

### ***2.1 La culture cellulaire***

#### **2.1.1 Modèle cellulaire utilisé**

Au cours de cette étude, un modèle de cellules cybrides a été utilisé. Ces cellules portent une mutation à l'état homoplasmique dans leurs copies d'ADN mitochondrial (A8344G) qui est responsable de l'apparition du syndrome MERRF. Elles sont utilisées dans le but d'étudier la réponse cellulaire à un dysfonctionnement mitochondrial et pour tenter de préciser le rôle des mitochondries dans la mort cellulaire induite. Cette lignée cellulaire provient de la fusion de cellules 143B (ostéosarcome humain) totalement déplétées en ADNmt ( $\rho^0$  143B) avec des plaquettes de patients porteurs de la mutation A8344G MERRF (que nous appellerons cellules cybrides mutées dans la suite de ce travail) ou avec des plaquettes provenant d'individus sains (cellules cybrides sauvages). Ces cellules ont été généreusement offertes par le Prof. Ramon Marti (Centre d'Investigation en Biochimie et en Biologie Moléculaire, CIBBIM, Barcelone, Espagne).

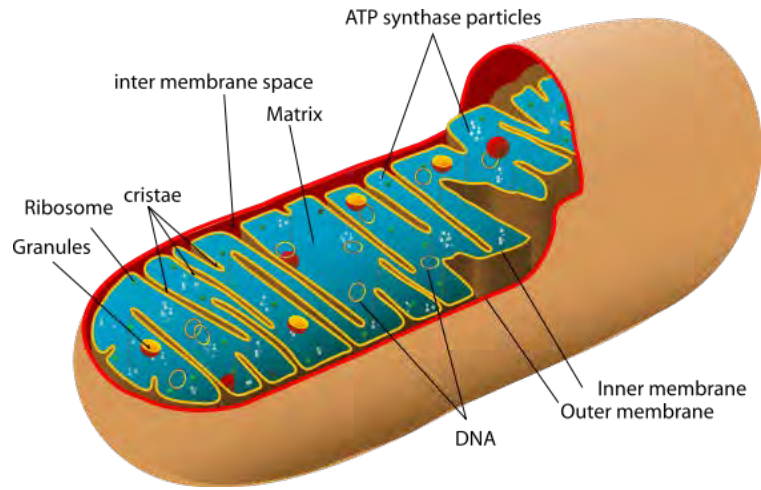
#### **2.1.2 Maintien des cultures et repiquages cellulaires**

Les lignées cellulaires sont maintenues en culture dans des boîtes de 75 cm<sup>2</sup> (Costard, France) en présence de 15 ml de milieu DMEM (Dulbecco Modified Eagle's Medium) contenant 4,5 g·L<sup>-1</sup> de glucose et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) (Gibco, BRL, Paisley, Angleterre). Les cellules sont maintenues à 37 °C dans une étuve humide (Heraeus, Hassau, Allemagne) dans une atmosphère contenant 5 % de CO<sub>2</sub>.

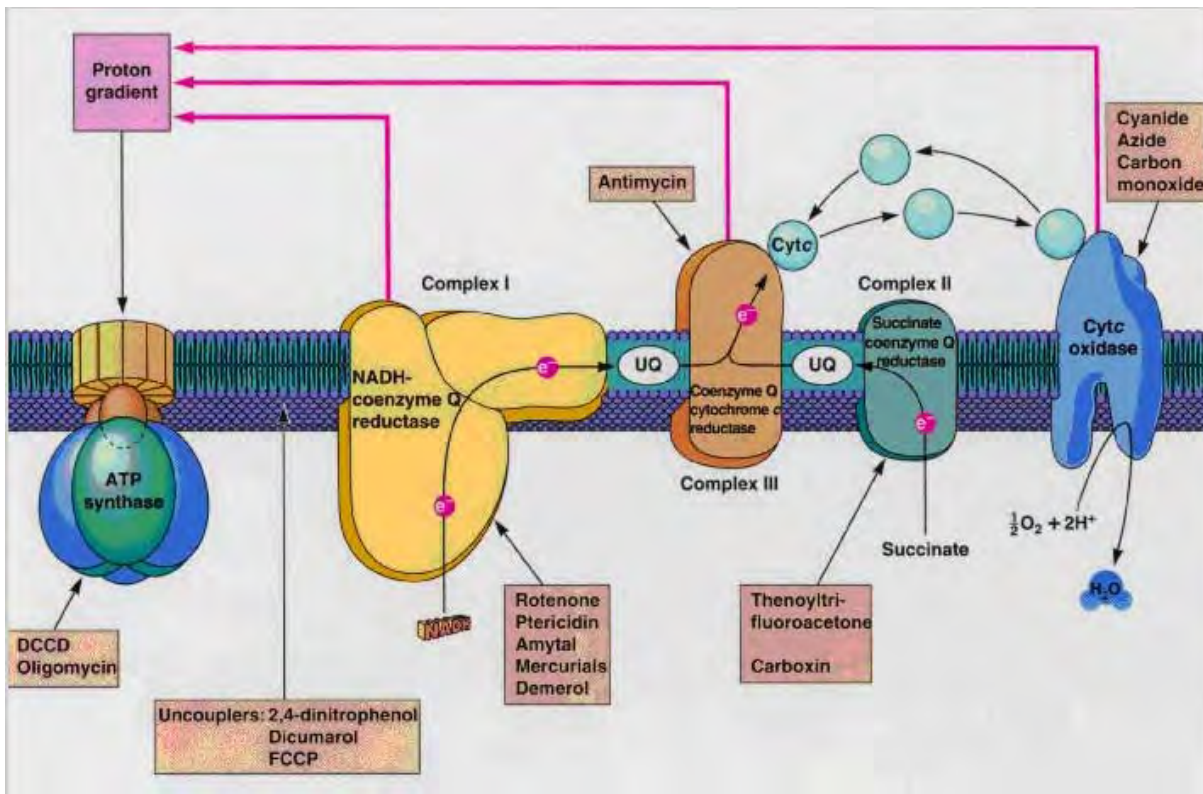
Les cellules sont sous-cultivées trois fois par semaine. Lors de ces repiquages, les milieux de cultures sont décantés et les cellules sont rincées avec 7 ml de PBS (Phosphate Buffer Saline : 150 mM NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/KHPO<sub>4</sub> ; pH 7,4 ; BioWhittaker, Walkersville, MD, USA) préchauffé à 37 °C. Ensuite, les cellules sont trypsinisées à l'aide de 1 ml de trypsin 0,25 % (Gibco, BRL, Paisley, Angleterre) puis resuspendues dans du milieu DMEM contenant 4,5 g·L<sup>-1</sup> de glucose et 10 % de SVF. La suspension cellulaire est ensuite répartie dans de nouvelles boîtes de cultures de 75 cm<sup>2</sup> dans un volume final de 15 ml à une dilution de 1/10 et 1/6 pour, respectivement, les cellules cybrides sauvages et mutées. Ceci afin de tenir compte des temps de doublement cellulaire différents pour les deux lignées et donc de maintenir les cellules à une densité comparable dans les deux types cellulaires au cours de la culture.

### ***2.2 Le modèle d'apoptose induite par la staurosporine***

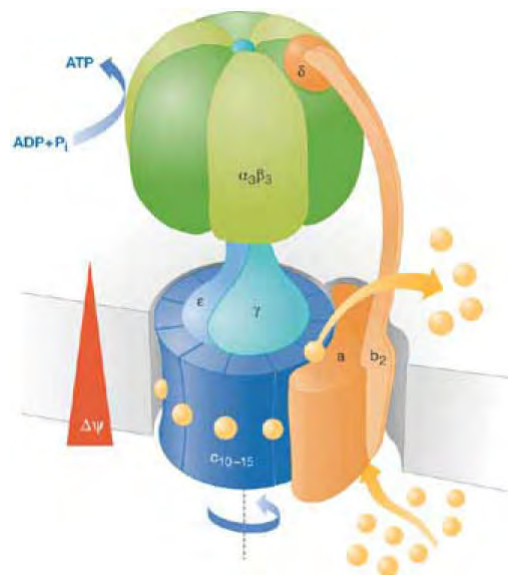
Dans nos expériences, 1.10<sup>6</sup> de cellules cybrides sauvages et 1,5.10<sup>6</sup> de cellules cybrides mutées sontensemencées dans des boîtes de 75 cm<sup>2</sup> deux jours avant d'être incubées en présence d'un inducteur apoptotique comme la staurosporine (STS) (Sigma, St Louis, USA). Le nombre de cellulesensemencées est différent en fonction de la lignée cellulaire. En effet, les cellules cybrides mutées (atteintes par un dysfonctionnement mitochondrial) ont un cycle cellulaire plus long que les cellules cybrides sauvages. La staurosporine, diluée dans du milieu DHG contenant 4,5 g·L<sup>-1</sup> de glucose et 10 % de SVF, est ajoutée à une concentration



**Figure 1.1.: Schéma général de la structure de la mitochondrie.** La mitochondrie est délimitée par une double membrane : une membrane externe perméable aux molécules d'un poids moléculaire inférieur à 10 kDa et une membrane interne imperméable formée de replis (crêtes mitochondriales) contenant essentiellement les protéines de la phosphorylation oxydative. L'espace situé entre la MME et la MMI, où espace intermembranaire contient de nombreuses protéines délocalisables telles que des protéines pro-apoptotiques. La matrice mitochondriale contient, quant à elle, notamment l'ADN mitochondrial, des ribosomes mitochondriaux et les ARNt mitochondriaux responsables de la synthèse protéique dans les mitochondries. ([www.wikipedia.com](http://www.wikipedia.com))



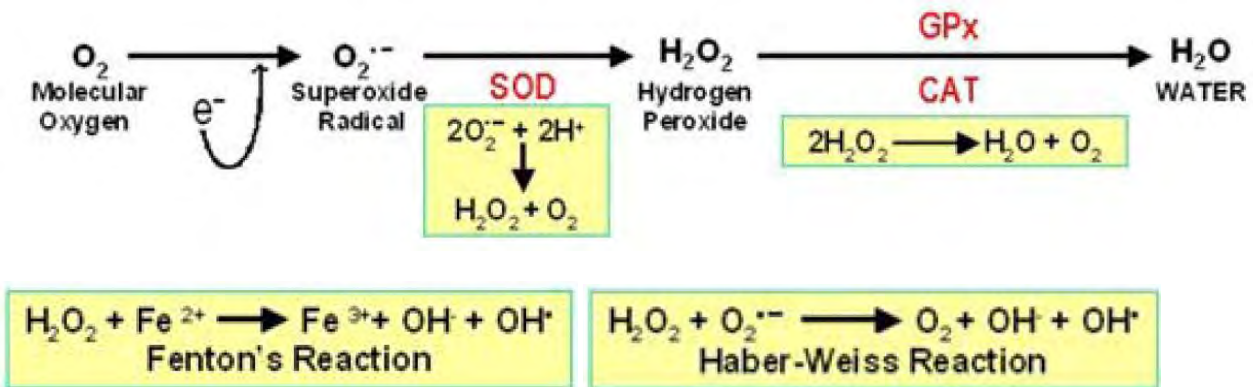
**Figure 1.2 : Représentation schématique des complexes de la phosphorylation oxydative.** Les électrons alimentant la chaîne de transporteurs d'électrons proviennent du NADH ou du FADH<sub>2</sub>. Au cours du passage des électrons à travers les complexes I, III et IV, des protons sont expulsés dans l'espace intermembranaire, ce qui permet l'établissement d'un gradient de protons et d'un potentiel électrochimique de membrane de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne. Des inhibiteurs des différents complexes sont également représentés ([www.microbialfuelcell.org](http://www.microbialfuelcell.org)).



**Figure 1.3 : Représentation schématique de la structure du complexe V.** La partie F<sub>0</sub> constitue un canal à protons qui permet le retour des H<sup>+</sup> dans la membrane mitochondriale. Ce faisant, ils entraînent un mouvement de rotation de la partie F<sub>0</sub>, qui est transmis à la sous-unité F<sub>1</sub> qui catalyse, suite aux changements conformationnels des sous-unités α et β, la production d'ATP (Dimroth, von Ballmoos et al. 2006).





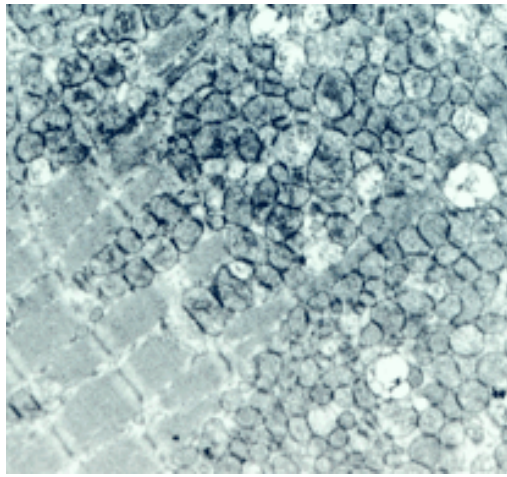


**Figure 1.4 : Réduction monovalente de l'oxygène, génération de ROS et enzymes antioxydantes.** Lorsqu'un électron est transféré sur l' $O_2$ , il y a génération du radicale anionique de super-oxyde ( $O_2^{\cdot-}$ ) qui après dismutation spontanée ou catalysée par la SOD génère du  $H_2O_2$ . Celui-ci peut être transformé en  $\cdot OH$  par les réactions de Fenton et de Haber-Weiss ou être converti en  $H_2O$  par la glutathione peroxydase (Kakkar and Singh 2007).

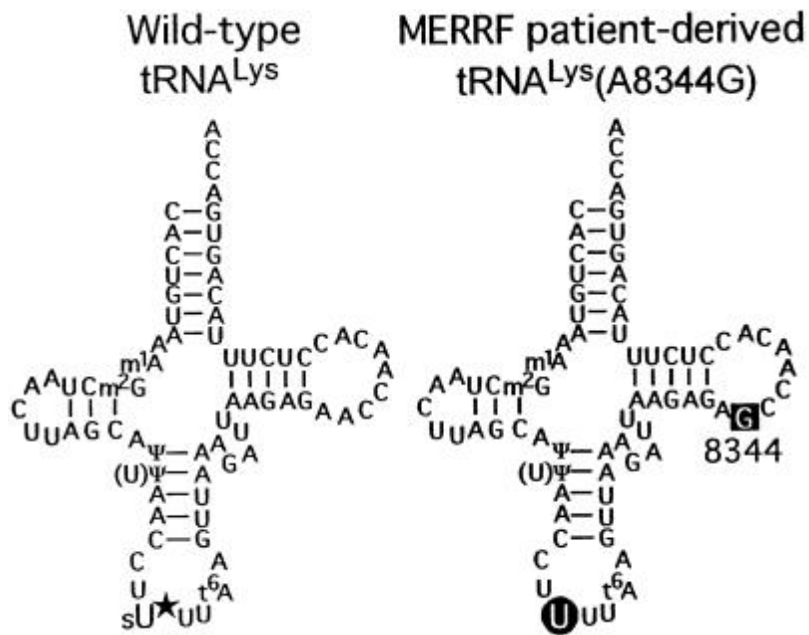
Mitochondrial DNA Disorder	Clinical phenotype	mtDNA genotype	Gene	Status	Inheritance
Kearns–Sayre syndrome	Progressive myopathy, ophthalmoplegia, cardiomyopathy	A single, large-scale deletion	Several deleted genes	Heteroplasmic	Usually sporadic
CPEO	Ophthalmoplegia	A single, large-scale deletion	Several deleted genes	Heteroplasmic	Usually sporadic
Pearson syndrome	Pancytopenia, lactic acidosis	A single, large-scale deletion	Several deleted genes	Heteroplasmic	Usually sporadic
MELAS	Myopathy, encephalopathy lactic acidosis, stroke-like episodes	3243A>G; 3271T>C	<i>TRNL1</i>	Heteroplasmic	Maternal
		Individual mutations	<i>ND1 and ND5</i>	Heteroplasmic	Maternal
MERRF	Myoclonic epilepsy, myopathy	8344A>G; 8356T>C	<i>TRNK</i>	Heteroplasmic	Maternal
NARP	Neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa	8993T>G	<i>ATP6</i>	Heteroplasmic	Maternal
MILS	Progressive brain-stem disorder	8993T>C	<i>ATP6</i>	Heteroplasmic	Maternal
MIDD	Diabetes, deafness	3243A>G	<i>TRNL1</i>	Heteroplasmic	Maternal
LHON	Optic neuropathy	3460G>A	<i>ND1</i>	Hetero- or homoplasmic	Maternal
		11778G>A	<i>ND4</i>	Hetero- or homoplasmic	Maternal
		14484T>C	<i>ND6</i>	Hetero- or homoplasmic	Maternal
Myopathy and diabetes	Myopathy, weakness, diabetes	14709T>C	<i>TRNE</i>	Hetero- or homoplasmic	Maternal
Sensorineural hearing loss	Deafness	1555A>G	<i>RNR1</i>	Homoplasmic	Maternal
		Individual mutations	<i>TRNS1</i>	Hetero- or homoplasmic	Maternal
Exercise intolerance	Fatigue, muscle weakness	Individual mutations	<i>CYB</i>	Heteroplasmic	Sporadic
Fatal, infantile encephalopathy; Leigh/Leigh-like syndrome	Encephalopathy, lactic acidosis	10158T>C; 10191T>C	<i>ND3</i>	Heteroplasmic	Sporadic

*ATP6*, ATPase 6; CPEO, chronic progressive external ophthalmoplegia; *CYB*, cytochrome *b*; LHON, Leber hereditary optic neuropathy; MELAS, mitochondrial myopathy, encephalopathy, lactic acidosis and stroke-like episodes; MERRF, myoclonic epilepsy and ragged-red fibres; MIDD, maternally-inherited diabetes and deafness; MILS, maternally-inherited Leigh syndrome; *ND1,3–6*, NADH dehydrogenase subunits 1,3–6; NARP, neurogenic weakness, ataxia and

**Tableau 1.1 : Pathologies causées par des mutations ou des délétions dans le génome mitochondrial et leurs caractéristiques (Taylor and Turnbull 2005).**

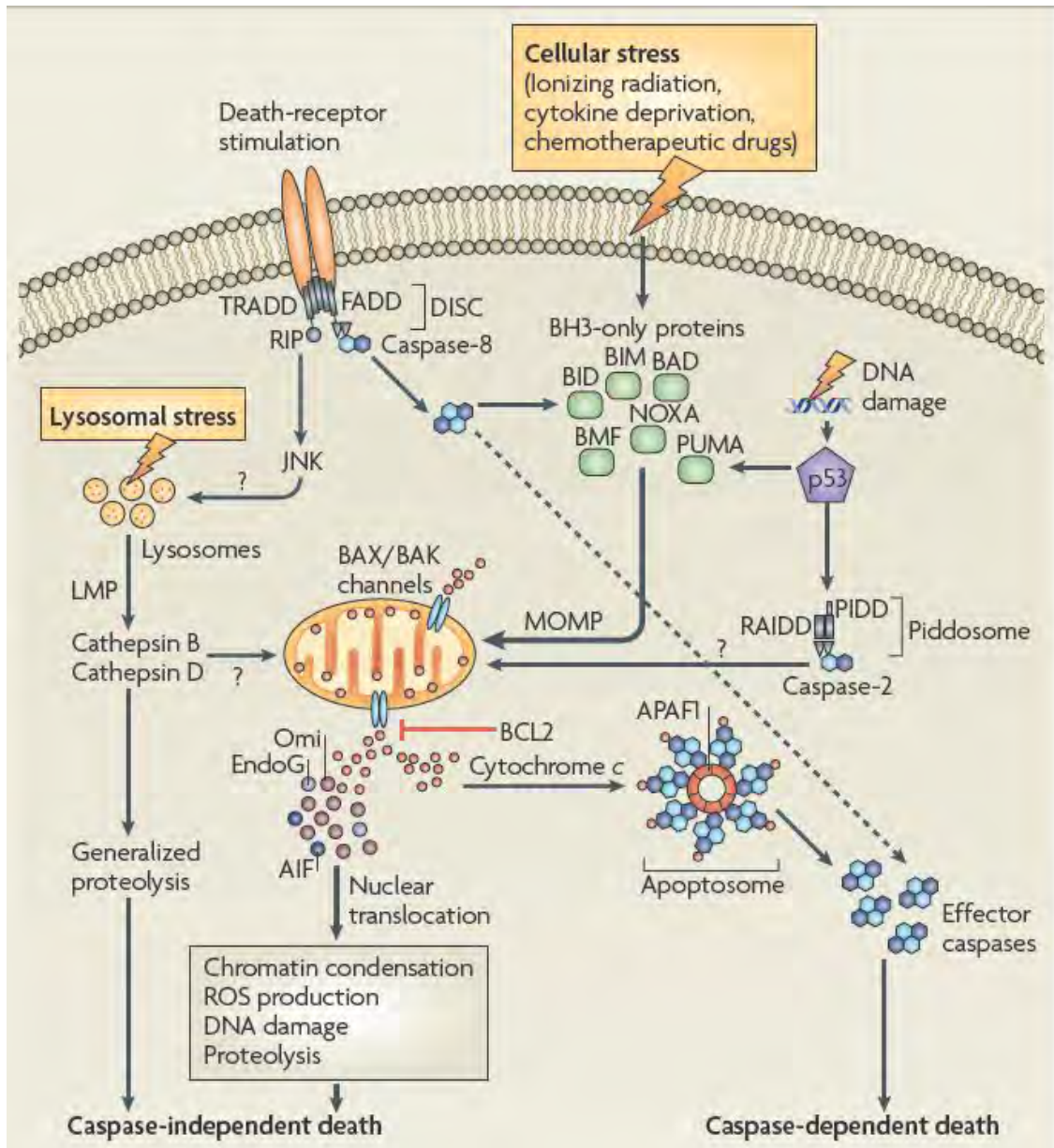


**Figure 1.5 :** Prolifération anormale de mitochondries et dégénération des éléments contractiles dans une « fibre rouge déchiquetée » de souris (Wallace 1999).

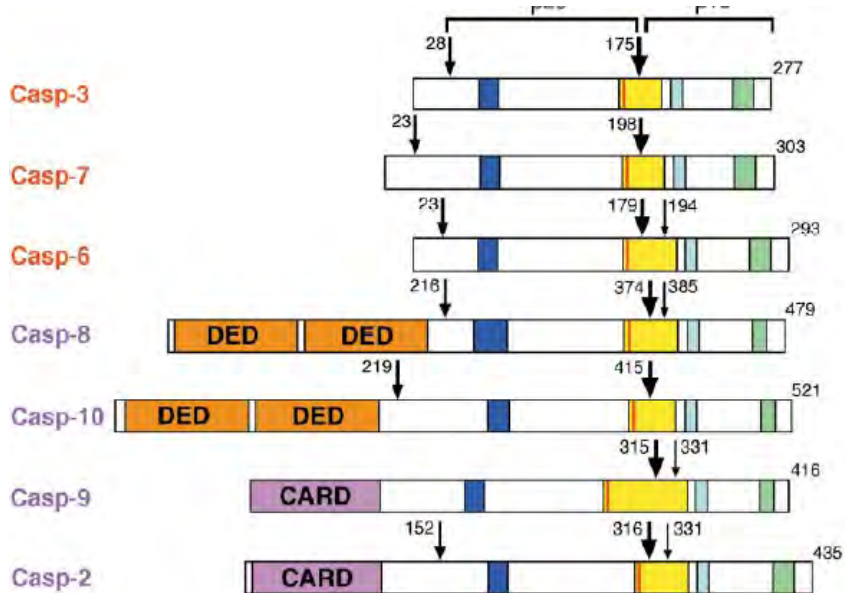


**Figure 1.6 :** Localisation de la mutation MERRF (A8344G) sur l'ADNmt sur l'ARNt<sup>Lys</sup>. A gauche, l'ARNt mitochondrial porteur de la lysine, à droite, l'ARNt<sup>Lys</sup> touché par la mutation MERRF (A8344G). Une guanine remplace une adénine en position 8344. Suite à cette mutation, l'uridine (entourée d'un rond noir) ne subit pas de modification post-transcriptionnelle contrairement à la forme sauvage, ce qui engendre des problèmes dans la reconnaissance codon-anticodon lors de la traduction des protéines mitochondriales (Yasukawa, Suzuki et al. 2001).

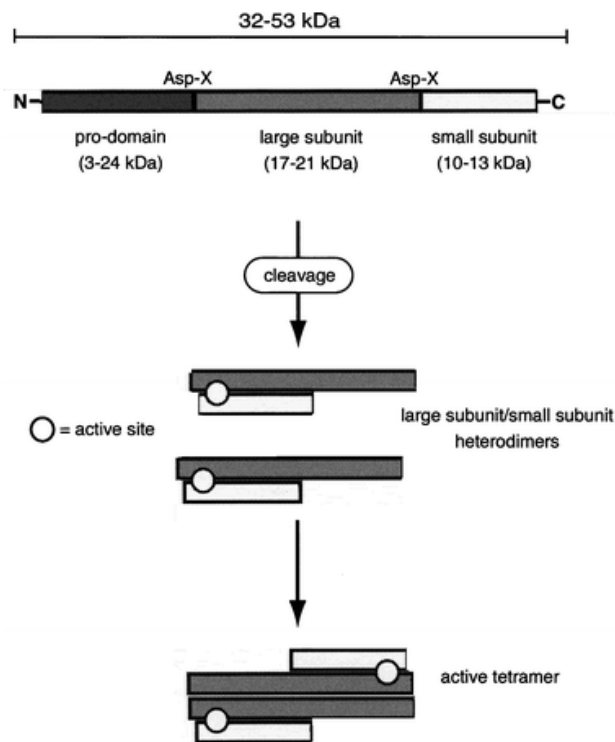




**Figure 1.7 : Schéma reprenant les voies apoptotiques dépendantes et indépendantes des caspases.** Il existe deux voies d'activation principales de l'apoptose. La voie extrinsèque et la voie intrinsèque. La voie d'activation extrinsèque implique l'activation, en membrane plasmique, des récepteurs de la famille des récepteurs au TNF (comme CD35/FAS ou TNFR), ce qui entraîne le recrutement et l'activation de la caspase-8 via les protéines adaptatrices TRADD ou FADD, au sein du complexe DISC (Death Inducing Signaling Complex). Ce signal apoptotique est ensuite propagé via le clivage de la protéine Bid en tBid transloqué dans la mitochondrie, ce qui conduit à la perméabilisation de la MME, ou par le clivage et l'activation des caspases effectrices. La voie d'activation intrinsèque est, quant à elle, caractérisée par la perméabilisation de la MME et la libération du cytochrome c, qui permet l'assemblage de l'apoptosome et l'activation subséquente des caspases effectrices. Le contrôle de la perméabilité de la MME est assuré par les protéines pro et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 qui peuvent être mobilisées suite à des modifications post-traductionnelles et des relocalisations subcellulaires. La perméabilisation de la membrane lysosomale peut également mener à la libération de certaines cathepsines (B et D), qui peuvent exercer une activité protéolytique dans le cytosol et favoriser la perméabilisation de la MME. Certaines protéines libérées par la mitochondrie, comme l'endonucléase G et AIF, peuvent participer à l'apoptose de manière indépendante des caspases. Enfin, l'activation de p53 par les dommages à l'ADN constitue également un facteur pro-apoptotique (Maiuri, Le Toumelin et al. 2007).



**Figure 1.8 : Représentation schématique des formes précurseurs des caspases effectrices (rouge) et initiatrices (violet).** Les sites de clivage séparant les pro-domaines et les petites ( $\sim$ p10) et grosses ( $\sim$ p20) sous-unités sont indiqués par des flèches. Les domaines de mort DED et CARD présents dans les longs pro-domaines des caspases initiatrices sont également représentés (Shi 2002).



**Figure 1.9 : Représentation schématique des étapes menant à l'activation d'une caspase** (<http://www.rsc.org/ej/NP/2001>).



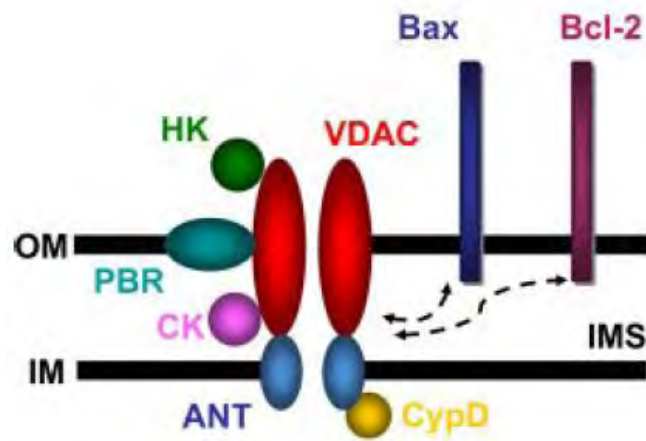
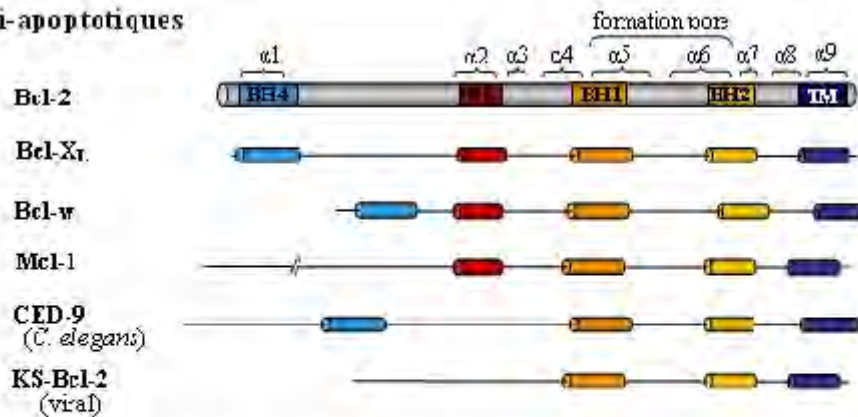


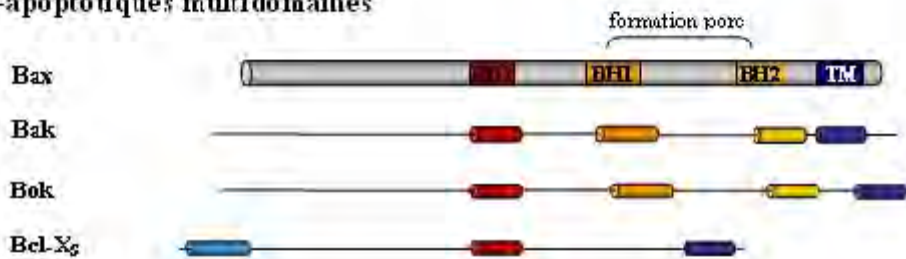
Figure 1.10: **Illustration de la composition du PTP (permeability transition pore) reprenant les différentes protéines qui le compose.** Les différents composants sont représentés bien que leur disposition exacte soit encore débattue. VDAC : Voltage-Dependent Anion Channel, PBR : Peripheric Benzodiazepine Receptor, ANT : Adenine Nucleotide Translocase, CypD: Cyclophiline D, CK: Creatine Kinase (Kroemer, Galluzzi et al. 2007).



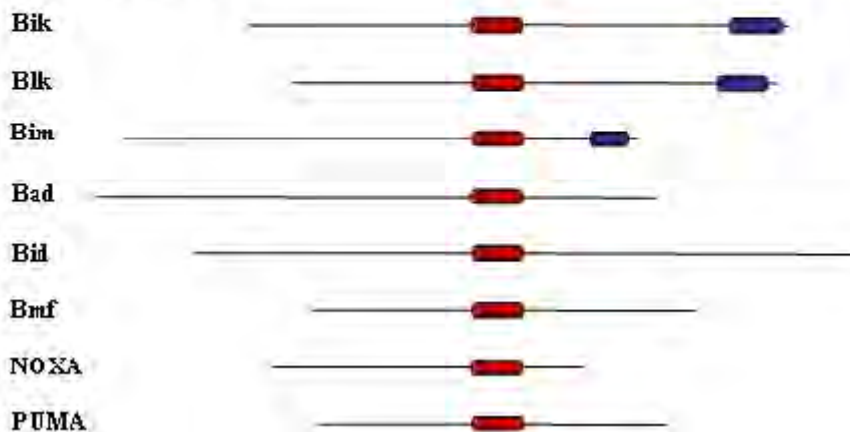
### Anti-apoptotiques



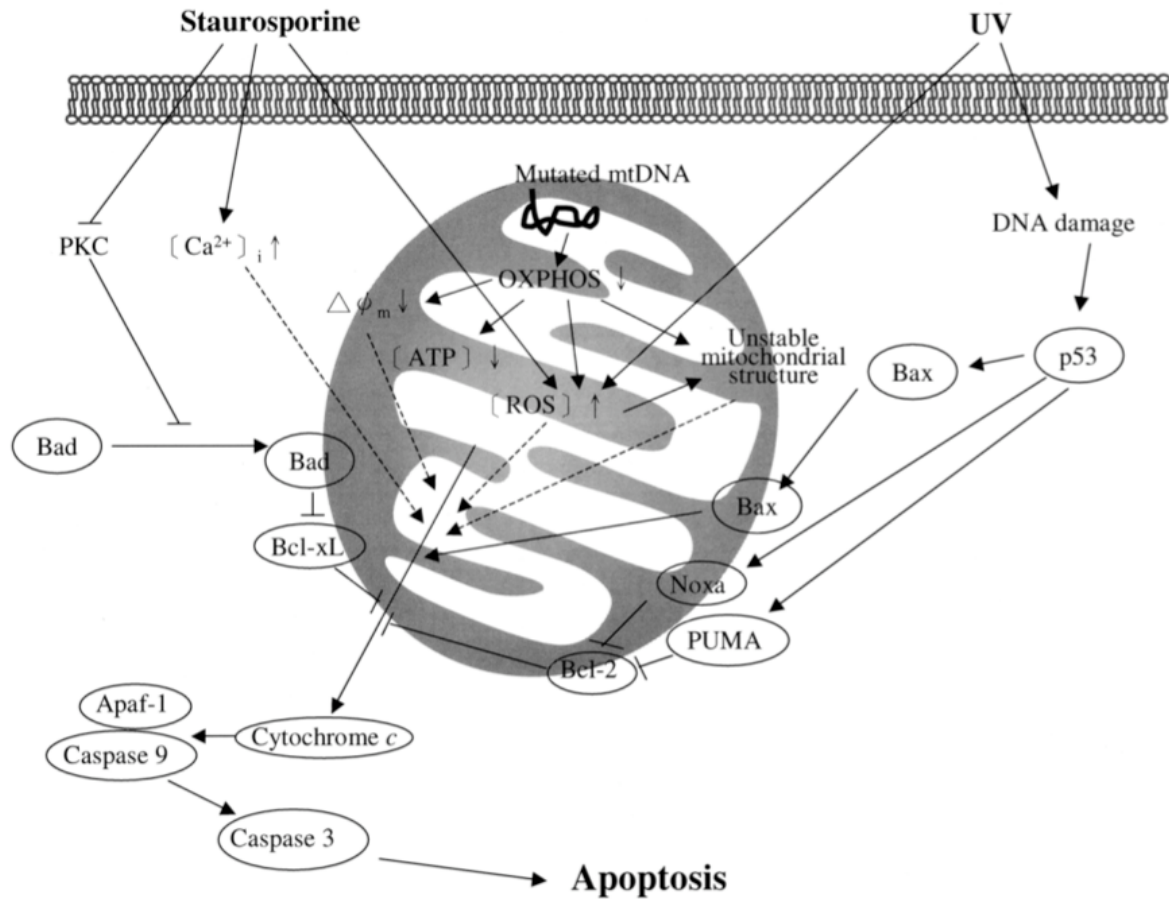
### Pro-apoptotiques multidomaines



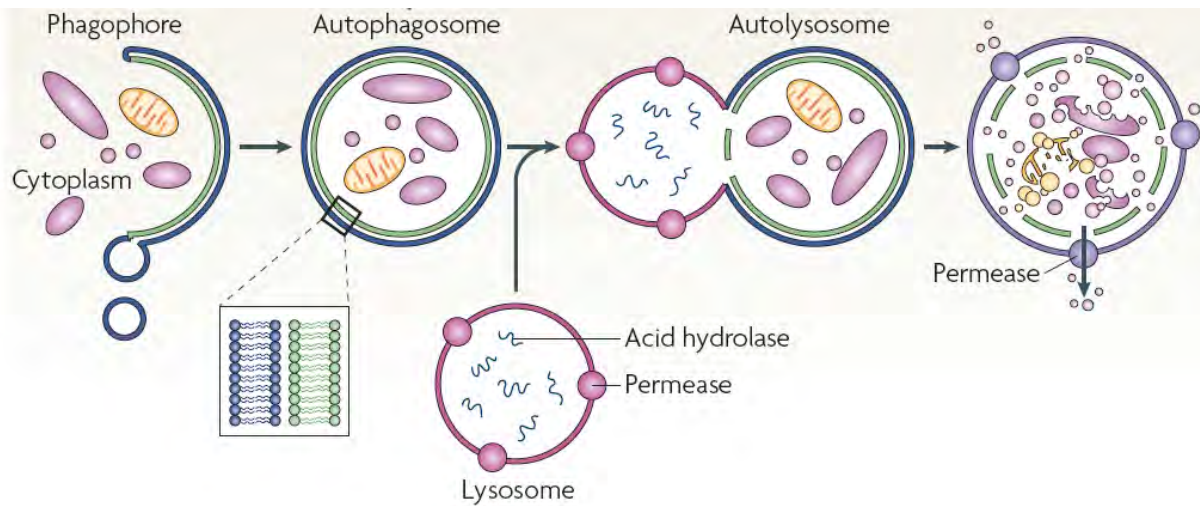
### Pro-apoptotiques BH3



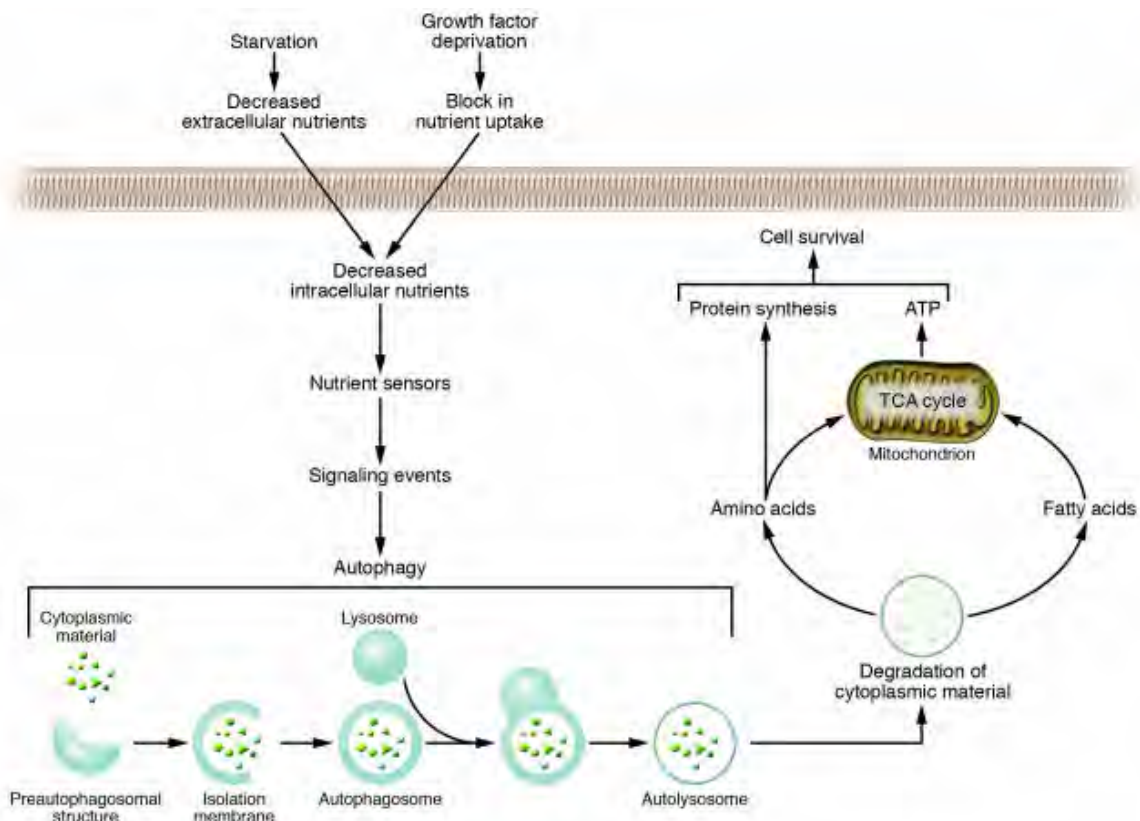
**Figure 1.11 : Classification et topologie des domaines présents dans les membres de la famille Bcl-2.** Les membres de la famille Bcl-2 peuvent être répartis en deux sous-familles : les membres anti-apoptotiques comprenant Bcl-2, Bcl-XL,... et les membres pro-apoptotiques. Ces derniers sont également subdivisés en deux groupes sur base du nombre de domaines de type BH (Bcl<sub>2</sub> Homology) présents : les membres multidomaines tels que Bax et Bak et les « BH3-only » telles que Bid, Bad, Bim,... BH : « Bcl-2 homology » et TM : « Transmembrane Domain » (<http://archimede.bibl.ulaval.ca/archimede/files/>).



**Figure 1.12: Mécanismes d'induction de l'apoptose par la STS.** La staurosporine est un inhibiteur de kinases qui induit l'apoptose par 3 voies principales. 1) La STS inhibe les PKCs ce qui va entraîner une diminution de la phosphorylation de Bad et sa translocation dans la MME. 2) La staurosporine provoque une augmentation de la production de ROS ce qui facilite la sortie du Cytochrome c. 3) La STS induit également une augmentation de la concentration en calcium cytosolique, ce qui va faciliter la libération du Cytochrome c par la mitochondrie dans le cytosol (Liu, Lee et al. 2004).



**Figure 1.13 : Représentation schématique des principales étapes de l'autophagie.** 1) La formation de l'autophagosome nécessite la création d'une structure composée d'une double membrane pré-autophagosomale (appelée phagophore). 2) Cette membrane va croître et finalement séquestrer des parties de cytoplasme et des organites pour former l'autophagosome. 3) Les autophagosomes vont fusionner avec des lysosomes pour former une vésicule appelée autophagolysosome ou autolysosome. 4) La membrane interne de celui-ci et son contenu sont ensuite dégradés par les hydrolases lysosomales et les produits de la dégradation sont expulsés par les perméases lysosomales (Klionsky 2007).



**Figure 1.14:**

**Représentation schématique du processus autophagique et de son rôle dans l'adaptation cellulaire à une privation de sérum.** La privation de sérum, ou de facteurs de croissance, résulte en une diminution des nutriments intracellulaires et l'activation d'une voie de signalisation qui est capable de stimuler l'autophagie. La dégradation des lipides membranaires et des protéines par l'autolysosome génère des acides gras et des acides aminés qui peuvent être réutilisés par la cellule afin de maintenir l'énergie cellulaire (production d'ATP par la mitochondrie) et la synthèse protéique, permettant la survie cellulaire. Cette machinerie moléculaire peut également être utilisée pour dégrader des constituants cytoplasmiques (mitochondries non-fonctionnelles, agrégats de protéines et pathogènes intracellulaires) (Levine and Yuan 2005).



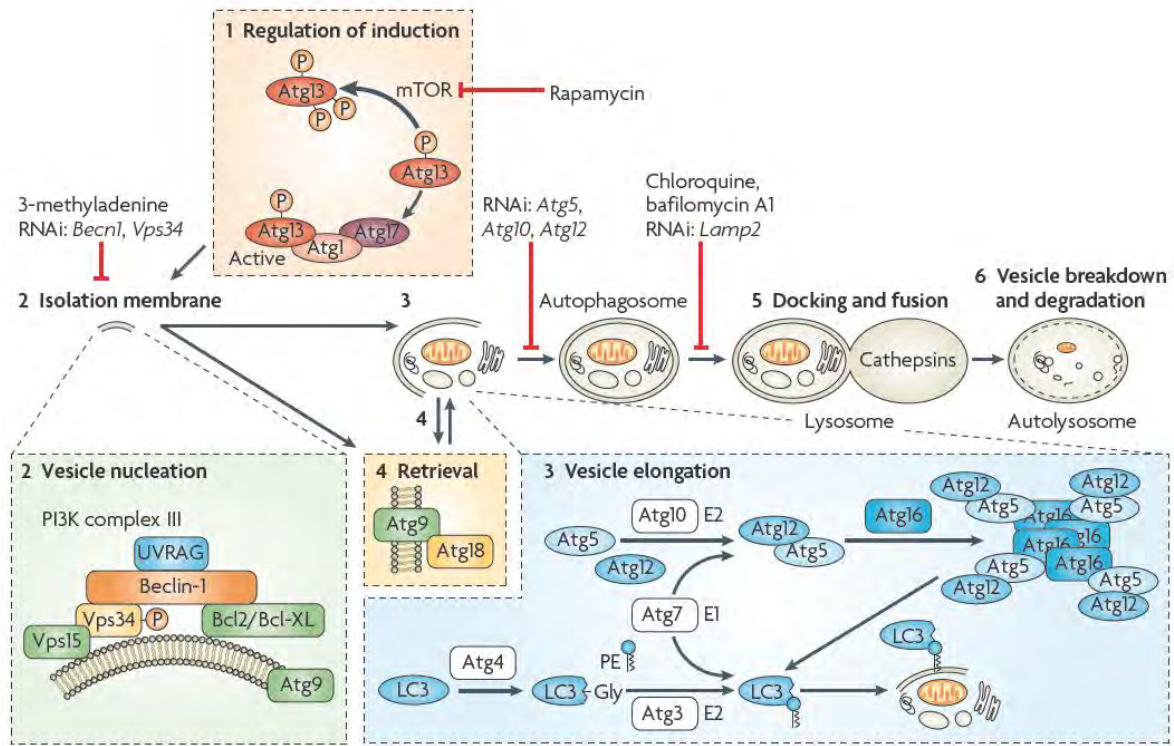
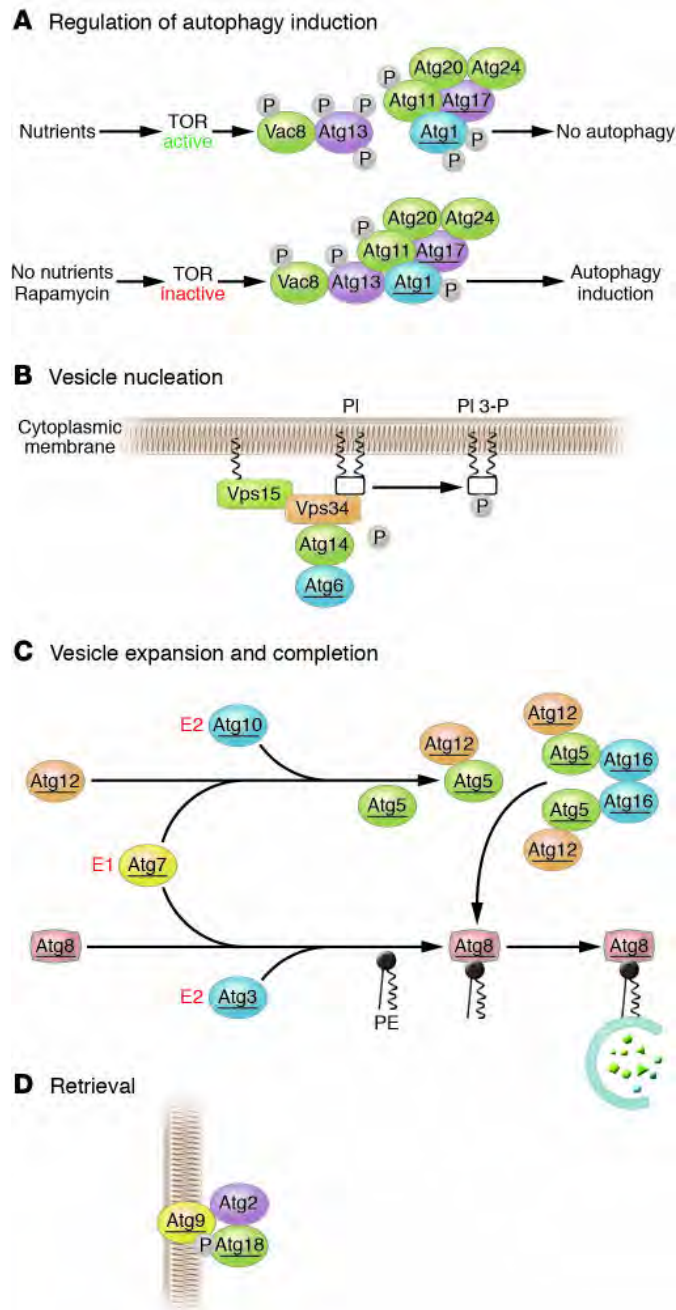
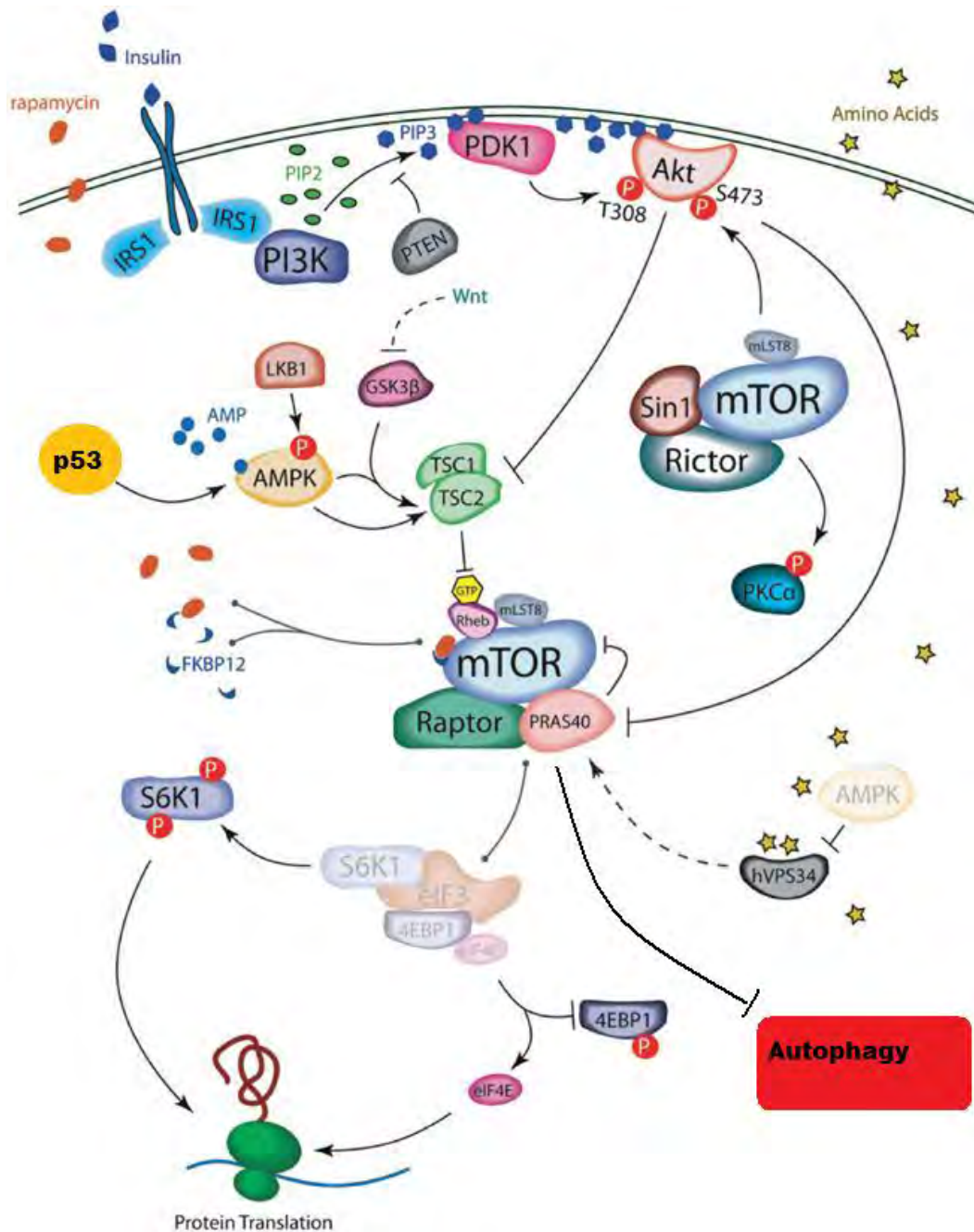


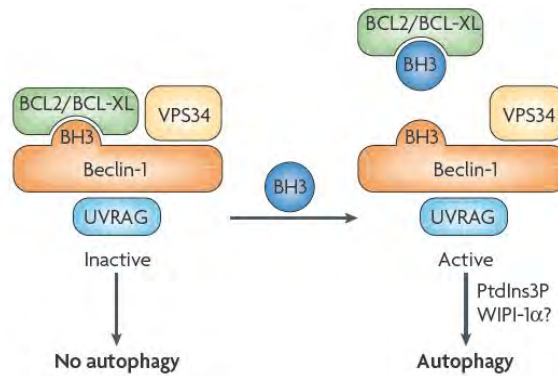
Figure 1.15 : Principales étapes de l'autophagie et des différents acteurs moléculaires associés (Maiuri, Zalckvar et al. 2007).



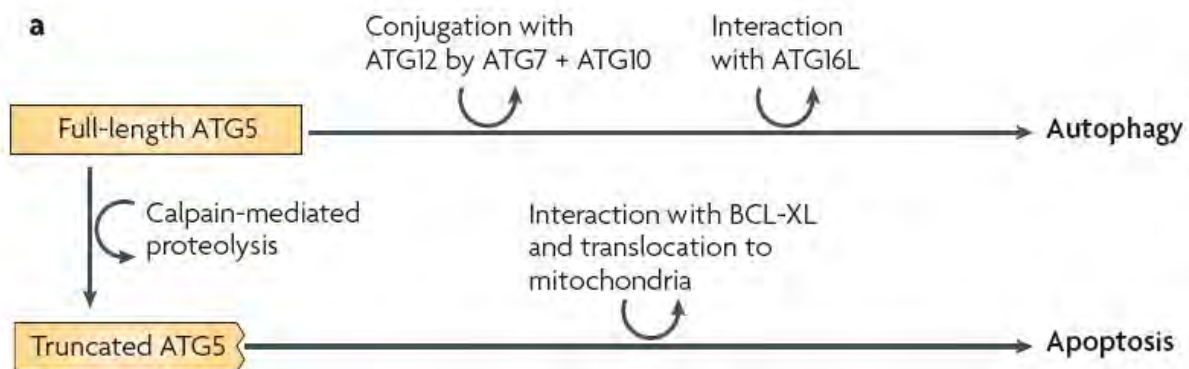
**Figure 16 : Illustration des mécanismes moléculaires impliqués dans l'autophagie.** La première étape consiste à modifier le régulateur de l'induction et implique la levée de l'inhibition exercée par la Ser/Thr kinase mTOR. Celle-ci inhibe l'autophagie en hyperphosphorylant la protéine autophagique 13 (Atg13). La phosphorylation d'Atg13 par mTOR va empêcher Atg13 de participer à la formation d'un complexe protéique contenant les kinases Atg1 et Atg17, entraînant une diminution de l'activité de la kinase Atg1. Lorsque mTOR est inhibée, l'association d'Atg13 hypophosphorylée avec Atg1 va stimuler l'activité catalytique de cette dernière et induire l'autophagie (a). Ensuite, la formation de la vésicule autophagique va nécessiter l'activation de Vps34, une phosphatidylinositol 3-kinase de classe III (PI3K), qui va générer des molécules de phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns3P) (étape 2). L'activation de Vps34 se produit au sein d'un complexe multiprotéique composé de Becline-1/Atg6, UVRAG (UV irradiation resistance-associated tumour suppressor gene) et une kinase myristylée, Vps15 (b). Le processus d'élongation de la vésicule (étape 3) est médié par deux systèmes de conjugaison de type ubiquitine-like faisant intervenir des enzymes E-like. La première étape de ce processus implique la conjugaison covalente d'Atg12 à Atg5, une réaction catalysée par une protéine de type E1-like Atg7 et l'enzyme Atg10, une protéine E2-like. Le complexe formé d'Atg12 et Atg5 est nécessaire à la formation et à l'expansion de la vésicule autophagique. La seconde voie implique la conjugaison d'un phosphatidyléthanolamine (PE) à la protéine LC3/Atg8. Ce processus est réalisé en plusieurs réactions successives catalysées par la protéase Atg4 (conversion de la forme cytosolique soluble de LC3 en LC3-I tronquée), puis par les enzymes E1-like Atg7 et E2-like Atg3 qui permettent la conjugaison de LC3-I avec un PE pour former LC3-II. Cette dernière est une forme qui s'insère dans la membrane de l'autophagosome (c). La protéine Atg9 est, quant à elle, impliquée dans le désassemblage des protéines autophagiques en membrane de l'autophagosome mature (étape 4) (d). Finalement, l'autophagosome évoluera en autolysosome suite à sa fusion avec le lysosome (étapes 5 et 6). Dans l'autolysosome, la membrane interne ainsi que les constituants qu'elle renferme sont dégradés par les enzymes lysosomales (Levine and Yuan 2005; Maiuri, Zalckvar et al. 2007).



**Figure 1.17 : La voie de signalisation mTOR.** Le complexe mTORC1 est sensible à la rapamycine et est constitué de mTOR, Raptor, mLST8, et PRAS40. TSC1/2-Rheb est le régulateur majeur (en amont) de mTORC1. Via l'axe AMPK-TSC1/2-Rheb, mTORC1 reçoit des informations sur l'état énergétique cellulaire et régule la traduction protéique en phosphorylant p70S6K1 et 4E-BP1. L'activation de mTORC1 inhibe l'autophagie. hVPS34 est un senseur énergétique capable d'interagir avec mTORC1. Le complexe mTORC2 contient les sous-unités mTOR, Rictor, Sin1, et mLST8. mTORC2 contrôle la structure et la morphologie cellulaires par sa régulation exercée sur PKCα et Akt. Les régulateurs en amont de mTORC2 sont encore inconnus. Les flèches représentent une relation d'activation et les barres représentent une relation d'inhibition. Modifié à partir de (Yang and Guan 2007).



**Figure 1.18. Représentation de l'effet des protéines BH3 sur l'interaction entre Becline-1 et Bcl-2/Bcl-XL.** Les protéines qui contiennent le domaine Bcl-2 homology-3 (BH3) sont capables de se lier au domaine récepteur BH3 de Bcl-2 ou Bcl-XL et de disrupter, de manière compétitive, l'interaction entre Bcl-2 ou Bcl-XL et Beclin-1. Ceci peut mener à l'activation de VPS34 et la formation subséquente de vésicules pré-autophagiques (Maiuri, Zalckvar et al. 2007).



**Figure 1.19 : Fonctions de la protéine Atg5 dans l'autophagie et l'apoptose.** La forme totale de la protéine Atg5 participe à l'étape initiale de l'autophagie avec l'aide de systèmes de conjugaison « ubiquitine-like ». Atg12 (activée par Atg7 et transférée sur Atg10) est conjuguée à Atg5 nécessaire à la formation d'un complexe avec Atg16. Le complexe Atg12-Atg5-Atg16 qui en résulte est responsable de la courbure du phagosome et du recrutement de LC3-II permettant l'élongation de la membrane de celui-ci. Une protéolyse par les calpaïnes résulte en une forme tronquée d'Atg5, capable de transloquer dans la MME et d'induire la perméabilisation de celle-ci suite à son interaction avec Bcl-XL (Maiuri, Zalckvar et al. 2007).



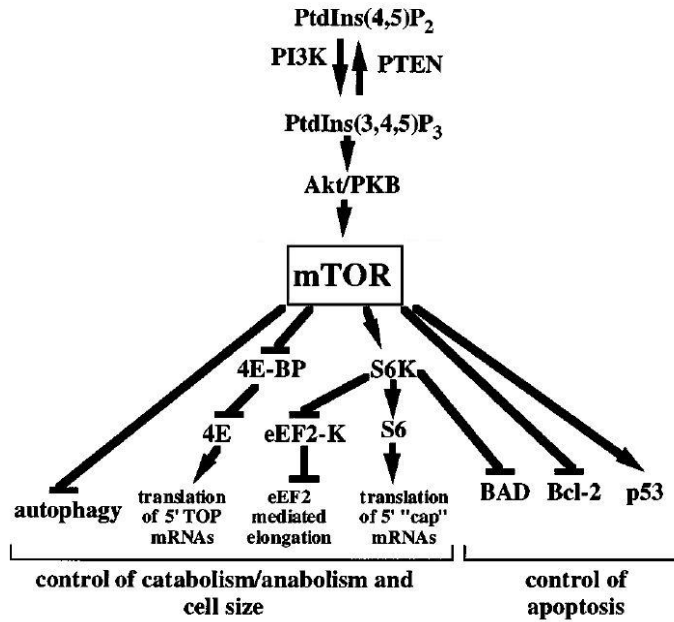
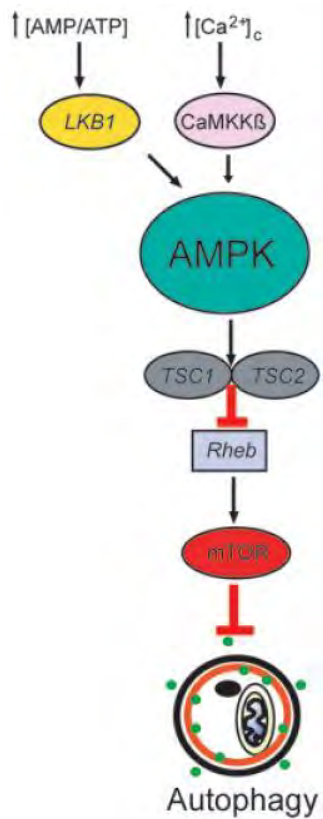
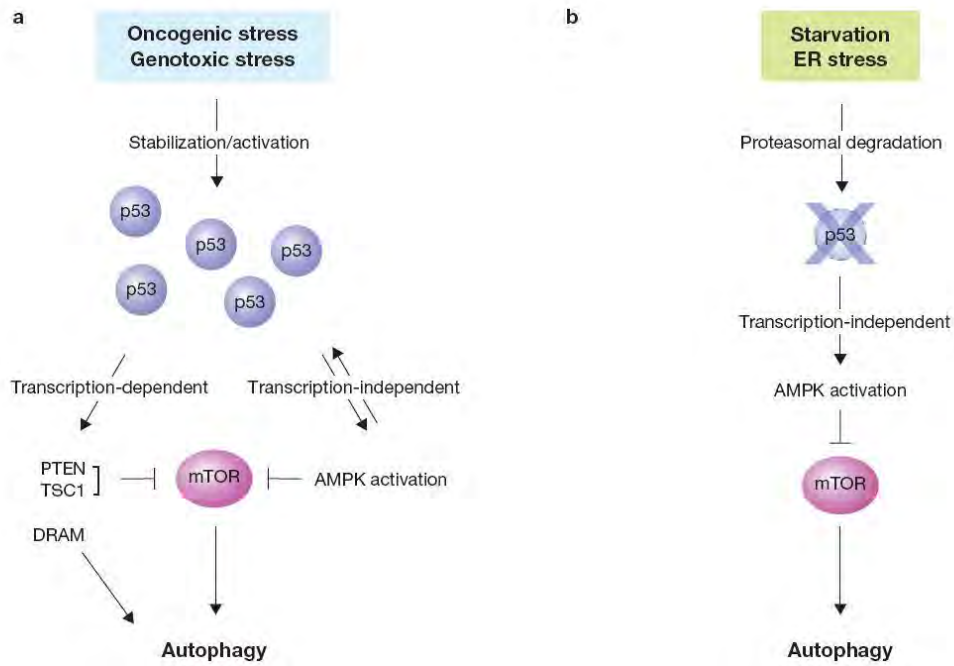


Figure 1.20: Présentation des principales cibles de mTOR impliquées dans le catabolisme et l'anabolisme cellulaires ainsi que dans le contrôle de l'autophagie.



**Figure 1.21 : Effet de l'AMP et de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> sur la stimulation de l'autophagie médiée par l'AMPK.** LKB1 (AMPKK), en réponse à un stress cellulaire énergétique, active l'AMPK par phosphorylation sur la Thr 172. D'autre part, une augmentation de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>c</sub> peut induire l'autophagie probablement en activant CaMKKβ capable d'activer la voie AMPK-TSC1/2-Rheb-mTORC1 (Hoyer-Hansen and Jaattela 2007).



**Figure 1.22: Modèle de la régulation positive (a) et négative (b) de l'autophagie par p53.** (a) Suite à la stabilisation et à l'activation de p53 par un stress, p53 active l'autophagie d'une manière indépendante de la transcription (activation de l'AMPK) ou par un mécanisme dépendant de son activité transactivatrice et la surexpression transcriptionnel de PTEN, TSC1 et DRAM. (b) L'inhibition de p53 ou sa dégradation par le protéasome induite par une privation de nutriments ou un stress du RE est capable d'induire l'autophagie par un mécanisme indépendant de la transcription impliquant l'activation de l'AMPK et l'inhibition de mTOR (Levine and Abrams 2008).

- Dimroth, P., C. von Ballmoos, et al. (2006). "Catalytic and mechanical cycles in F-ATP synthases. Fourth in the Cycles Review Series." EMBO Rep **7**(3): 276-82.
- Hoyer-Hansen, M. and M. Jaattela (2007). "AMP-activated protein kinase: a universal regulator of autophagy?" Autophagy **3**(4): 381-3.
- Kakkar, P. and B. K. Singh (2007). "Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control." Mol Cell Biochem **305**(1-2): 235-53.
- Klionsky, D. J. (2007). "Autophagy: from phenomenology to molecular understanding in less than a decade." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(11): 931-7.
- Kroemer, G., L. Galluzzi, et al. (2007). "Mitochondrial membrane permeabilization in cell death." Physiol Rev **87**(1): 99-163.
- Levine, B. and J. Abrams (2008). "p53: The Janus of autophagy?" Nat Cell Biol **10**(6): 637-9.
- Levine, B. and J. Yuan (2005). "Autophagy in cell death: an innocent convict?" J Clin Invest **115**(10): 2679-88.
- Liu, C. Y., C. F. Lee, et al. (2004). "Mitochondrial DNA mutation and depletion increase the susceptibility of human cells to apoptosis." Ann N Y Acad Sci **1011**: 133-45.
- Maiuri, M. C., G. Le Toumelin, et al. (2007). "Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1." EMBO J **26**(10): 2527-39.
- Maiuri, M. C., E. Zalckvar, et al. (2007). "Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis." Nat Rev Mol Cell Biol **8**(9): 741-52.
- Shi, Y. (2002). "Mechanisms of caspase activation and inhibition during apoptosis." Mol Cell **9**(3): 459-70.
- Taylor, R. W. and D. M. Turnbull (2005). "Mitochondrial DNA mutations in human disease." Nat Rev Genet **6**(5): 389-402.
- Wallace, D. C. (1999). "Mitochondrial diseases in man and mouse." Science **283**(5407): 1482-8.
- Yang, Q. and K. L. Guan (2007). "Expanding mTOR signaling." Cell Res **17**(8): 666-81.
- Yasukawa, T., T. Suzuki, et al. (2001). "Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease." EMBO J **20**(17): 4794-802.

finale de 500 nM pendant différents temps d'incubation en fonction de l'expérience réalisée. D'autres molécules ou conditions de cultures comme la privation de sérum, capables de moduler la réponse cellulaire ont également été utilisées à des concentrations et/ou pendant des temps d'incubations décrits dans les légendes des figures de la partie résultats.

### ***2.3 Dosage de protéines par la méthode de Bradford***

Les différents dosages protéiques réalisés dans le cadre de ce travail ont été effectués selon la méthode de Bradford (Bradford, 1976). Concrètement, on ajoute 3 µl de lysat cellulaire total à 1 ml de colorant Bradford (Biorad, USA). Après 5 min, l'absorbance est lue au moyen d'un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 595 nm. Le spectrophotomètre est préalablement mis à zéro avec de l'eau distillée. Le calcul de la concentration protéique est possible grâce au dosage d'un étalon de concentration connue. En effet, pour l'étalon 2,5 µl d'une solution de BSA (Bovine Serum Albumin, Sigma, USA) à 2 µg/µl est ajouté à 1 ml de solution Bradford et une lecture de l'absorbance est réalisée après 5 min. Le calcul de la concentration en protéines des échantillons peut alors être réalisé selon la formule :

$$\text{Conc. échantillons } (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{(\text{Abs éch} - \text{Abs blc éch}) \times \text{Vol éch} \times \text{Conc étalon}}{(\text{Abs étalon} - \text{Abs blc étalon}) \times \text{Vol éch}}$$

Avec Abs : valeur d'absorbance à 595 nm, blc : blanc, éch : échantillon, Vol : volume, Conc : concentration

### ***2.4 Dosage de l'activité de la caspase-3***

#### **2.4.1 Principe**

Au cours de la réponse apoptotique, des pro-caspases effectrices inactives peuvent être activées par des caspases initiatrices. La caspase-3 est une caspase effectrice qui, lorsqu'elle est activée, est capable de cliver de nombreux substrats cellulaires menant à une morphologie apoptotique et, indirectement, à la fragmentation de l'ADN (voir introduction, paragraphe 1.3.1.1.). Cette protéase joue donc un rôle capital dans de nombreuses réponses apoptotiques et est un excellent marqueur de l'apoptose (Jin & El-Deiry, 2005). Le dosage de l'activité de la caspase-3 a été réalisé selon la méthode de Lozano (Lozano *et al.*, 2001). Les extraits protéiques ont été préparés selon le protocole décrit par Wellington (Wellington *et al.*, 1998). Le principe du dosage est le suivant : après une incubation des cellules avec la STS à 500 nM en présence ou en absence de 3-MA (3-méthyladénine), un inhibiteur de PI3 kinases de type III à la concentration de 10 mM, les cellules cybrides sauvages et mutées sont lysées et mises en présence d'un substrat fluorogénique spécifique (Ac-DEVD-AFC) de l'activité « caspase-3-like ». Le motif DEVD du substrat est reconnu et clivé par la caspase-3 et la libération du groupement AFC (7-amino-4-trifluorométhyl coumarine) conduit à l'émission de fluorescence. L'intensité de la fluorescence réémise sera donc directement proportionnelle à l'activité de la caspase-3.

#### **2.4.2 Réactifs :**

Voir tableau 2.1.

### **2.4.3 Méthode :**

#### **2.4.3.1 Lyse cellulaire**

Après une incubation de 6h de cellules confluentes en présence de STS à 500 nM en présence ou en absence de 3-MA à 10 mM dans des boîtes 6 puits (Costard, France), les milieux de culture sont récupérés et les tapis cellulaires sont rincés une fois avec 5 ml de PBS. Les milieux de rinçage sont également récupérés et ajoutés aux milieux de culture correspondant avant d'être centrifugés 10 min à 1000 rpm afin de récupérer les éventuelles cellules détachées. Les tapis cellulaires adhérents sont ensuite raclés dans 200 µl de PBS et récupérés dans des microtubes. Les culots cellulaires récupérés après centrifugation des milieux de culture et de rinçage ont ensuite été resuspendus dans 100 µl de PBS et ajoutés aux microtubes correspondants. Les échantillons ont ensuite été centrifugés à 1000 g pendant 5 min à 4 °C et les culots ont finalement été resuspendus dans 50 µl de tampon de lyse. Après 30 min d'incubation sur un agitateur rotatif à 4 °C, les lysats ont été centrifugés à 10 000 g pendant 10 min à 4 °C. Les surnageants ont ensuite été aliquotés et stockés à - 20 °C jusqu'au moment du dosage et un dosage protéique a été effectué sur les échantillons par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

#### **2.4.3.2 Dosage**

Pour le dosage de l'activité de la caspase-3 : dans un microtube, on ajoute 50 µl de tampon de réaction, un volume d'échantillon correspondant à 5-20 µg de protéines et 1 µl du substrat Ac-DEVD-AFC à une concentration finale de 13,7 µM (dilution 1 : 100). Les échantillons sont alors incubés pendant 60 min à 37 °C puis la fluorescence est mesurée (Ex: 400 nm et Em: 505 nm) au moyen d'un spectrofluorimètre (Kontron instrument, SFM 25, Switzerland).

Trois types de blancs sont réalisés :

- Blanc enzyme (BE): tampon de réaction + 1 µl de DMSO + échantillon
- Blanc substrat (BS): tampon de réaction + 1 µl de substrat + tampon de lyse
- Blanc blanc (BB) : tampon de réaction + tampon de lyse

Les intensités de fluorescence (IF) ont été calculées selon la formule suivante:

$$IF = (\text{Test} - \text{BE}) - (\text{BS} - \text{BB})$$

Les valeurs d'intensité de fluorescence sont ensuite normalisées par les quantités de protéines et exprimées en unités arbitraires de fluorescence par µg de protéines.

## **2.5 Microscopie électronique à transmission (MET)**

### **2.5.1 Méthode :**

Les cellules cybrides sauvages et mutées cultivées en en boîtes multipuits à 6 puits (Costard, France) sont incubées pendant 2 h avec de la staurosporine à 500 nM en présence ou en absence de 3-MA à 10 mM ou dans des conditions connues pour induire l'autophagie comme l'absence de sérum pendant 24 h avec ou sans bafilomycine à 100 nM. Après un

rinçage avec 2 ml de PBS, les cellules sont fixées à 4 °C par un traitement de 90 min en présence de glutaraldéhyde à 2,5 % (Ladd, Williston, USA) diluée dans du tampon cacodylate de sodium 0.1 M (pH 7,4). Ensuite, les cellules sont rincées 3 fois 10 min avec 1 ml de tampon cacodylate de sodium 0.2 M et post-fixées avec 1 ml de tétraoxyde d'osmium (OsO<sub>4</sub>) à 1 % (Sigma, StLouis, MO, USA) dilué dans du tampon cacodylate de sodium à 0.1 M (pH 7.4). Après une nuit à 4 °C, les cellules sont alors progressivement déshydratées en présence de solutions de plus en plus concentrées en alcool (incubations successives de 2 x 5 min dans des solutions de 30, 50, 70 et 90 % d'éthanol) puis traitées pendant 4 fois 10 min dans de l'éthanol à 100 %. Les cellules sont ensuite enrobées par un passage de 20 min dans une solution contenant 50 % d'éthanol pur et 50 % de résine LX 112 suivi d'un passage d'une heure en présence de résine à 100 %. Les cellules sont ensuite mises en présence de résine LX112 une nuit à 37 °C puis pendant 24 h à 45 °C et enfin pendant 48 h à 60 °C.

Des sections de 40 nm sont alors réalisées à l'aide d'un Ultramicrotome (NOVA, LKB, Bromma, Suède), avant d'être colorées à l'acétate d'uranyl et examinées au moyen d'un microscope électronique (Tecnai 10, FEI, Hillsboro, USA).

## ***2.6 Préparation de lysats protéiques totaux***

### **2.6.1 Réactifs**

Voir tableau 2.2.

### **2.6.2 Méthode :**

Les lysats cellulaires totaux sont réalisés à partir de cellules cultivées dans des boîtes de culture cellulaire de 25 cm<sup>2</sup> (Costard, France). Au terme des incubations, les cellules sont placées sur glace et le milieu de culture est récupéré. Les tapis cellulaires sont ensuite rincés avec 3 ml de PBS. Les milieux de rinçages sont également récupérés et ajoutés aux milieux des conditions correspondantes dans le but de récupérer les cellules éventuellement détachées du fond du puits. Ces dernières sont alors centrifugées 5 min à 1000 rpm. Les tapis cellulaires adhérents sont ensuite raclés en présence de 200 µl de tampon de lyse. Les lysats cellulaires sont ensuite récupérés à froid dans des microtubes. D'un autre côté, les culots de cellules récupérés après centrifugation des milieux de culture et de rinçage sont alors resuspendus dans 50 µl de tampon de lyse et ajoutés aux microtubes correspondants. Après une incubation sur glace de 7 min, les lysats sont centrifugés à 13 000 rpm et à 4 °C pendant 15 min. Enfin les surnageants sont récupérés et aliquotés à - 20 °C. Un dosage de protéines est ensuite effectué sur les échantillons par la méthode de Bradford (Bradford, 1976).

## ***2.7 Fractionnement cellulaire et préparation des lysats***

Dans le but de rechercher une modification de la distribution de la protéine p53 dans les cellules cybrides sauvages et mutées incubées en présence de STS, nous avons caractérisé l'abondance de la protéine p53 dans différents compartiments cellulaires (cytosol, noyaux et mitochondries). Pour y parvenir, nous avons réalisé un fractionnement par la technique de centrifugation différentielle et nous avons préparé des échantillons pour une analyse de l'abondance de p53 en Western blot sur ses différentes fractions. Il est important de souligner qu'il s'agit de fractions subcellulaires enrichies mais non purifiées.

### 2.7.1 Matériel :

- PBS: 150 mM NaCl, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,4
- Tampon sucrose/imidazole : 40 mM sucrose, imidazole 3 mM; pH 7,4
- Cocktail d'inhibiteurs de protéases 25 fois concentrés (PIC : « protéase inhibitor cocktail », Roche, Nutley, USA)
- Cocktail d'inhibiteurs de phosphatases 25 fois concentrés (PIB : « phosphatase inhibitor buffer ») de composition 25 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 250 mM p-nitrophénylpyrophosphate, 250 mM β-glycérophosphate, et 125 mM NaF.
- Solution Tris-ASB 14 : 10 mM tris-HCl ; pH 8, 10 % ASB-14 (Sigma, St Louis, USA)
- Solution Tris-Triton : 10 mM Tris-HCl ; pH 8, 2 % Triton X-100

### 2.7.2 Méthode

Les différentes fractions sont réalisées à partir de 3 boîtes de culture de 75 cm<sup>2</sup> (Costard, France) confluentes de cellules cybrides sauvages et mutées incubées en présence ou en absence de STS à 500 nM pendant 6 h. Toutes les étapes du fractionnement cellulaire s'effectuent à 4 °C. Les milieux sont décantés et les cellules sont rincées une fois avec 10 ml de PBS puis avec 10 ml de tampon sucrose/imidazole froid. Les cellules sont ensuite raclées dans 400 µl de sucrose/imidazole contenant 16 µl de PIC et 16 µl de PIB. Les suspensions cellulaires provenant de 3 boîtes de culture sont alors regroupées et transférées dans un homogénéisateur de Dounce. Après 30 passages, l'homogénat est centrifugé à 1700 rpm à 4 °C pendant 10 min. Le premier culot correspond à la fraction nucléaire (et aux cellules non homogénéisées) qui est resuspendue dans 1 ml de sucrose/imidazole et recentrifugée à 1700 rpm à 4 °C pendant 10 min. Le nouveau surnageant est éliminé et le culot est conservé (culot 1). Le surnageant de la fraction nucléaire est ensuite centrifugé à 12500 rpm à 4 °C pendant 2 min. Le nouveau surnageant est aliquoté et conservé à - 20 °C (fraction cytosolique) alors que le culot est rincé dans 1 ml de sucrose/imidazole et recentrifugé à 12500 rpm à 4 °C pendant 2 min. Le nouveau surnageant est éliminé et le culot, enrichi en mitochondries, est conservé (culot 2). Le culot 1, contenant principalement les noyaux est resuspendu dans 70 µl de la solution Tris-ASB 14. Le culot 2, enrichi en mitochondries, est resuspendu dans 30 µl de la même solution. À partir de ce moment, les lysats sont maintenus à température ambiante puis soniqués 30 min et dilués 5 fois dans du tampon Tris-Triton. Ils sont ensuite centrifugés à 13000 rpm pendant 10 min à température ambiante. Les surnageants sont aliquotés et conservés à - 20 °C. Les surnageants correspondant aux culots 1 et 2 sont respectivement enrichis en protéines nucléaires et mitochondriales.

## 2.8 *Western blotting*

### 2.8.1 Principe

La technique de Western blotting en « SDS PAGE » (Sodium Dodecyl Sulfate PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) permet la séparation de protéines suivant leur poids moléculaire ainsi que leur détection de manière semi-quantitative (Raymond & Weintraub,



1959). Les échantillons protéiques sont chargés dans les puits d'un gel de polyacrylamide en présence de SDS (Sodium Dodecyl Sulfate). Le SDS est une molécule capable de dénaturer les protéines en les chargeant négativement. Suite à l'application d'un courant électrique, les protéines migrent dans le gel de manière inversement proportionnelle à leur poids moléculaire. Après la migration, les protéines sont transférées du gel sur une membrane. Afin de mettre en évidence la protéine d'intérêt, la membrane est traitée avec un anticorps spécifique (HRP, Horse Raddish Peroxidase) dirigé contre la protéine d'intérêt. Ensuite, un anticorps secondaire conjugué à une peroxydase se lie au fragment Fc de l'anticorps primaire. La révélation de la protéine est réalisée à l'aide de la luciférine, un substrat de la peroxydase. En effet, la luciférine est oxydée en présence de peroxydase permettant une libération de photons (Figure 2.1). Ceux-ci sont détectés au moyen d'un film autoradiographique. Dans ce travail, deux types de gels ont été utilisés : le gel Nu Page utilisé pour la détection de la protéine LC3 et le gel Tris-Glycine utilisé pour détecter les autres protéines.

## **2.8.2 Préparation des échantillons protéiques**

Après le dosage des protéines par la méthode de Bradford (voir point 2.3), un volume déterminé d'extraits protéiques provenant de cellules lysées selon la méthode décrite au point 2.6, est prélevé afin d'avoir une quantité de protéines correspondant à 10 ou 15 µg dans chaque puits. Avant les chargements, les échantillons sont portés à volume avec du tampon de lyse et du bleu de charge (tableau 2.3). Avant d'être chargés dans les puits du gel, les échantillons sont chauffés à 70 °C afin de dénaturer les protéines puis brièvement centrifugés.

## **2.8.3 Migration**

### ***2.8.3.1 Les gels Nu Page (polyacrylamide gel electrophoresis)***

#### 2.8.3.1.1 Matériel :

Voir tableau 2.4.

#### 2.8.3.1.2 Méthode :

Lors du montage, les puits du gel sont préalablement équilibrés avec du tampon de migration puis placés dans la cuve avec les puits orientés vers le compartiment central. Le compartiment central est ensuite rempli avec du tampon de migration contenant les antioxydants. La cuve est ensuite remplie avec du tampon de migration. Les puits sont ensuite chargés et la résolution électrophorétique est réalisée à un voltage constant de 200 V pendant 45 min.

### ***2.8.3.2 Les gels Tris-Glycine***

#### 2.8.3.2.1 Matériel:

Voir tableau 2.5.

- Gel séparateur ou « running gel »
- Gel concentrateur ou « stacking gel »

- Tampon d'électrophorèse : running buffer 10 X
- Étalon de poids moléculaire : Seeblue Plus 2 Prestained (Invitrogen, USA)
- Cuve d'électrophorèse (Amersham Bioscience, Hoefer SE600 Ruby)
- Générateur de courant (Amersham Pharmacia Biotech, EPS 601)

#### 2.8.3.2.2 Méthode :

Après avoir réalisé le montage des plaques, les gels sont coulés. Dans un premier temps, le gel « séparateur » est coulé entre les plaques jusqu'à environ 1 cm en dessous du peigne. Une fine couche d'isopropanol est déposée sur le gel afin d'empêcher l'oxydation au contact de l'air. Une fois le gel polymérisé, l'isopropanol est éliminé et le gel est rincé avec de l'eau distillée. Ensuite, le gel « concentrateur » est coulé sur le gel séparateur. Un peigne est ensuite introduit dans le gel concentrateur afin de former les puits de chargement. Lorsque le gel concentrateur est polymérisé, le peigne est retiré et le gel est monté dans la cuve. Le running tampon de migration est alors versé dans la partie centrale de la cuve et les puits sont rincés avec celui-ci. Les échantillons sont ensuite chargés dans les puits. La migration se déroule pendant 30 min dans le gel concentrateur (35 mA et  $\pm$  80 V) puis pendant 180 min dans le gel séparateur (45 mA et environ 150-200 V).

### 2.8.4 Transfert des protéines sur la membrane de PVDF

#### 2.8.4.1 *Matériel pour les gels Nu Page :*

Voir tableau 2.5.

- Appareil de transfert (Amersham Bioscience, USA)
- Papier Wathman (Merck, Whitehouse Station, USA)
- Membrane de PVDF (PolyVinylDièneFluoride ; Amersham, Bioscience, USA)
- Tampon de transfert (pour 200 ml) : 10 ml de tampon stock Nu Page transfert buffer (20 x) (Invitrogen, USA), 40 ml de méthanol, 200  $\mu$ l d'antioxydants (Invitrogen, USA), porté à volume avec de l'eau distillée

#### 2.8.4.2 *Matériel pour gel Tris-Glycine:*

Voir tableau 2.5.

- Appareil de transfert (Amersham Bioscience, USA)
- Tampon de transfert (voir tableau 2.5)
- Papier Wathman (Merck, Whitehouse Station, USA)
- Membrane de PVDF (PolyVinylDièneFluoride, Amersham, Bioscience, USA)

#### 2.8.4.3 *Méthode :*

Lorsque l'étape de migration est terminée, les gels sont démoulés et l'étape d'électro-transfert de type « semi-dry » peut être réalisée. Une membrane de PVDF et des papiers Wathman sont découpés selon la taille du gel séparateur. Avant de réaliser le montage de

transfert, la membrane de PVDF est réhydratée 1 min dans du méthanol 100 %. Ensuite, celle-ci et les papiers Wathman sont équilibrés 5 min dans du tampon de transfert. Le montage en « sandwich » est alors réalisé dans la cuve d'électro-transfert (Figure 2.1). Le transfert des protéines sur la membrane de PVDF pourra s'effectuer (2 h à 150 mA).

### **2.8.5 Blocage de la membrane et révélation**

#### **2.8.5.1 Matériel :**

Voir tableau 2.5.

- Tampon de rinçage : TBS-Tween 0.1% (TBS-T) ; pH 7,6
- Agent bloquant : TBS-Tween 0,1% (TBS-T) ; pH 7,6 + agents bloquants (Amersham Bioscience, USA) contenant ou non les anticorps primaires ou secondaires adéquats (voir tableau 2.6)
- Substrat de révélation : ECL (Enhanced ChemiLuminescent) Advanced Western Blotting Detection Kit (Amersham, Bioscience, USA)
- Film autoradiographique (Amersham, Bioscience, USA)
- Appareil de révélation (FUJI X-Ray Film Processor FPM 100A, Siemens)

#### **2.8.5.2 Méthode :**

Une fois le transfert terminé, le montage en sandwich est démoulé et la membrane est mise à bloquer pendant 2 h à température ambiante et sous agitation dans du TBS-T contenant l'agent bloquant à 2 %. Cette étape permet de bloquer les sites non spécifiques de la membrane. Après l'étape de blocage, la membrane est incubée pendant 2 h à température ambiante (ou 16 h à 4 °C) en présence de l'anticorps primaire (voir tableau 2.6) dilué dans du TBS-T contenant l'agent bloquant approprié à la concentration de 2 %. Ensuite, la membrane est rincée 3 fois dans du TBS-T avant d'être incubée 1 h en présence de l'anticorps secondaire (voir tableau 2.7) dilué de 50 000 à 300 000 fois dans du TBS-T contenant de l'agent bloquant à la même concentration. Enfin, la membrane est rincée 3 fois 20 min avec du TBS-T avant d'être incubée pendant 5 min avec de la solution de révélation contenant le substrat de la HRP (Horse Radish Peroxidase) (ECL). La révélation se fait en chambre noire en exposant un film autoradiographique sur la membrane pendant différents temps. Le film est ensuite développé dans l'appareil de révélation par un passage dans une solution de révélation, une solution de fixation et un rinçage à l'H<sub>2</sub>O.

## **2.9 *Marquage en immunofluorescence et visualisation en microscopie confocale***

Afin de visualiser l'accumulation et la localisation de la protéine LC3, marqueur de l'activité autophagique (Klionsky *et al.*, 2008), nous avons réalisé des marquages en immunofluorescence sur des cellules cybrides sauvages et mutées incubées en présence de staurosporine à 500 nM ou incubées à des conditions connues pour stimuler l'autophagie (absence de sérum pendant 24 h ou présence de bafilomycine 24 h).

#### **2.9.1 Matériel :**

Voir tableau 2.8.

## **2.9.2 Marquage :**

Les cellules sont ensemencées dans des boîtes de culture à 24 puits sur des lamelles couvre-objets (Sigma, St Louis, USA) stérilisées. Les cellules cybrides sauvages et mutées sont ensuite traitées à la staurosporine à 500 nM ou exposées à des conditions capables de stimuler l'autophagie (absence de sérum pendant 24 h ou présence de bafilomycine pendant 24 h). À la fin des incubations, les cellules sont fixées pendant 10 min avec du PBS-paraformaldéhyde à 4 %. Elles sont ensuite rincées 3 fois avec 1 ml de PBS puis perméabilisées pendant 5 min avec du PBS-Triton X-100 à 1 %. Après 3 rinçages de 10 min avec du PBS-BSA à 2 %, les cellules sont incubées à température ambiante en chambre humide en présence de 30 µl d'anticorps primaire (anticorps monoclonal de souris anti-LC3) dilué 100 x pendant 2 h. Ensuite, après 3 rinçages de 10 min avec du PBS-BSA à 2 %, les cellules sont incubées 1 h à température ambiante (en chambre humide) et à l'obscurité en présence de 30 µl d'anticorps secondaire dilué 1000 x dans du PBS-BSA à 2 %. Elles sont ensuite rincées 3 fois avec du PBS-BSA à 2 % et 1 fois avec du PBS. Le marquage des noyaux cellulaires est alors réalisé grâce au TOPRO-3 (Ex : 642 nm, Em : 661 nm) dilué dans une solution de RNase (2 mg/ml). Les cellules sont donc incubées en présence de l'agent intercalant de l'ADN pendant 30 min dans une chambre humide et à l'obscurité. Enfin, les cellules sont rincées 2 fois avec du PBS puis les lamelles couvre-objets (Vel, Germany) sont montées sur des lames en présence de mowiol préchauffé à 56 °C. L'observation des cellules est ensuite réalisée au moyen d'un microscope confocal à fluorescence (Leica, Solms, Germany).

## ***2.10 Marquage des mitochondries et des lysosomes à l'aide de sonde fluorescentes et visualisation en microscopie confocale***

### **2.10.1 Matériel :**

Voir tableau 2.9.

### **2.10.2 Méthode :**

La sonde LysoTracker Red est une sonde acidophile caractérisée chimiquement par la présence de bases faibles. Cette sonde est donc un bon outil pour marquer les compartiments acides de la cellule tels que les lysosomes, les endosomes et les autophagosomes (Rodriguez-Enriquez *et al.*, 2006). La sonde Mitotracker Green est, quant à elle, capable de s'accumuler et de se concentrer spécifiquement dans les mitochondries. Ces deux sondes nous permettent de visualiser les populations des deux organites et une éventuelle co-localisation entre les lysosomes et des mitochondries, dans des conditions où la mitophagie est observée (Rodriguez-Enriquez *et al.*, 2006). Concrètement, les cellules sont ensemencées dans des chambres Lab-Tek II et ont été incubées avec les sondes Mitotracker Green (50 nM) et LysoTracker Red (50 nM) pendant 30 min à 37 °C dans une étuve humide (Heraeus, Hassau, Allemagne) contenant 5 % de CO<sub>2</sub>. Ensuite, les cellules ont été rincées 2 fois avec du HBSS et les cellules vivantes (maintenues dans 1 ml de HBSS) ont finalement été observées au moyen d'un microscope confocal (Leica, Solms, Germany).

## ***2.11 Méthode de transfection cellulaire et surexpression de LC3-GFP***

### **2.11.1 Principe**

La protéine LC3-II utilisée comme marqueur de l'autophagie est une protéine insérée dans la membrane des autophagosomes. Son accumulation est décrite dans la littérature comme un marqueur de l'autophagie (Klionsky et al., 2008). Purifiée à partir d'une méduse (*Aequorea victoria*), la GFP (Green Fluorescence Protein) est une protéine ayant la propriété d'émettre une fluorescence de couleur verte (à 508 nm) après excitation à 395 nm. Son gène peut être fusionné *in vitro* au gène codant pour une protéine d'intérêt. Le gène recombinant est ensuite réintroduit dans des cellules afin de, dans notre travail, visualiser la localisation de LC3 et donc indirectement l'abondance d'autophagosomes dans différentes conditions de stress. Nous avons donc utilisé cette approche expérimentale reposant sur la transfection transitoire de cellules avec un plasmide d'expression codant pour la protéine de fusion LC3-GFP. Après différents traitements comme l'incubation des deux lignées cellulaires en présence de bafilomycine pendant 24 h ou en présence de STS à 500 nM pendant 2 h, les cellules ont été observées au moyen d'un microscope confocal. Notons que la découverte et les applications de la GFP ont été couronnées par le prix Nobel de chimie décerné à Osamu Shimomura, Martin Chalfie et Roger Tsien, le 8 octobre 2008.

### **2.11.2 Méthode :**

Concrètement, les cellules sauvages et mutées sontensemencées dans boîtes de culture contenant 24 puits (Costard, France). Le lendemain, les cellules sont rincées avec 1 ml de PBS puis sont transfectées transitoirement avec 1,5 µg d'ADN codant pour la protéine LC3-GFP (pEGFP-LC3m) au moyen de l'agent transfectant Superfect (Qiagen, Venlo, Netherlands) (rapport 1 : 5 entre l'ADN et l'agent transfectant). En effet, les ADN plasmidiques étant de taille importante et chargés négativement, il est nécessaire d'utiliser un agent de transfection (vecteur) pour permettre aux plasmides de pénétrer dans les cellules. Le Superfect est un dendrimère polycationique possédant une architecture sphérique. Étant chargé positivement, il peut lier les groupements phosphates négatifs de l'ADN et compacter l'ADN facilitant ainsi son entrée dans la cellule.

Le plasmide d'expression pEGFP-LC3m nous a été donné par le Professeur Bassam Janji (LHCE CRP-Santé, Luxembourg, Luxembourg). Après 10 min d'incubation permettant la formation des complexes ADN/Superfect, ces derniers sont resuspendus dans du milieu classique (DHG 10 % + SVF, 430 µl) et la transfection se déroule pendant 6 h. Le milieu est ensuite remplacé par du milieu classique (DHG 10 % + SVF). Le lendemain, les cellules sont incubées pendant 2 h en présence ou en absence de STS à 500 nM ou en présence de bafilomycine à 100 nM. Les cellules ont ensuite été observées au microscope confocal (TCS, Leica, Solms, Allemagne).

## ***2.12 Méthode de transfection cellulaire et système rapporteur pour l'activité de p53***

### **2.12.1 Principe**

Afin d'étudier l'activité d'un facteur de transcription d'intérêt comme p53, nous avons dosé l'activité d'un gène rapporteur luciférase placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique répondant à p53. Nous avons utilisé un gène rapporteur codant pour la luciférase placée sous le contrôle d'un promoteur synthétique contenant 13 séquences consensus reconnues par le facteur de transcription (pG13-Luc) (reçu du prof. B. Vogelstein, The Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD, USA) et décrit dans (Chen *et al.*, 1994). Lorsque celui-ci est activé, il se lie à ses séquences consensus et permet le recrutement de la machinerie basale de transcription qui transcrit le gène codant pour la luciférase. Le dosage de cette enzyme est réalisé en présence d'ATP et de  $Mg^{2+}$ . En effet, dans ces conditions, la luciférase est capable de catalyser la formation de la luciférine-adiénylate à partir de luciférine. Celle-ci sera ensuite oxydée en oxyluciférine en présence d'oxygène (Figure 2.2). Cette réaction libère des photons qui sont détectés au moyen d'un luminomètre. Les valeurs obtenues pour l'activité de l'enzyme reflètent le niveau d'expression de la protéine et donc, *in fine*, l'activité du facteur de transcription étudié. En effet, le nombre de photons émis est proportionnel à l'activité de la luciférase, elle-même proportionnelle au taux de transcription, qui est lui-même fonction de l'activité du facteur de transcription.

Une transfection transitoire des cellules est réalisée afin d'introduire le plasmide contenant le gène rapporteur. Les cellules sont également transfectées avec un second plasmide (= co-transfection) afin de normaliser les valeurs brutes de l'activité de la luciférase. Ce deuxième plasmide contient un gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase placé sous le contrôle d'un promoteur constitutif fort provenant du cytomégalovirus (CMV). En théorie, l'expression de la  $\beta$ -galactosidase n'étant pas modifiée dans les différentes conditions expérimentales étudiées, l'activité de l'enzyme est uniquement fonction du nombre de cellules transfectées. Ce plasmide contenant le second gène rapporteur est donc utilisé pour normaliser les résultats par l'efficacité de transfection. L'activité de la luciférase sera donc normalisée, pour chaque condition, par l'activité obtenue pour la  $\beta$ -galactosidase.

### **2.12.2 Matériel :**

Voir tableau 2.10.

### **2.12.3 Méthode :**

Les cellules sontensemencées dans des boîtes de culture à 12 puits à une densité de 50 000 cellules par puits pour les cellules sauvages et 70 000 cellules par puits pour les cellules mutées. Le lendemain, les cellules sont rincées 1 fois avec 1 ml de PBS et transfectées avec 400  $\mu$ l de solution de transfection contenant 1  $\mu$ g d'ADN/puits. Cette quantité totale d'ADN contient 0,75  $\mu$ g de plasmide rapporteur p53 (pG613-Luc) et 0,25  $\mu$ g de plasmide pCMV- $\beta$ -gal. L'ADN est resuspendu dans du milieu DHG sans sérum et le Superfect (Qiagen, Venlo, Netherlands) est ensuite ajouté dans un rapport 1 : 5 (ADN/Superfect). Après une incubation de 10 min permettant la formation des complexes, 320  $\mu$ l de milieu DHG 5 % + SVF est ajouté à la solution contenant les complexes et 400  $\mu$ l/puits sont déposés sur les cellules. La

transfection se déroule pendant 6 h puis le milieu est remplacé par du milieu DHG contenant  $4,5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  de glucose et 10 % SVF. Les cellules sont incubées pendant 13 h pour une période de récupération. Le lendemain, les cellules sont traitées 2 ou 6 h en présence de STS à 500 nM. Au terme des différentes incubations, les cellules sont incubées dans du milieu DHG pendant 12 h et 8 h pour, respectivement, les conditions de stimulation de 2 et 6 h en présence de STS.

Les cellules sont alors rincées et lysées sous agitation pendant 10 min en présence de 200  $\mu\text{l}$  de « passive lysis buffer ». Le dosage de l'activité luciférase est réalisé par l'addition de 60  $\mu\text{l}$  de tampon de réaction contenant le substrat de la luciférase auxquels sont ajoutés 10  $\mu\text{l}$  de lysat cellulaire. La mesure se fait au luminomètre (Berthold FB12, Berthold Detection Systems, USA) dans un tube et à l'obscurité. L'activité de la  $\beta$ -gal est mesurée dans une plaque 96 puits (Costard, France) en présence de 75  $\mu\text{l}$  de tampon de réaction contenant le substrat auxquels sont ajoutés 75  $\mu\text{l}$  de lysat cellulaire. L'absorbance du produit de la réaction est déterminée au moyen d'un spectrofluorimètre à plaques (Biorad xMARK, Hercules, CA). Les résultats sont donc exprimés en unités relatives de luminescence normalisées par les valeurs de l'activité  $\beta$ -galactosidase.

## ***2.13 Dosage de la fragmentation d'ADN induite par la staurosporine***

Le dosage de la fragmentation de l'ADN constitue un des moyens les plus représentatifs pour caractériser la mort par apoptose. En effet, lors du processus apoptotique, l'ADN est coupé en fragments de taille correspondant à des multiples de 180 pb. Ceci constitue un des événements les plus tardifs du processus apoptotique et son dosage constitue donc un bon moyen de visualiser le taux d'apoptose à un temps donné.

### **2.13.1 Principe**

La fragmentation de l'ADN génomique des cellules cybrides sauvages et mutées a été mesurée au moyen du kit « Cell Death Detection ELISA » (Roche, Nutley, USA). Brièvement, les cellules ont été incubées pendant 6 ou 12 h en présence de STS à 500 nM avec ou sans 3-MA à 10 mM, un l'inhibiteur de l'autophagie. Afin de réaliser le dosage, les puits d'une plaque de culture cellulaire de 96 puits (Costard France) sont recouverts d'anticorps anti-histone H1. Ces anticorps vont permettre la liaison des nucléosomes solubles portés par les fragments d'ADN générés lors du processus apoptotique. La présence de ces fragments est ensuite révélée au moyen d'un anticorps anti-ADN couplé à une peroxydase. Après rinçage, le dosage de l'activité de la peroxydase est réalisé en présence du substrat de celle-ci, l'ABTS (2,2'-azino-bis(3-éthylbenzthiazoline-6-acide sulfonique). L'absorbance du produit de la réaction colorimétrique est dosé à 405 nm au moyen d'un spectrophotomètre.

### **2.13.2 Méthode :**

Les cellules cybrides sauvages et mutées sontensemencées dans des boîtes de culture cellulaire de 24 puits. Après 2 jours, les cellules sont incubées pendant 6 ou 12 h en présence ou en absence de STS à 500 nM avec ou sans 3-MA à 10 mM. Après avoir récupéré les cellules en suspension par centrifugation, les cellules sont lysées en présence de 250  $\mu\text{l}$  de tampon de lyse fourni dans le kit. Les lysats cellulaires sont ensuite centrifugés 7 min à 13

000 rpm permettant la sédimentation de l'ADN non fragmenté. Les surnageants sont alors récoltés et 100 µl sont mis en présence de l'anticorps anti-histone H1 préalablement « coater » dans une plaque à 96 puits pendant 90 min. Après 3 rinçages avec 300 µl de la solution de rinçage fourni dans le kit, 95 µl d'un anticorps couplé à la peroxydase et dirigé contre l'ADN sont ajoutés aux puits pendant 90 min. Enfin, après 3 nouveaux rinçages, 95 µl de tampon de réaction contenant le substrat de la peroxydase (ABTS) sont ajoutés. La peroxydase en présence de son substrat va conduire à l'accumulation d'un produit chromogène à dont l'abondance est proportionnelle à l'absorbance des fragments d'ADN. L'abondance du produit de réaction est alors mesurée à 405 nm. Afin de normaliser les résultats, un dosage des protéines (paragraphe 2.3) est effectué en parallèle, sur des puits « frères » ayant subi les mêmes traitements. Les valeurs d'absorbance obtenues pour le dosage de la fragmentation d'ADN sont alors rapportées à la quantité de protéines obtenue dans la condition correspondante. Les résultats sont donc exprimés en unités d'absorbance à 405 nm /µg de protéines.

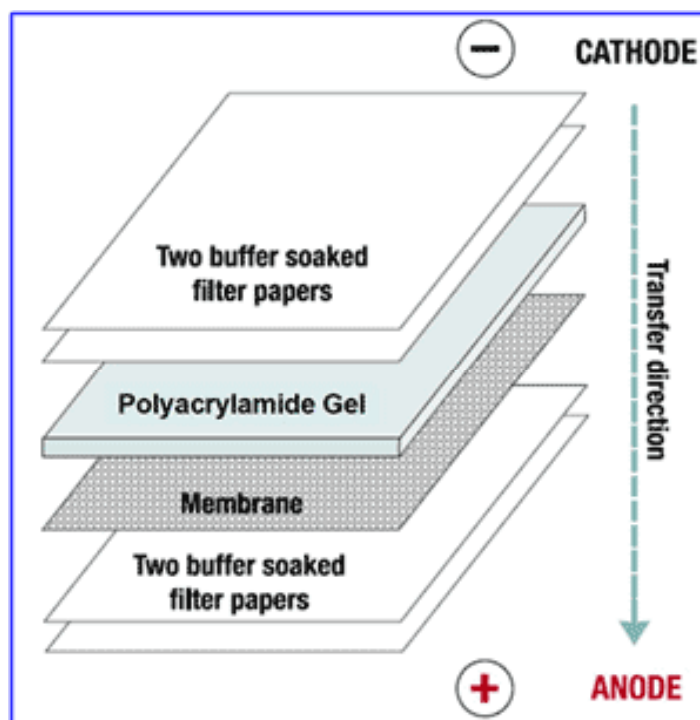


PBS (phosphate buffer saline)	150 mM NaCl, 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,4
Tampon de lyse	10 mM HEPES (4 - (2-hydroxyéthyl)-1-piperazineethanesulfonic acid) /KOH ; pH 7,0 , 10 % sucrose, 2 mM EDTA (ethylene diamine tetraacetic acid), 0.1 % CHAPS (3[(3-Cholamidopropyl) dimethylammonio]-propanesulfonic acid), 5 mM DTT (dithiothreitol) et 10 µg/ml aprotinin)
Tampon de réaction	40 mM PIPES (Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)) ; pH 7,2, 200 mM de NaCl, 2 mM d'EDTA, 0.2 % CHAPS; 0,10 % de sucrose et 10 mM de dithiothreitol
Substrat Ac-DEVD-AFC	Ac(N-acetyl)-DEVD-AFC (7-amino-4-trifluorométhyl coumarine) (BD Pharmingen, Erembodegem, Belgium), concentration stock de 1,37 mM dans du DMSO (diméthylsulfoxyde)

**Tableau 2.1: Réactifs nécessaires au dosage de l'activité de la caspase-3.**

Tampon de lyse	Tris 40 mM ; pH 7,5, 150 mM KCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100), et contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases («Complete», Roche, Molecular Biochemicals, Indianapolis, U.S.A.) et des inhibiteurs de phosphatases (250 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> , 10 mM <i>p</i> -nitrophénylphosphate, 10 nM β-glycérophosphate et 5 mM NaF)
PBS	150 mM NaCl, 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,4

**Tableau 2.2: Réactifs nécessaires à la préparation de lysats protéiques totaux.**



**Figure 2.1 : Système de sandwich pour l'étape d'électro-transfert (de type « semi-dry ») des protéines sur une membrane de PVDF.** Après avoir été hydratées dans le méthanol 100 %, les membranes de PVDF sont équilibrées dans le tampon de transfert. Elles sont ensuite déposées sous les gels lors de l'étape de transfert selon le montage suivant ; de la cathode vers l'anode : une éponge, deux papiers wathman, le gel de polyacrylamide, la membrane PVDF (PolyVinylDièneFluoride), deux papiers wathman et une éponge. L'ensemble du montage doit être humidifié avec du tampon de transfert.

Bleu de charge 5 x (gels Tris-Glycine)	10 ml de spacer gel buffer , 10 ml de SDS 20 %, 5 ml de $\beta$ -mercaptoéthanol, 17,5 g de bleu de bromophénol
Stock Nu Page LDS Sample Buffer 4 x	100 $\mu$ l de solution stock, 5 $\mu$ l de DTT 1M

**Tableau 2.3: Composition du tampon de charge des échantillons pour les électrophorèses.**

Gel 4-12 % Bis-Tris	(Invitrogen, USA)
Tampon de migration	MES (2-(N-Morpholino) Ethane Sulfonic) (Invitrogen, USA)
Antioxydants	Nu Page antioxydants NP0005 (Invitrogen, USA)
Cuve d'électrophorèse	Novex minigel-cell, (Invitrogen, USA)
Etalon de poids moléculaire	See Blue plus 2 Prestained (Invitrogen, USA)
Générateur de courant	Amersham Pharmacia Biotech, EPS 601

**Tableau 2.4 : Matériel nécessaire à l'électrophorèse en gels Nu Page**

Gel Buffer	Pour 200 ml : 36,3 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) 0,8 g de SDS (ICN Biomedicals, USA) pH 8,9
Gel mix 10 %	Pour 35 ml : 8,4 ml de gel buffer 11,6 ml d'acryl/bis (Bio-Rad, USA) 15 ml H <sub>2</sub> O
Gel mix 12 %	Pour 35 ml : 8,4 ml de gel buffer 14 ml d'acryl/bis (Bio-Rad, USA) 12,6 ml H <sub>2</sub> O
Gel séparateur	35 ml de gel mix 175 µl d'APS 25 % (Pharmacia Biotech AB, Swedish) 10,5 µl de TEMED (Pharmacia Biotech AB, Swedish)
Spacer Gel Buffer	Pour 100 ml : 5,1 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) 0,4 g de SDS (ICN Biomedicals, USA) pH 6,8
Spacer Gel Mix	Pour 40 ml : 10 ml de Spacer gel buffer 6,6 ml d'acryl/bis (Bio-Rad, USA) 23,3 ml H <sub>2</sub> O
Gel concentrateur	40 ml de Spacer gel Mix 200 µl d'APS 25 % (Pharmacia Biotech AB, Swedish) 12 µl de TEMED (Pharmacia Biotech AB, Swedish)
Running Buffer 10 x	Pour 1 l : 63,2 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) 40 g de glycine (ICN Biomedicals, USA) 10 g de SDS (ICN Biomedicals, USA)
Tampon de transfert	Pour 5 l : 24 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) 115 g de glycine (ICN Biomedicals, USA) 1 l de méthanol (Merck, Germany)
TBS 10 x	Pour 1 l : 24,22 g de TRIS (ICN Biomedicals, USA) 80,06 g de NaCl (Merck, Germany) pH 7,6
TBS-Tween 0,1 %	Pour 1 l : 100 ml de TBS 10 x 900 ml H <sub>2</sub> O 1 ml de Tween 20 (Sigma, USA)
TBS-T + Lait	TBS-Tween 0,1 % + 2 % Blocking Agent (Amersham, USA) ou 5 % de lait en poudre Gloria

**Tableau 2.5 : Compositions des différentes solutions utilisées dans les expériences de Western blotting pour l'électrophorèse Tris-Glycine, pour le transfert des protéines sur la membrane de PVDF ainsi que pour le blocage de la membrane et la dilution des anticorps.**

<b>Protéine contre laquelle l'anticorps est dirigé</b>	<b>Référence de l'anticorps</b>	<b>Espèce dans laquelle l'anticorps a été produit</b>	<b>Dilution effectuée</b>
LC3	0260-100 (Nano-tools, Teningen, Germany)	Souris	1/2000 dans un agent bloquant (Amersham Bioscience, USA)
Phospho-AMPK $\alpha$ (Thr172)	# 2531 (Cell Signaling, Danvers, USA)	Lapin	1/1000 dans un agent bloquant (Amersham Bioscience, USA)
AMPK $\alpha$	# 2532 (Cell Signaling, Danvers, USA)	Lapin	1/2000 dans un agent bloquant (Amersham Bioscience, USA)
Phospho-p70 S6 kinase (Thr389)	#9234 (Cell Signaling, Danvers, USA)	Lapin	1/2000 dans un agent bloquant (Amersham Bioscience, USA)
P70 S6 kinase	#9202 (Cell Signaling, Danvers, USA)	Lapin	1/2000 dans un agent bloquant (Amersham Bioscience, USA)
Phospho-AKT (Ser 473)	#9271 (Cell Signaling, Danvers, USA)	Souris	1/2000 dans un agent bloquant (Amersham Bioscience, USA)
P53	#05-224 (upstate, Cell Signaling, Danvers, USA)	Souris	1/10 000 dans un agent bloquant (Amersham Bioscience, USA)
$\alpha$ -tubuline	T5168 (Sigma, USA)	Souris	1/50 000 dans un agent bloquant (Amersham Bioscience, USA)
$\beta$ -actine	A5442 (Sigma, USA)	Souris	1/2000 dans un agent bloquant (Amersham Bioscience, USA)

**Tableau 2.6 : Liste des anticorps primaires utilisés.**

<b>Nom de l'anticorps</b>	<b>Fournisseur</b>	<b>Dilution effectuée</b>
Anti-IgG de souris couplé à la HRP (Horse Radish Peroxidase)	Amersham Bioscience, USA	1/300000
Anti-IgG de lapin couplé à la HRP (Horse Radish Peroxidase)	Amersham Bioscience, USA	1/300000

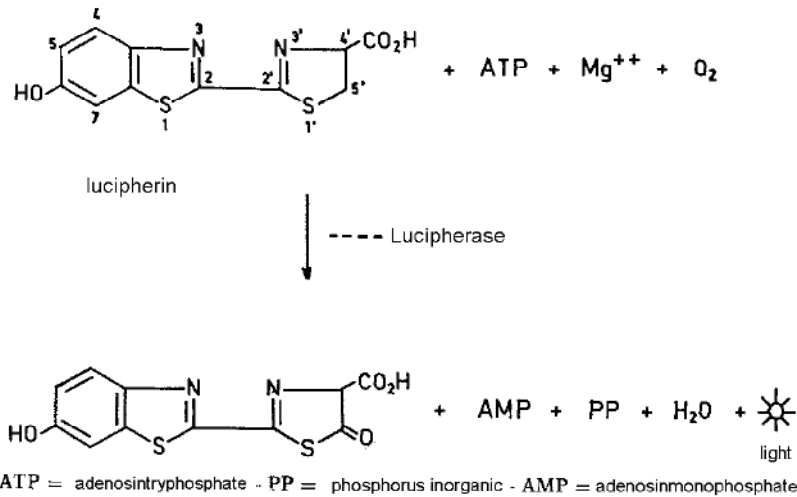
**Tableau 2.7 : Liste des anticorps secondaires utilisés.**

PBS	mM NaCl, 10 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> /K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; pH 7,4
PBS-Triton X-100 à 1 %	(Sigma, St Louis, USA)
PBS-BSA à 2 %	(Sigma, St Louis, USA)
PBS-paraformaldéhyde à 4 %	(Merck, Whitehouse Station, USA)
Mowiol	0.1g de mowiol (Aldrich, Bornem, Belgium) par ml de tampon de composition : 1.5 M tris; pH 8,8 contenant 22 % de glycérol
Anticorps primaire	anticorps monoclonal de souris anti-LC3 (Nano-tools, Teningen, Germany)
Anticorps secondaire	anticorps de chèvre anti-IgG de souris couple à une sonde fluorescente Alexa 488 nm (Molecular probes, OR, USA) diluée 1000X dans du PBS-BSA 2 %
TOPRO-3	TOPRO-3 (Sigma, St Louis, USA) dilué 80 x dans une solution de RNase à 2 mg:ml dans du PBS

**Tableau 2.8. Matériel utilisé pour le marquage en immunofluorescence.**

Sonde lysosomale	Lysotracker Red (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)
Sonde mitochondriale	Mitotracker Green (Molecular Probes, Eugene, OR, USA)
Chambre cellulaire couverte	Lab-Tek II (Nunc, Rochester, NY, USA)
HBSS	Hanks Buffered Salt Solution de composition: 137 mM NaCl, 5,36 mM KCL, 337 µM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 441 µM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 406 µM MgSO <sub>4</sub> , 492 µM MgCl <sub>2</sub> , 4,17 mM NaHCO <sub>3</sub> , 5 mM glucose et 100 mM CaCl <sub>2</sub>

**Tableau 2.9 : Matériel utilisé pour le marquage des mitochondries et des lysosomes à l'aide de sondes fluorescentes et leur visualisation en microscopie confocale.**



**Figure 2.2 : Réaction catalysée par la luciférase. En présence d'ATP, de Mg<sup>2+</sup> et d'O<sub>2</sub>, la luciférase est capable d'oxyder la luciférine, produisant de l'oxyluciférine et libérant des photons.**

Passive lysis buffer	(Promega, Madison, USA)
Substrat luciférase	luciferase assay substrate (Promega, Madison, USA)
Tampon luciférase	luciferase assay buffer (Promega, Madison, USA)
Luminomètre	Berthold FB12 (Berthold Detection Systems, USA)
Substrat β-galactosidase	pour 50 ml : 2 ml tp P 0,5 MpH 7,4 ; 20,3 mg MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O ; 66,5 mg de 2-nitrophényl-β-D-galactopyranoside et 350 µl de 2-mercaptoéthanol
spectrofluorimètre lecteur de plaques	(Biorad xMARK, Hercules, CA)

**Tableau 2.10 : Réactifs utilisés pour la transfection cellulaire et système rapporteur de l'activité de p53.**





### 3 Résultats et discussions

#### *3.1 Étude de l'effet du 3-MA, un inhibiteur de l'autophagie sur l'activation de la caspase-3 induite par la staurosporine*

Rappelons que dans notre travail, nous avons 3 objectifs principaux. Premièrement, nous devons implémenter les outils et les marqueurs moléculaires permettant de caractériser l'autophagie dans les cellules cybrides sauvages et mutées stimulées par la staurosporine. Deuxièmement, nous devons rechercher l'état d'abondance et/ou d'activité de plusieurs effecteurs ou modulateurs de l'autophagie et de l'apoptose dans nos conditions expérimentales (en recherchant l'état d'activité de certains membres de la voie mTOR, de la voie PI3K/Akt/PKB, de l'AMPK, et en mesurant l'activité de transactivation du facteur de transcription p53). Enfin, dans une expérience encore préliminaire, nous avons tenté de rechercher les effets éventuels de l'inhibition de l'autophagie sur la réponse apoptotique.

Dans toutes les parties de ce travail, nous serons particulièrement attentifs aux éventuelles réponses différentielles observées (amplitude des modifications, cinétique des changements,...) entre des cellules cybrides sauvages et mutées exposées à la staurosporine.

Avant d'entamer la présentation des résultats, nous voudrions d'abord remettre notre hypothèse de travail (possibilité de l'existence d'une relation entre l'autophagie et l'apoptose dans la mort des cellules incubées en présence de staurosporine) dans le contexte des travaux menés précédemment au laboratoire. Ces études portant sur la sensibilité différentielle des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial à la présence de molécules pro-apoptotiques comme la staurosporine ont été réalisées au laboratoire par Guillaume Rommelaere (Thèse de doctorat en cours, FRIA 4<sup>ème</sup> année). Afin de rechercher un effet éventuel de l'autophagie sur une composante de l'apoptose induite par la STS dans des cellules portant la mutation mitochondriale A8344G dans le génome mitochondrial responsable du syndrome MERRF, nous avons utilisé la 3 méthyladénine (3-MA), un inhibiteur de l'autophagie couramment utilisé dont le mécanisme d'action repose sur l'inhibition de la PI3 kinase de classe III (Seglen & Gordon, 1982) et tester son effet sur l'activité de la caspase-3, un marqueur classique de l'apoptose (Jin & El-Deiry, 2005).

L'activité de la caspase-3 a donc été mesurée dans des lysats cellulaires préparés à partir de cellules cybrides sauvages et mutées après une incubation de 6 h avec ou sans staurosporine à 500 nM en présence ou en absence de 3-MA à la concentration de 10 mM. Dans certaines conditions, pour permettre une action optimale de l'inhibiteur de l'autophagie avant l'addition de la STS, les cellules ont été pré-incubées pendant une heure en présence de 3-MA seul. Dans ces conditions de pré-incubation, l'autophagie est donc inhibée avant l'addition de la molécule pro-apoptotique. Comme nous pouvons le voir à la Figure 3.1, nous observons bien une augmentation significative de l'activité de la caspase-3 dans les cellules cybrides mutées en réponse à une incubation de 6 h en présence de STS. Cette activation est peu ou pas observée dans les cellules cybrides sauvages (Figure 3.1). De plus, nous pouvons également observer que la présence du 3-MA est capable de diminuer significativement (environ 30 %) l'activation de la caspase-3 induite par la STS dans les cellules cybrides mutées. Ces résultats suggèrent donc que l'inhibition de l'autophagie pourrait diminuer l'activation de la caspase-3, un effecteur majeur de la réponse apoptotique canonique (Jin & El-Deiry, 2005). Nous avons évidemment vérifié que le 3-MA n'inhibe pas l'activité de la caspase-3 lorsqu'elle est ajoutée, à la même concentration, au moment du dosage de la

protéase (résultats non montrés). Il a déjà été montré dans un autre modèle d'apoptose, des cellules HL60 incubées en présence de As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, que l'inhibiteur de l'autophagie pourrait moduler la libération du Cytochrome c et l'activation de la caspase-3 (Yang *et al.*, 2008). Ces auteurs montrent également que l'effet de l'inhibiteur de l'autophagie sur l'inhibition de la caspase-3 dépend du moment auquel il est ajouté par rapport à l'incubation en présence de As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. Bien qu'à ce stade du travail, le mécanisme soit inconnu, nous postulons donc qu'une relation pourrait exister entre l'autophagie et l'apoptose dans des cellules cybrides mutées MERRF, présentant une diminution de l'activité mitochondriale, incubées en présence d'un inducteur apoptotique comme la STS.

### ***3.2 Caractérisation et validation de marqueurs autophagiques dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées en absence de sérum ou en présence de bafilomycine A<sub>1</sub>.***

Dans le but de disposer de plusieurs marqueurs et techniques fiables pour caractériser l'autophagie dans les cellules exposées à la STS, nous avons d'abord décidé de caractériser l'autophagie en présence d'inducteurs connus pour stimuler l'autophagie comme la privation de sérum (Gonzalez-Polo *et al.*, 2005) ou la bafilomycine A<sub>1</sub>, décrite comme un inhibiteur spécifique de la pompe à H(+)-ATPase (V-ATPase) vacuolaire. Cette molécule inhiberait donc l'acidification des organites contenant cette enzyme comme les lysosomes et les endosomes, qui, *in fine*, bloquerait la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (Yamamoto *et al.*, 1998). Ajoutons encore que, bien que le sérum contienne des acides aminés, la privation de sérum doit se distinguer de la privation en nutriments, puisque les acides aminés sont essentiellement présents dans le milieu de culture. L'absence de sérum provoque donc essentiellement une déplétion en facteurs de croissance comme l'insuline et d'autres, bien connus pour réprimer la réponse autophagique (Gozuacik & Kimchi, 2007).

#### **3.2.1 Caractérisation et validation de marqueurs autophagiques dans des cellules répondant à une privation de sérum ou à la bafilomycine A<sub>1</sub>.**

Plusieurs marqueurs et techniques peuvent être utilisés pour caractériser l'autophagie. Parmi ceux-ci, l'observation de l'ultrastructure cellulaire en microscopie électronique et l'analyse de l'abondance de la protéine LC3 par Western blot ou en microscopie à fluorescence permettent de rendre compte de l'étape de formation des autophagosomes, alors que d'autres comme l'analyse de la co-localisation des autophagosomes avec les lysosomes sont des signatures de la dégradation autophagique de protéines (Klionsky *et al.*, 2008). Cependant, ces différents marqueurs de l'autophagie, analysés à un moment donné, ne constituent pas toujours des marqueurs fiables et les résultats générés sont parfois difficiles à interpréter en raison même du caractère dynamique que présente l'autophagie (Canu *et al.*, 2005). Le marqueur de l'autophagie probablement le mieux accepté est la protéine LC3 (microtubule-associated protein Light Chain 3) (Klionsky *et al.*, 2008). En effet, cette protéine impliquée dans la formation et l'élongation de l'autophagosome est, aujourd'hui, largement utilisée comme marqueur afin de rendre compte de l'évolution du processus autophagique.

Dans un premier temps, nous avons donc réalisé une expérience visant à détecter la conversion de LC3-I en LC3-II (une forme conjuguée à la PE) par une analyse en Western blot. En effet, l'abondance de la protéine située en membrane de l'autophagosome (LC3-II)

est directement proportionnelle au nombre de ceux-ci (Mizushima & Yoshimori, 2007). Cependant, l'abondance de cette protéine est régulée de manière dynamique lors du processus autophagique, ceci explique pourquoi l'abondance de LC3-II, à un temps donné, ne donne aucune information sur la dynamique de l'autophagie. Il est donc important de mesurer l'abondance de LC3-II qui pourrait potentiellement être délivrée au lysosome en comparant le niveau de LC3-II en présence ou en absence d'un inhibiteur de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome comme la bafilomycine<sub>A1</sub>. Cette molécule a, en effet, la capacité d'inhiber les H<sup>+</sup>-ATPases situées en membrane du lysosome. Ceci a pour effet d'empêcher l'acidification de celui-ci et d'inhiber la fusion entre l'autophagosome et le lysosome (Mizushima & Yoshimori, 2007).

Nous avons donc comparé l'abondance de la protéine LC3-II par Western blot dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées pendant 24 h en présence ou en absence de bafilomycine<sub>A1</sub> à 100 nM (Figure 3.2.A). Dans ces conditions, nous voyons que le signal correspondant à LC3-II (16 kDa contre 18 kDa pour la forme LC3-I) est plus intense dans les cellules incubées en présence de bafilomycine<sub>A1</sub>. La privation de sérum pendant 24 h, utilisée comme un inducteur de l'autophagie (Martinet *et al.*, 2006) conduit également à la formation de la forme LC3-II (Figure 3.2.A). De plus, nous nous pouvons encore observer que lorsque l'on combine l'absence de sérum et la bafilomycine<sub>A1</sub>, l'accumulation du marqueur des autophagosomes est plus forte et ce, dans les deux lignées cellulaires (Figure 3.2.A). De plus, il semble que l'abondance de la forme LC3-I de la protéine soit également plus importante en absence de sérum et ceci de manière plus importante en présence de bafilomycine<sub>A1</sub>. Nous devons également mentionner que dans ces conditions expérimentales les deux lignées cellulaires répondent de manière comparable aux inducteurs autophagiques.

Les effets de la bafilomycine<sub>A1</sub> sur les modifications d'abondance et la localisation de la protéine LC3 ont été confirmés par des marquages en immunofluorescence de la protéine LC3 (Figure 3.2.B). Les cellules cybrides sauvages et mutées ont été incubées pendant 24 h sans sérum ou en présence de bafilomycine<sub>A1</sub> à 100 nM puis le marquage de la protéine LC3 a été réalisé et les cellules ont été observées en microscopie confocale. Sur les microphotographies présentées à la figure 3.2.B, nous pouvons détecter un marquage ponctué dans le cytosol des cellules incubées en absence de sérum ou en présence de bafilomycine<sub>A1</sub>. Ces marquages ponctuels pourraient donc correspondre au regroupement et à l'accumulation de la protéine LC3 et refléter la formation d'autophagosomes. Enfin, l'effet de la bafilomycine<sub>A1</sub> sur l'accumulation de LC3 a été confirmé par la localisation de la protéine LC3-GFP surexprimée dans des cellules sauvages et mutées transfectées transitoirement avec un plasmide codant pour la protéine de fusion (3.2.C). Nous pouvons voir que la fluorescence du signal LC3-GFP est diffuse dans le cytoplasme des cellules cybrides sauvages et mutées et est ponctuelle lorsque les cellules ont été incubées en présence de la bafilomycine<sub>A1</sub> à 100 nM pendant 24 h. Ces différents résultats ont donc permis de valider, dans nos cellules et conditions expérimentales, des marqueurs et des techniques qui seront utilisés pour caractériser l'autophagie des cellules incubées en présence de STS reposant sur l'accumulation de la protéine LC3-II lors de la formation d'autophagosomes (Klionsky *et al.*, 2008).

### **3.2.2 Caractérisation des effets de la staurosporine sur l'accumulation de LC3-II dans des cellules cybrides sauvages et mutées**

Après avoir caractérisé l'autophagie dans des cellules traitées avec des inducteurs de celle-ci, nous avons ensuite analysé l'abondance de la protéine LC3-II, par Western blot, dans des lysats cellulaires préparés à partir de cellules cybrides sauvages et mutées incubées en présence de STS à 500 nM pendant 2 h et nous avons comparé les signaux obtenus pour l'accumulation de la protéine dans des lysats de cellules incubées pendant 24 h en présence de bafilomycine<sub>A1</sub> (Figure 3.3.A). Les résultats confirment l'effet de la bafilomycine mais, de manière plus intéressante, ils montrent que la staurosporine est également capable d'induire une forte augmentation de l'abondance de la protéine LC3-II. Ajoutons également que les deux lignées cellulaires semblent répondre de manière comparable à la STS. L'addition simultanée de STS et de bafilomycine<sub>A1</sub> n'induit pas d'accumulation plus importante de la protéine LC3. Ces résultats montrent que la STS, en plus de sa capacité à induire l'apoptose dans des cellules cybrides sauvages et mutées (Liu et al., 2004), pourrait agir comme un activateur fort de l'autophagie dans les deux lignées cellulaires comme le démontre l'accumulation de la protéine LC3-II observée dans nos conditions expérimentales.

De plus, l'effet de la staurosporine sur l'accumulation d'autophagosomes a également été confirmé par des immunomarquages de la protéine LC3 endogène (Figure 3.3.B) et par la localisation de la protéine LC3-GFP surexprimée de manière ectopique dans des cellules cybrides sauvages et mutées puis stimulées par la STS (Figure 3.3.C). En effet, ces différents résultats confirment l'acquisition d'une distribution ponctuée de la protéine LC3 dans des cellules incubées en présence de STS. Cette distribution étant compatible avec une augmentation de la formation d'autophagosomes dans des cellules incubées avec l'alcaloïde (Klionsky et al., 2008). En conclusion, ces données confirment le fait que la staurosporine agit comme un inducteur de la formation d'autophagosomes. La formation d'autophagosomes par la staurosporine avait déjà été montrée (Bampton *et al.*, 2005).

### **3.2.3 Mise en évidence de vacuoles autophagiques dans des cellules sauvages et mutées incubées avec la bafilomycine<sub>A1</sub> en absence de sérum ou traitées par la staurosporine**

Il est important de souligner que l'autophagie a été détectée pour la première fois par la technique de microscopie électronique. La séquestration de parties de cytoplasme par le phagophore (caractérisé par une double membrane lisse sans ribosomes qui pourrait provenir d'éléments du réticulum endoplasmique), (Mijaljica *et al.*, 2006) qui va évoluer en un autophagosome est donc un marqueur principal de l'autophagie. L'utilisation de la microscopie électronique et l'étude de l'ultrastructure de la cellule peut donc apporter des informations précieuses dans l'analyse quantitative et qualitative des différentes structures autophagiques (Klionsky et al., 2008).

Rappelons cependant que l'autophagie est un processus continu et que la structure et la composition de la vacuole va changer tout au long du processus. Nous passons donc de l'état phagophore caractérisé par la formation de la double membrane à l'état autophagosome (caractérisé par une double membrane lisse séquestrant une partie de cytoplasme) pour terminer par l'étape autophagolysosome, caractérisé par une membrane simple (la membrane interne étant dégradée par les protéases lysosomales) et par la présence de parties de cytoplasme partiellement dégradées avec des agrégats plus denses aux électrons

correspondant à l'accumulation de ribosomes (Eskelinen, 2008). Ces différentes structures ont été récemment décrites et sont illustrées à la figure 3.4 (d'après Eskelinen 2008).

Afin de visualiser d'éventuelles structures autophagiques et de confirmer l'effet pro-autophagique de la STS dans nos lignées cellulaires, des cellules cybrides sauvages et mutées ont été incubées en présence de la staurosporine avant d'être observées en microscopie électronique à transmission (Figures 3.5 et 3.6). Sur ces planches reprenant les microphotographies, nous avons également illustré l'ultrastructure de cellules cybrides sauvages et mutées incubées dans les conditions optimales pour induire l'autophagie (déjà utilisées dans les expériences précédentes) comme la combinaison de l'absence de sérum et la présence de la bafilomycine<sub>A1</sub>. Pour chacune des conditions, nous illustrons l'ultrastructure observée à trois grossissements différents (3700 x, 8900 x et 30000 x) afin d'illustrer, respectivement, l'aspect général de la cellule, une partie du cytoplasme et l'ultrastructure d'un organelle en particulier.

Sur les micrographies des cellules sauvages contrôles présentées à la figure 3.5.A, nous pouvons voir que le noyau occupe une place importante dans la cellule. Le cytoplasme contient des mitochondries contenant de fines crêtes régulières. Lorsque les cellules sauvages sont privées de sérum pendant 24 h en présence d'un inducteur de l'autophagie comme la bafilomycine<sub>A1</sub>, leur aspect général ne semble pas modifié (Figure 3.5.B). Cependant, à un plus fort grossissement, on remarque une modification de certaines mitochondries. Celles-ci apparaissent gonflées par rapport aux mitochondries des cellules contrôles. De plus, dans certaines cellules, nous avons pu mettre en évidence la présence de vacuoles autophagiques tardives (autophagolysosomes) caractérisées par une membrane encerclant une partie de cytoplasme et des organites à un stade avancé de dégradation. Nous pouvons également voir des vacuoles autophagiques précoces (autophagosomes) caractérisées par une double membrane lisse séquestrant une partie de cytoplasme. Les micrographies correspondant aux cellules incubées en présence de STS à 500 nM pendant 2 h sont présentées à la figure 3.5.C. Suite à l'incubation en présence de l'alkaloïde, la morphologie générale des cellules est modifiée. Les cellules semblent en effet se condenser et sont de forme plus circulaire compatible avec la rétraction cellulaire observée en microscopie à contraste de phase (données non montrées). De manière intéressante, nous avons pu mettre en évidence, dans certaines de ces cellules, la présence de vacuoles autophagiques tardives (autophagolysosomes) et la présence de petites vacuoles entourées d'une double membrane délimitant de petites portions de cytoplasme et compatible avec la description des vacuoles autophagiques précoces (autophagosomes) (Eskelinen, 2008). Enfin, à la figure 3.5.D, lorsque les cellules ont été incubées avec de la STS à 500 nM pendant 2 h en présence de l'inhibiteur de l'autophagie (3-MA) l'aspect général des cellules est comparable aux cellules contrôles. Cependant, on retrouve, dans le cytoplasme de ces cellules, une accumulation de mitochondries présentant une morphologie gonflée inhabituelle (« mitochondrial swelling »). De plus, la proportion de vacuoles autophagiques semble plus faible dans cette condition que dans la condition STS seule.

Les différentes conditions capables d'induire l'autophagie ont également été étudiées dans les cellules cybrides mutées (Figure 3.6.). Dans les conditions contrôles (Figure 3.6.A.), la morphologie générale des cellules est comparable aux cellules cybrides sauvages. Nous avons cependant remarqué que les mitochondries des cellules mutées peuvent, dans une plus grande proportion, présenter des structures moins régulières que les mitochondries des cellules sauvages et ce, plus particulièrement au niveau des crêtes mitochondriales. À la figure 3.6.B, les cellules ont été incubées en absence de sérum pendant 24 h avec de la bafilomycine<sub>A1</sub> à 100 nM. Dans ces conditions, la présence de vacuoles autophagiques

tardives a également été mise en évidence. En présence de staurosporine (Figure 3.6.C), nous pouvons voir que les mitochondries présentent une morphologie gonflée et une forte perturbation dans le nombre et la forme des crêtes. Cependant, on peut trouver, dans ces cellules, des vacuoles à double membranes (autophagosomes) capables d'enfermer des organites composés eux aussi d'une double membrane telles que des mitochondries (Figure 3.6.C). Enfin, dans ces conditions, nous avons également observé des vacuoles autophagiques tardives caractérisées par une membrane encerclant une partie de cytoplasme et des organites à un stade avancé de dégradation.

La staurosporine serait donc capable d'induire la formation d'autophagosomes capable de dégrader des organites entiers dans nos lignées cellulaires. Enfin, dans les cellules incubées en présence de STS à 500 nM en présence de l'inhibiteur de l'autophagie (3-MA), on observe, comme pour les cellules cybrides sauvages incubées dans les mêmes conditions, une accumulation de mitochondries présentant des morphologies inhabituelles et une moindre abondance de vacuoles autophagiques.

Ces observations nécessitent une analyse plus fine et la confrontation de ces observations à un expert habitué à l'interprétation de l'ultrastructure des vésicules cellulaires d'autophagie. De plus, il est évident que l'interprétation de ces observations est difficile et ne repose sur aucune approche visant à quantifier les changements observés. Ajoutons cependant que les structures observées correspondent aux descriptions présentées pour les vésicules d'autophagie retrouvées dans la littérature dans un modèle de fibroblastes incubés 2 h en absence de sérum (Figure 3.4) (Eskelinen, 2008).

#### **3.2.4 Étude de la cinétique d'accumulation de la protéine LC3-II au cours du temps dans des cellules sauvages et mutées (MERRF) en présence de staurosporine**

Comme nous l'avons vu dans le cadre de l'introduction au point 1.4, dans la dernière étape du processus autophagique, l'autophagosome fusionne avec le lysosome. La protéine LC3-II sera donc dégradée. La caractérisation de la dynamique de l'autophagie ne reposant que sur l'étude de l'augmentation de l'abondance de la protéine LC3-II à un temps donné n'est donc pas facile à interpréter. En effet, l'accumulation de LC3-II peut résulter de la formation d'autophagosomes incapables de fusionner avec les lysosomes. L'accumulation de LC3-II ne signe donc pas, avec certitude, un processus autophagique complet. Il est donc important de s'intéresser à l'évolution de l'abondance de la protéine LC3-II au cours du temps d'incubation en présence de STS. Nous avons donc réalisé une cinétique de l'accumulation de LC3-II dans des cellules répondant à la staurosporine (Figure 3.7).

Nous avons donc testé l'effet de l'inducteur apoptotique à une concentration de 500 nM sur l'abondance de LC3-II par une analyse en Western blot dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées pendant des temps croissants en présence de STS. Dans les cellules cybrides sauvages (Figure 3.7.A), nous pouvons voir que l'abondance basale de la protéine LC3-II est faible et que cette abondance augmente progressivement au cours du temps d'incubation en présence de STS. Précisons de suite que sur ce blot, l'augmentation du signal correspondant à la protéine LC3-II entre 30 min et 2 h pourrait être artéfactuelle. En effet, la charge protéique semble également augmenter dans ces conditions. Par contre, nous observons une augmentation de l'abondance de la protéine LC3-II dans les cellules pour des temps d'incubation en présence de STS supérieurs à 4 h. Après 16 et 24 h de traitement, il semble que l'abondance de la protéine LC3 soit plus faible par rapport à l'abondance

observée après 12 h d'incubation. Dans les cellules mutées (Figure 3.7.B), un premier cycle de formation de vésicules autophagiques semble apparaître très rapidement en réponse à la présence de staurosporine. L'accumulation de la protéine LC3-II apparaîtrait donc plus rapidement dans les cellules cybrides mutées que dans les cellules cybrides sauvages en réponse à la STS. Après 1 h, la protéine LC3-II pourrait être dégradée suite à la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. Ceci pourrait expliquer la diminution graduelle et progressive de l'abondance de la protéine LC3-II entre 1 et 6 h d'incubation. Par la suite, entre 6 et 24 h, un nouveau cycle d'accumulation et de disparition de vacuoles autophagiques caractérisée par une nouvelle accumulation de LC3-II suivie de sa dégradation pourrait être observé dans les cellules cybrides mutées incubées en présence de STS. Ces résultats semblent montrer que la mise en place de la réponse autophagique est plus rapide dans cette lignée cellulaire.

### **3.2.5 Mise en évidence du processus de mitophagie dans des cellules cybrides sauvages et mutées répondant à des inducteurs de l'autophagie : recherche de la co-localisation de mitochondries et de lysosomes suite aux marquages des organites par les sondes Mitotracker Green et Lysotracker Red**

Afin d'évaluer une possible augmentation de l'autophagie mitochondriale (mitophagie) dans les deux lignées cellulaires pendant la réponse autophagique déclenchée par la staurosporine, nous avons utilisé une méthode déjà validée pour déterminer une éventuelle co-localisation entre les mitochondries et les lysosomes dans des cellules rho0 (complètement déplétées en ADNmt) en réponse à une privation de sérum (Gu *et al.*, 2004).

Nous avons utilisé les sondes Mitotracker Green et Lysotracker Red afin de marquer et de visualiser, respectivement, les compartiments mitochondriaux et lysosomiaux. Notre objectif est de détecter une éventuelle co-localisation des organites attestée par la « couleur jaune » résultant de la superposition des signaux de fluorescence associés aux deux organites et ce, dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées en présence de STS. Afin de valider ce test dans nos conditions expérimentales et d'obtenir un bon marquage pour les deux organites, nous avons d'abord testé différentes concentrations en Lysotracker Red. La concentration en Mitotracker Green (50 nM) a été déterminée en se basant sur des travaux préliminaires menés au laboratoire (Thèse Ludovic Mercy, 2008).

Nous avons donc incubé des cellules cybrides sauvages et mutées avec 50 nM de Mitotracker Green en présence de 20, 50 ou 100 nM de Lysotracker Red (résultats non montrés). Sur base de la résolution et des intensités de marquage obtenues pour les compartiments acides lors des observations réalisées, nous avons décidé de garder la concentration de 100 nM dans les futures expériences nécessitant un marquage avec la sonde fluorescente Lysotracker Red.

Dans un premier temps, nous avons testé l'augmentation d'une éventuelle co-localisation entre les mitochondries et les lysosomes dans des cellules cybrides sauvages (Figure 3.8.A) et mutées (Figure 3.8.B) incubées pendant 24 h en absence de sérum (Figure 3.8.). Sur ces microphotographies, il est très difficile de déterminer si l'abondance de la population mitochondriale est différente entre les deux lignées cellulaires. Nous pouvons seulement voir la présence d'un réseau de mitochondries assez développé dans les deux lignées cellulaires. Cependant, bien que la résolution des structures et la qualité des co-localisations soient mauvaises sur les microphotographies imprimées (qui ne représentent pas

bien ce qui est visible sur les supports numériques), ces microphotographies montrent une faible co-localisation des mitochondries et des lysosomes dans les cellules contrôles. L'existence de certains points de co-localisation peut être expliquée par le fait que la mitophagie est un processus continu dans les cellules qui assure une dégradation basale d'une certaine proportion de mitochondries non fonctionnelles (Mijaljica *et al.*, 2007). Cependant, lorsque les cellules sauvages sont incubées en absence de sérum pendant 24 h, on remarque une augmentation de la co-localisation entre les mitochondries et les lysosomes, reflétant une augmentation de la « mitophagie » dans cette condition (Figure 3.8.A). De manière très intéressante, la mitophagie induite par la privation de sérum dans les cellules cybrides mutées semble être plus importante que dans les cellules contrôles comme le montre une co-localisation plus forte entre les mitochondries et les lysosomes dans les cellules cybrides sauvages incubés dans ces conditions (Figure 3.8.B). Des résultats comparables ont déjà été obtenus par Gu et ses collaborateurs qui ont examiné la réponse de cellules 143B (cellules d'ostéosarcome humain) déplétées en ADNmt et de cellules cybrides MELAS à la privation de sérum. Dans ces conditions, ils montrent une augmentation de l'autophagie de mitochondries plus importante dans des cellules ne possédant plus d'ADNmt et dans les cellules MELAS porteuses d'une mutation ponctuelle dans le gène codant pour l'ARNt<sup>Leu</sup>. Ces deux lignées cellulaires présentant une absence ou une altération de la fonction bioénergétique mitochondriale seraient donc plus sensibles à la privation de sérum et donc à l'absence de facteur de croissance. De plus, ces auteurs montrent également que l'augmentation de la mitophagie induite par la privation de sérum peut être complètement inhibée par la seule addition d'IGF-1 (Insulin-like growth factor-1) à du milieu sans sérum. De même, l'addition de IGFBP-1 phosphorylée, une protéine qui lie et séquestre IGF-1 du sérum stimule la mitophagie dans les cellules présentant un (dys/non)fonctionnement mitochondrial (Gu *et al.*, 2004).

Dans un second temps, puisque techniquement, nous avons pu mettre en évidence une augmentation de la co-localisation entre des mitochondries et des lysosomes dans les cellules répondant à une condition bien connue pour stimuler la « mitophagie », nous avons répété ce type d'expériences sur des cellules cybrides sauvages et mutées incubées pendant 4 h en présence de STS (Figure 3.9). Dans ces conditions, nous pouvons voir que, tant dans les cellules cybrides sauvages (Figure 3.9.A) que dans les cellules cybrides mutées (Figure 3.9.B), on retrouve une forte augmentation du nombre d'évènements de co-localisation entre les mitochondries et les lysosomes. Ces résultats montrent que la STS est non seulement capable d'induire l'autophagie mais que cette autophagie est, du moins en partie, spécifique des mitochondries (mitophagie) et ce, dans nos deux lignées cellulaires. Récemment, il a été montré que la staurosporine induit l'autophagie des mitochondries et que le seul domaine transmembranaire COOH-terminal de Bcl-XL inhibe la « mitophagie » dans ces conditions par un mécanisme d'altération de la morphologie mitochondriale qui serait donc indépendant du domaine de séquestration BH3 et donc de l'interaction de cette protéine avec d'autres membres de la famille Bcl2 (Zheng *et al.*, 2008).



### ***3.3 Effets de la STS sur l'activité de certains acteurs moléculaires impliqués dans les réponses apoptotiques et autophagiques induites dans des cellules cybrides sauvages et mutées***

Après avoir démontré que la staurosporine induit l'autophagie dans les cellules cybrides sauvages et mutées, nous avons recherché les effets éventuels de ce traitement sur l'activité de certains acteurs moléculaires décrits pour contrôler la réponse apoptotique et/ou l'autophagie. Nous avons donc décidé de nous intéresser à certains acteurs moléculaires reconnus comme pouvant jouer un rôle important dans l'initiation et/ou le contrôle de la réponse autophagique. Les effecteurs moléculaires étudiés dans la suite de ce travail comme mTOR, PI3K/Akt/PKB, AMPK et p53 ne représentent pas un ensemble exhaustif des acteurs potentiellement impliqués dans ces réponses mais, sur base de la littérature, nous considérons qu'ils représentent des candidats intéressants pour cibler les voies principales de régulation de l'autophagie dans les cellules (Levine & Abrams, 2008, Hoyer-Hansen & Jaattela, 2007, Baehrecke, 2005). Les quatre acteurs que nous allons étudier dans la suite de ce travail sont : la kinase p70S6 un substrat spécifique de la kinase mTOR (Pattingre et al., 2008), le senseur énergétique AMPK (Hoyer-Hansen & Jaattela, 2007), la kinase Akt/PKB activée dans la voie des PI3 kinases (Baehrecke, 2005) et enfin le facteur de transcription p53, une protéine connue pour son activité transactivatrice mais également sa capacité d'interagir avec des membres de la famille Bcl-2 (Pietsch et al., 2008b). La protéine p53 joue de multiples rôles dans la régulation du cycle cellulaire, de l'apoptose et également dans la régulation du processus autophagique (Levine & Abrams, 2008). L'intérêt d'étudier les modifications d'activités éventuelles de ces molécules dans les cellules incubées en présence de STS est qu'elles sont toutes capables de participer tant au contrôle de l'apoptose que de l'autophagie (voir introduction).

#### **3.3.1 Étude de l'état d'activité de mTOR dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées en présence de staurosporine ou en absence de sérum par l'analyse de la phosphorylation de son substrat : la protéine kinase p70S6 (p70S6K)**

Comme nous l'avons vu dans l'introduction au paragraphe 1.4.3.2, mTOR est une kinase active de manière constitutive en conditions basales et est le principal inhibiteur de l'induction de l'autophagie dans ces conditions (Pattingre et al., 2008). De plus, mTOR est capable, lorsqu'elle est active, de phosphoryler (sur la Thr 389) et d'activer la kinase ribosomale S6 (p70S6K) nécessaire à la traduction de certains ARNm. En effet, cette kinase phosphoryle S6, une protéine de la petite sous-unité (40 S) du ribosome dans les cellules eucaryotes de mammifères qui joue un rôle dans la régulation de la traduction d'ARNm codant pour des protéines ribosomales et certains facteurs de traduction (Jefferies *et al.*, 1997). L'activation de la protéine p70S6K est inhibée par la rapamycine dans de très nombreux modèles cellulaires, montrant que la phosphorylation de cette kinase est dépendante de mTOR et peut donc constituer un marqueur indirect endogène de l'état d'activité de mTOR (Tee & Proud, 2001). Nous avons donc étudié l'état de phosphorylation de p70S6K, par une analyse en Western blot, dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées dans du milieu sans sérum pendant 24 h (notre condition contrôle pour induire l'autophagie) ou stimulées par de la STS à 500 nM pendant 2 h (Figure 3.10). Sur cette figure, nous pouvons voir que la protéine kinase p70S6 est constitutivement phosphorylée (sur la Thr

389) dans les cellules cybrides sauvages. Ajoutons de suite que malheureusement, dans cette expérience, nous n'avons pas d'information sur l'abondance de la kinase mais uniquement un contrôle de la charge protéique estimée par l'immunodétection de l' $\alpha$ -tubuline. Cette information aurait été absolument nécessaire pour pouvoir interpréter des modifications éventuelles relatives au taux de phosphorylation de la kinase. On observe également une diminution de l'accumulation de la forme phosphorylée de p70S6K dans les cellules cybrides sauvages incubées en absence de sérum (Figure 3.10 A). L'absence de sérum diminue donc fortement l'activité de mTOR (mesurée par la diminution de l'état de phosphorylation de p70S6K), ce qui pourrait expliquer l'induction de l'autophagie observée dans ces conditions (Figures 3.2 A, B et 3.8).

La recherche de l'état de phosphorylation de la protéine p70S6K a également été réalisée sur des lysats clairs de cellules cybrides sauvages et mutées incubées pendant 2 h en présence de STS à 500 nM. Les résultats obtenus et présentés à la figure 3.10.B montrent que l'incubation des cellules pendant 2 h en présence de STS inhibe presque totalement la phosphorylation de p70S6K dans les cellules cybrides sauvages et mutées. L'inducteur apoptotique STS est donc capable d'induire l'inhibition de la phosphorylation de p70S6K. Cette inhibition de l'activité de mTOR par la staurosporine devrait également être recherchée directement par un dosage de l'activité kinase de mTOR *in vitro* après immunoprécipitation ou par la recherche de la modification de l'état de phosphorylation de la kinase. La kinase mTOR est en effet phosphorylée sur sa Ser2448 via la voie PI3 kinase/Akt (Nave *et al.*, 1999) et est capable de s'autophosphoryler sur sa Ser2481 (Peterson *et al.*, 2000). Une fois confirmée, l'inhibition de l'activité de mTOR pourrait expliquer l'induction de l'autophagie induite par la STS dans les cellules cybrides sauvages et mutées.

Dans le but de déterminer le moment auquel la diminution de l'activité de mTOR apparaît dans les cellules incubées en présence de STS, nous avons analysé l'abondance de la forme phosphorylée de p70S6K dans les cellules cybrides sauvages et mutées au cours de temps croissants d'incubation des cellules avec la STS à 500 nM (0,5 ; 1 ; 12 ; et 16 h). Un contrôle positif constitué par des cellules incubées en absence de sérum pendant 24 h a également été réalisé (Figure 3.11). Nous observons que la diminution de l'abondance de la forme phosphorylée de p70S6K est très importante et très rapide tant dans les cellules cybrides sauvages que dans les cellules mutées, puisqu'elle est déjà observée pour un temps de 30 min d'incubation. De plus, l'inhibition de l'activité de mTOR en réponse à la STS semble être un effet soutenu et prolongé dans le temps puisque la forme phosphorylée de p70S6K n'est pas non plus détectée pour des temps de 12 ou 16 h d'incubation. Cependant, nous n'observons pas de réponse différentielle entre les deux lignées cellulaires. Finalement, il semble également que l'absence de sérum conduise à une diminution prolongée de l'abondance de la forme phosphorylée de la protéine p70S6K dans nos deux lignées cellulaires puisque nous ne parvenons pas à détecter la forme phosphorylée après 24 h d'incubation dans ces conditions. Remarquons cependant que l'abondance de la forme totale de la protéine p70S6K semble diminuer légèrement au cours du temps de stimulation par la STS et ce, tant dans les cellules cybrides sauvages que dans les cellules mutées.

Ces différents résultats tendent à montrer que la STS pourrait être capable d'activer l'autophagie via une diminution de l'activité de mTOR. La surexpression d'une forme constitutivement active et non inhibable en conditions de STS, devrait pouvoir répondre à la question de savoir si mTOR est l'acteur principal de la mise en place de la réponse autophagique dans les cellules incubées en présence de STS. De plus, il semble que l'inhibition de mTOR dans les cellules observée en réponse à un traitement en présence de STS soit plus rapide que l'effet de la STS sur l'activation des caspases comme la caspase-3

qui n'est observée que pour des temps d'incubation supérieurs à 2 ou 4 h et de manière plus importante dans les cellules cybrides mutées (Figure 1.23, G. Rommelaere, thèse en cours).

On retrouve peu de littérature traitant des effets de la STS sur l'activité de mTOR dans les cellules. Nos données sont cependant en accord avec celles décrites précédemment pour des fibroblastes Swiss 3T3 (Tee & Proud, 2001). Ces auteurs montrent essentiellement que l'apoptose induite par la STS dans ces cellules n'est pas liée à la capacité de l'alkaloïde d'inhiber les PKCs car le bisindolylmaléimide-I (BMI) qui inhibe efficacement les isoformes classiques et non-classiques des PKCs ( $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ) n'induit pas l'apoptose. Enfin, ces mêmes auteurs montrent que l'inhibition de la phosphorylation de p70S6K est rapide et indépendante de l'action inhibitrice de la STS sur les PKCs. De plus, la STS étant un inhibiteur non spécifique affectant de nombreuses kinases, ces auteurs ont montré que l'action inhibitrice de la STS sur la voie de signalisation dépendante de mTOR n'était pas directe.

Depuis plusieurs années, on sait que mTOR peut agir comme un senseur énergétique. Par exemple, il a notamment été montré que des cellules incubées dans un milieu pauvre en glucose montrent une forte diminution de la phosphorylation de la protéine régulée par p70S6K médiée par mTOR. Dans ces conditions, la diminution de la traduction protéique impliquerait l'AMPK affectant l'activation de mTOR (Yang & Guan, 2007).

### **3.3.2 Étude de l'état d'activité de l'AMPK dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées en présence de staurosporine ou en absence de sérum par la recherche de la forme phosphorylée (Thr172)**

Comme nous l'avons rapidement décrit dans l'introduction au paragraphe 1.5.2.2, l'AMPK (AMP kinase) est une Ser/Thr kinase présente sous la forme d'une protéine hétérotrimérique qui est décrite comme étant un senseur énergétique essentiel de la cellule (Hadad et al., 2008). Cette kinase est inactive en conditions basales et est activée par un mécanisme de régulation complexe qui implique une régulation allostérique par l'AMP (augmentation du ratio [AMP]/[ATP]) et une phosphorylation subséquente sur la thréonine 172 (Thr172, qui active pleinement l'enzyme) par une kinase en amont (AMPKK/LKB1) en réponse à un stress énergétique (Hoyer-Hansen & Jaattela, 2007). Une fois activée, l'AMPK peut tenter de restaurer le niveau énergétique de la cellule en stimulant les voies cataboliques telles que la glycolyse ou encore la  $\beta$ -oxydation des acides gras (Cao et al., 2008). De plus, l'activation de l'AMPK réduit la consommation d'ATP par la cellule comme, par exemple, en phosphorylant et en inhibant l'ACC (Acyl-CoA carboxylase), réduisant ainsi la synthèse des acides gras, voie métabolique très consommatrice d'ATP (Hadad et al., 2008). De plus, l'AMPK a été identifiée comme étant le senseur énergétique cellulaire principal capable d'interférer avec la voie mTOR (Hoyer-Hansen & Jaattela, 2007). En effet, lors de stress énergétiques conduisant à une augmentation du ratio AMP/ATP ou à une augmentation de la concentration en calcium cytosolique, l'AMPK activée phosphoryle et active TSC2, ce qui a pour conséquence de diminuer l'activité de mTOR menant à l'inhibition de la traduction protéique et à l'activation de l'autophagie (Yang & Guan, 2007).

Dans le but de rechercher une éventuelle modification de l'activité de l'AMPK dans les cellules cybrides sauvages et mutées incubées en présence de l'alkaloïde pro-apoptotique, nous avons analysé la phosphorylation de l'AMPK sur la thréonine 172 dans les cellules incubées en présence de STS pendant des temps croissants. De même, nous avons testé l'effet de la privation de sérum pendant 24 h sur l'état d'activité de l'AMPK dans ces lignées

cellulaires. Les cellules cybrides sauvages et mutées ont donc été incubées pendant des temps croissants (0,5; 1 ; 2 ; 4 ; 9 ; 12 et 16 h) en présence de STS à 500 nM ou cultivées pendant 24 h en absence de sérum (Figure 3.12). Dans ces conditions, nous observons une rapide accumulation de la forme phosphorylée de la protéine AMPK en réponse à la STS (endéans les 30 min) et ce, dans les deux lignées cellulaires. De manière très intéressante, cette réponse semble être différentielle entre les cellules cybrides sauvages et les cellules cybrides mutées même si le degré de phosphorylation basal de l'AMPK ne semble pas plus élevé dans les cellules cybrides mutées MERRF. En effet, la phosphorylation de l'AMPK en réponse à la STS semble plus forte dans les cellules cybrides mutées que dans les cellules cybrides sauvages. D'autre part, la privation de sérum pendant 24 h ne semble pas affecter le degré de phosphorylation de l'AMPK sur la Thr172 et ce, quelque soit la lignée cellulaire considérée.

Le rôle de l'AMPK dans l'apoptose et l'autophagie est certainement intéressant à étudier. En effet, il semble que le 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside (AICAR), ou l'oligomycine conduisant directement ou indirectement à l'activation de l'AMPK soient capables d'inhiber l'activation des enzymes « caspase-3 like » dans l'apoptose induite par la dexaméthasone mais pas par la staurosporine. La raison serait à rechercher dans des cibles de l'AMPK comme l'ACC ou la HMG-CoA réductase, catalysant respectivement des étapes dans la synthèse des acides gras et dans la synthèse des isoprénoides qui joueraient un rôle dans le déclenchement de l'apoptose induite par les glucocorticoïdes mais ne joueraient aucun rôle dans l'apoptose induite par la STS (Stefanelli *et al.*, 1998).

La STS conduirait donc à une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK sur la Thr172, marqueur reconnu de son activation (Hadad *et al.*, 2008) qui comme nous l'avons déjà mentionné est capable de phosphoryler et de stimuler TSC2, conduisant à une forte diminution de l'activité de mTOR. Il est donc possible que la staurosporine, dans ces lignées cellulaires, induise l'autophagie de manière dépendante de l'AMPK. Par contre, il est peu probable que la voie de l'AMPK soit impliquée dans la mise en place de l'autophagie induite par la privation de sérum, puisque cette condition n'active pas l'AMPK, en tout cas de manière soutenue comme la STS. Il serait donc intéressant de rechercher le niveau d'activation de l'AMPK dans des cellules incubées en absence de sérum pendant des temps plus courts, pour rechercher et tenter de mettre en évidence une éventuelle réponse transitoire dans ces conditions.

### **3.3.3 Effets de la staurosporine sur l'activation d'Akt/PKB dans des cellules cybrides sauvages et mutées**

Rappelons que la protéine Akt/PKB est une Ser/Thr protéine kinase activée en aval de la PI-3K qui joue un rôle de régulateur essentiel dans la prolifération et la survie cellulaire (Hill & Hemmings, 2002). Les nombreuses cibles qui assurent ces rôles en aval d'Akt/PKB sont la GSK3beta, BAD, « forkhead transcription factors », et le « nuclear factor » kappa B (NFκB) (Manning & Cantley, 2007). Les différentes isoformes d'Akt/PKB contiennent toutes un domaine NH2-terminal de type « pleckstrin homology (PH) », un domaine catalytique et un domaine COOH-terminal hydrophobe régulateur. L'activation d'Akt/PKB par les facteurs de croissance dépend de la PI3K et sa translocation en membrane médiée par le domaine PH, suivie de 2 évènements de phosphorylation activatrice sur la Thr308 (par PDK1 dans la boucle d'activation de la kinase) et la Ser473 (dans le domaine régulateur). De plus, cette enzyme activée est capable d'inhiber l'autophagie par son action positive sur l'activité de mTOR en inhibant le complexe TSC1/2 (Takeuchi *et al.*, 2005) (Figure 1.17).

Afin d'étudier les effets de la staurosporine sur l'activité d'Akt/PKB dans nos deux lignées cellulaires, nous avons analysé l'évolution de l'abondance de la forme phosphorylée d'Akt/PKB (sur la Ser473) en Western blot en fonction de temps croissants d'incubation en présence de STS à 500 nM dans des cellules cybrides sauvages et mutées. Les deux lignées cellulaires ont donc été incubées pendant 0,5 ; 1 ; 2 ; 4 ; 6 ; 9 ; 12 ou 16 h en présence de staurosporine. À la figure 3.13, nous observons une augmentation transitoire et biphasique de la phosphorylation de la protéine Akt/PKB entre 30 min et 4 h et entre 6 et 12 h avec une diminution à 16 h. De plus, bien que l'on retrouve une légère augmentation de la forme phosphorylée de la protéine Akt/PKB dans les cellules mutées en fonction du temps d'incubation en présence de STS, il est important de souligner que la phosphorylation d'Akt/PKB est nettement plus faible dans les cellules cybrides mutées que dans les cellules cybrides sauvages.

Il est intéressant de constater que la déplétion en ADN mitochondrial conduit, dans les myocytes L6, à une diminution de la translocation du transporteur au glucose Glut4 en réponse à une stimulation par l'insuline. Cet effet a été montré comme étant dépendant d'une moindre phosphorylation d'Akt/PKB dans ces conditions. Ces données sont en faveur de l'hypothèse qui propose que le dysfonctionnement mitochondrial soit une cause importante de l'apparition de la résistance à l'insuline (Park *et al.*, 2005). Dans le cadre de la stimulation par l'insuline qui active la voie PI3K/Akt/PKB, la protéine kinase C $\alpha$  et les céramides, deux médiateurs de la lipotoxicité induite par une diminution de la  $\beta$ -oxydation des acides gras associée au dysfonctionnement mitochondrial, ont été proposés pour médier la phosphorylation d'IRS-1 sur des résidus sérine, atténuant ainsi la phosphorylation activatrice sur des résidus tyrosine induite par l'insuline. Allen et ses collaborateurs ont également montré que l'action anti-apoptotique de l'IGF-1 sur la mortalité de cellules musculaires lisses d'origine vasculaire (VSMC) induite par la STS, passait par une activation d'Akt/PKB capable d'inhiber l'activation des kinases de stress comme les JNK, connues pour participer à la réponse apoptotique (Allen *et al.*, 2005).

Cette réponse différentielle est donc intéressante pour tenter de comprendre la plus grande résistance des cellules sauvages à l'apoptose induite par la STS. En effet, la voie Akt est connue pour être constitutivement active dans des cellules humaines de lymphomes. De plus, l'inhibition de la voie PI3K par le LY294002 ne provoque pas seulement la déphosphorylation d'Akt et de la GSK3-béta mais induit également l'apoptose dans ces cellules par un processus dépendant des caspase-9 et -3, et corrélé à la diminution de l'expression des inhibiteurs de l'apoptose comme les facteurs XIAPs (Uddin *et al.*, 2005).

En effet, il est important de rappeler qu'Akt/PKB est un facteur anti-apoptotique majeur dans la cellule. La première cible d'Akt/PKB identifiée était le facteur pro-apoptotique Bad (Datta *et al.*, 1999). Bad est un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2 qui induit l'apoptose en se liant à Bcl-XL dans la MME, causant la libération du cytochrome c dans le cytosol. La phosphorylation de Bad par Akt/PKB sur la Ser136, favorise l'association de Bad avec la protéine 14-3-3 dans le cytosol, et de ce fait inactive sa fonction pro-apoptotique (Datta *et al.*, 1999). Il a également été proposé que le rôle anti-apoptotique d'Akt/PKB soit associé à une étape post-mitochondriale. En effet, Akt/PKB pourrait phosphoryler et inactiver directement la caspase-9 (Datta *et al.*, 1999). Akt/PKB est également capable de diminuer la transcription d'un sous-ensemble de gènes pro-apoptotiques par phosphorylation des facteurs de transcription de la famille Forkhead. La phosphorylation de ces facteurs va causer leur exclusion du noyau et leur inactivation (Kops & Burgering, 2000). De plus Akt/PKB phosphoryle et active le facteur de transcription CREB (cAMP response element binding), susceptible d'augmenter la transcription de gènes cibles anti-apoptotiques, tels que Bcl-2

(Pugazhenthil *et al.*, 2000) et Mcl-1 (Wang *et al.*, 1999). En outre, Akt/PKB peut phosphoryler et activer la I $\kappa$ B kinase- $\alpha$ , qui, à son tour phosphoryle I $\kappa$ B. Ceci va mener à la translocation nucléaire et à l'activation du facteur de transcription NF- $\kappa$ B permettant la transcription de gènes codant pour des protéines telles que Bcl-XL ou des inhibiteurs de caspases favorisant ainsi la survie cellulaire (Barkett & Gilmore, 1999).

En tenant compte de ces différentes données concernant le rôle anti-apoptotique d'Akt/PKB ainsi que du résultat de notre expérience montrant une plus faible phosphorylation d'Akt/PKB dans les cellules cybrides mutées incubées en présence de STS par rapport aux cellules cybrides sauvages, nous pouvons suggérer que la sensibilité accrue de cellules cybrides mutées à l'apoptose induite par la STS pourrait, être due, au moins en partie à une plus faible activation d'Akt/PKB dans cette lignée cellulaire.

Ajoutons encore que, bien qu'intéressants, ces résultats préliminaires devraient être confirmés par la recherche de la phosphorylation de la Thr308 dans ces conditions. En effet, il a été montré que la phosphorylation de la Thr308 active seulement partiellement Akt/PKB alors que la phosphorylation des deux résidus conduit à l'activation maximale de l'enzyme (Alessi *et al.*, 1996).

### **3.3.4 Effet de la staurosporine sur l'abondance et l'activité du facteur de transcription p53 dans des cellules cybrides sauvages et mutées**

En plus de son rôle bien décrit dans l'apoptose reposant sur son activité transcriptionnelle (Zamzami & Kroemer, 2005) ou médiée par son action cytosolique et mitochondriale indépendante de sa fonction de facteur de transcription (Vaseva & Moll, 2008), il a récemment été montré que la protéine p53 exerce une double activité, apparemment contradictoire dans le contrôle de l'autophagie. D'une part, en tant que facteur de transcription il joue un rôle favorable dans la progression de l'autophagie (Crighton *et al.*, 2006). Selon ces auteurs, cette action passerait par la surexpression de DRAM (damage-regulated autophagy modulator), un gène cible de p53 codant pour une protéine lysosomale contrôlant l'autophagie. Une inhibition de l'axe dépendant de mTOR est également observée en réponse à l'activation de p53 dans le noyau (Crighton *et al.*, 2006). D'autre part, par sa fonction cytosolique, nous savons également que p53 inhibe l'autophagie par un mécanisme encore peu compris mais qui pourrait impliquer l'activation de mTOR et/ou de l'AMPK (Tasdemir *et al.*, 2008).

Dans le but de rechercher si l'activité de p53 est modifiée dans des cellules incubées en présence de STS, sur base des translocations décrites et des effets médiés par p53 qui ne dépendent pas de son activité transcriptionnelle, nous avons premièrement analysé l'abondance de p53 par Western blot dans différentes fractions cellulaires obtenues par centrifugation différentielle.

#### ***3.3.4.1 Analyse de l'abondance de p53 dans des fractions cellulaires nucléaires, mitochondriales et cytosoliques en réponse à la STS dans des cellules cybrides sauvages et mutées***

Dans le but de rechercher d'éventuels changements de localisation de p53 dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées pendant 6 h en présence de STS à 500 nM, nous avons déterminé l'abondance de la forme totale de p53 par Western blot sur des fractions cytosoliques, nucléaires et mitochondriales obtenues par la technique de centrifugation

différentielle (Figure 3.14). Sur cette figure et bien que les contrôles de charge pour les différentes fractions (respectivement, la  $\beta$ -actine, le TBP et TOM 20 pour des fractions cytosolique solubles, nucléaires et mitochondriales) ne soient pas parfaits, nous pouvons voir premièrement que la distribution de la protéine p53 n'est pas modifiée entre les cellules cybrides sauvages et mutées et ce, quelle que soit la fraction considérée. Deuxièmement, nous pouvons dire que l'abondance de p53 est peu ou pas modifiée dans les fractions cytosolique et mitochondriales de cellules préalablement incubées en présence de STS. Troisièmement, il semble que l'abondance nucléaire de p53 ne soit pas augmentée dans le noyau de cellules sauvages incubées en présence de l'alcaloïde. Car les signaux obtenus pour les contrôles de charges sont également plus intenses dans cette condition. Ces résultats devraient être confirmés par un marquage en immunocytochimie et des observations en microscopie confocale. Ajoutons encore, que puisque nous avons chargé la même quantité de protéines pour les différentes fractions (15  $\mu$ g), nous pouvons probablement dire que l'abondance de p53 est plus importante dans les fractions cytosoliques que dans les fractions nucléaires ou mitochondriales et ce, tant pour les cellules cybrides sauvages que pour les cellules mutées traitées ou non en par la STS.

Ces résultats devraient également être complétés par une analyse de l'abondance totale de p53 réalisée sur des lysats cellulaires totaux pour déterminer si l'abondance totale de la protéine est modifiée ou non dans ces conditions. L'abondance/stabilité de la protéine p53 est essentiellement régulée la protéine Mdm2, une protéine nucléaire de la famille des E3 ubiquitine ligases codée par un gène cible de p53. Cette protéine se lie au domaine de transactivation de p53 et catalyse son ubiquitination. La protéine Mdm2 (Hdm2 chez l'humain) peut donc promouvoir la dégradation du facteur par le protéasome mais exercerait également un effet inhibiteur direct de l'activité transcriptionnelle du facteur p53 (Grossman *et al.*, 1998).

De plus, l'activité du facteur de transcription p53 est régulée par de très nombreuses modifications post-traductionnelles de la protéine. Parmi ces modifications (plus d'une trentaine identifiées), on retrouve la mono- et polyubiquitination, la sumoylation, la neddylation (qui compète sur les mêmes résidus avec la méthylation), l'acétylation, la prolyl-isomérisation et la phosphorylation sur de multiples résidus Ser et Thr (Olsson *et al.*, 2007). La combinatoire de ces modifications rend donc très difficile de choisir un bon marqueur pour caractériser l'activité du facteur et ne permet pas de prédire aisément l'état d'activité du facteur sur base de marqueurs comme la phosphorylation. Nous avons donc choisi de mesurer l'activité de p53 à l'aide un système rapporteur dans lequel le gène codant la luciférase est placé sous le contrôle d'un promoteur synthétique contenant 13 sites consensus reconnus par le facteur p53 (pG13-Luc) (reçu du prof. B. Vogelstein, The Johns Hopkins Oncology Center, Baltimore, MD, USA).

#### ***3.3.4.2 Étude de l'activité du facteur de transcription p53 dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées en présence de STS***

Afin de déterminer l'activité du facteur de transcription p53 dans les cellules incubées en présence de STS, nous avons donc utilisé un système rapporteur contenant le gène de la luciférase dont l'expression est placée sous le contrôle d'un promoteur synthétique contenant de nombreuses (13) séquences reconnues par p53, ce qui confère une grande sensibilité au rapporteur. Brièvement, des cellules cybrides sauvages ou mutées on été transitoirement co-transfectées au Superfect pendant 6 h avec un plasmide rapporteur pour l'activité de p53 et un plasmide d'expression contenant le gène codant pour la  $\beta$ -galactosidase, dont l'expression est

placée sous contrôle d'un promoteur viral fort CMV (cytomégalovirus). Après 16 h de récupération, les cellules ont ensuite été incubées pendant 2 ou 6 h en présence de STS à 500 nM. Le milieu de culture a ensuite été remplacé pendant respectivement 10 ou 8 h. Les cellules ont ensuite été lysées et les activités luciférase et  $\beta$ -galactosidase ont alors été dosées. Sur le graphique présentant les résultats obtenus à la figure 3.15, nous observons une diminution de l'activité de p53 dans les cellules incubées en présence de STS par rapport aux cellules contrôles. De plus, cette diminution d'activité de p53 est comparable dans les deux lignées cellulaires.

Dans la littérature, on retrouve plusieurs arguments en faveur du fait que la staurosporine et le 7-hydroxystaurosporine (UCN-01), un inhibiteur des PKCs plus spécifique que la staurosporine induisent l'apoptose de manière indépendante de p53 (Byrd *et al.*, 2001) (Husain *et al.*, 1997) (Chen *et al.*, 1999). De plus, Shao et ses collaborateurs ont montré que des lignées cellulaires dépourvues d'activité fonctionnelle pour le facteur p53 comme les cellules HL60 et les K562 (myéloblastomes humain) et des cellules HT29 (carcinome humain), présentaient des caractéristiques apoptotiques comme la fragmentation internucléosomale caractéristique de l'ADN génomique et l'activation de caspases en réponse à un traitement en présence d'UCN-01 (Shao *et al.*, 1997). On ne retrouve pas non plus de modifications de l'abondance de p53 dans le noyau de cellules PC12 traitées en présence de saurosporine. L'inhibition du cycle cellulaire observée dans ces conditions ne serait donc pas médiée par p21/Waf1 mais résulterait de changements dans le degré de phosphorylation de kinases dépendantes des cyclines comme la cdk2 (cyclin-dependent kinase) (Gollapudi & Neet, 1997).

Cependant, dans notre expérience, nous observons une diminution de l'activité de p53 dans les cellules incubées en présence de STS par rapport aux cellules contrôles. Nous avons donc recherché dans la littérature des modèles pouvant expliquer cette diminution. Alves Da Costa et ses collaborateurs ont étudié l'influence de la protéine  $\alpha$ -synucléine sur la réponse cellulaire à un stimulus apoptotique dans des cellules neuronales transfectées avec la forme sauvage de l'  $\alpha$ -synucléine. Ils ont montré que l'  $\alpha$ -synucléine était capable de diminuer l'activité transcriptionnelle de p53. Des études complémentaires sur les modifications de l' $\alpha$ -synucléine dans nos lignées cellulaires en réponse à la STS pourraient être réalisées afin de rechercher si cette protéine est impliquée dans la diminution de l'activité de p53 observée dans nos deux lignées cellulaires.

Finalement, dans le but de rencontrer (partiellement) le troisième objectif que nous nous étions fixé dans le cadre de ce travail, nous allons terminer la présentation des résultats obtenus dans ce mémoire par des approches visant à rechercher une connexion éventuelle entre l'apoptose et l'autophagie dans la mort cellulaire induite par la staurosporine.

### ***3.4 Étude préliminaire et tentative de mise en évidence d'une relation éventuelle entre l'apoptose et l'autophagie dans des cellules cybrides sauvages et mutées MERRF incubées en présence de staurosporine***

Afin de mettre en évidence une éventuelle connexion entre l'apoptose et l'autophagie dans le cadre de la mort cellulaire induite par la STS dans nos lignées cellulaires, nous avons réalisé une expérience, tout à fait préliminaire, visant à inhiber la réponse autophagique et à étudier l'effet sur un marqueur de l'apoptose. Nous avons donc inhibé l'autophagie à l'aide du



3-MA (un inhibiteur des PI3K de classe III fréquemment utilisé pour inhiber l'autophagie (Seglen & Gordon, 1982) et étudié la réponse apoptotique induite par la STS par un dosage de la fragmentation de l'ADN génomique.

### **3.4.1 Recherche d'un effet éventuel du 3-MA sur la fragmentation de l'ADN génomique induite par la STS dans des cellules cybrides sauvages et mutées**

Le dosage de la fragmentation de l'ADN génomique est un des meilleurs marqueurs tardifs de l'apoptose (Jin & El-Deiry, 2005). En effet, celle-ci rend compte de l'étape terminale de l'apoptose, quelques soient les mécanismes moléculaires en amont qui y conduisent. C'est pourquoi nous avons décidé d'utiliser ce marqueur pour tenter de mettre en évidence une éventuelle modification quantitative de la fragmentation de l'ADN génomique induite par la STS dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées en présence ou en absence de 3-MA.

Brièvement, les cellules cybrides sauvages et mutées ont été traitées pendant 6 ou 12 h en présence de STS à 500 nM avec ou sans l'inhibiteur de l'autophagie (3-MA). Dans certaines conditions, les cellules ont également été traitées en présence de l'inhibiteur seul pendant 7 ou 13 h, pour permettre une action optimale de l'inhibiteur de l'autophagie avant l'addition de la STS, les cellules ont été pré-incubées pendant une heure en présence de 3-MA seul. Dans ces conditions de pré-incubation l'autophagie est inhibée avant l'addition de la molécule pro-apoptotique. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 3.16.

Comme le montrent les résultats obtenus, on observe une plus forte fragmentation de l'ADN génomique induite par la STS dans les cellules cybrides mutées MERRF que dans les cellules cybrides sauvages. Nous pouvons donc tout d'abord confirmer l'existence d'une réponse apoptotique différentielle entre des cellules sauvages et mutées suite à un traitement à la STS (500 nM) et ce, pour les deux temps d'incubation testés (6 et 12h).

Après 6 h de traitement à la STS en présence de 3-MA, la fragmentation de l'ADN n'est pas ou peu modifiée par rapport à la fragmentation de l'ADN observée pour des cellules cybrides mutées incubées en présence de STS seule alors qu'une diminution significative d'environ 30 % est observée pour les cellules cybrides sauvages.

De manière intéressante, nous pouvons voir qu'un traitement de 7 h en présence de 3-MA seule induit une augmentation significative de la fragmentation de l'ADN dans les cellules sauvages et mutées par rapport à la fragmentation basale observée pour les cellules contrôles. Cet effet est encore plus marqué pour un temps d'incubation plus long en présence de l'inhibiteur de l'autophagie. Il est cependant difficile d'interpréter ces résultats car nous n'avons pas les données de fragmentation pour des cellules cybrides sauvages ou mutées maintenues dans des conditions contrôles pendant des temps aussi longs.

De plus, la fragmentation de l'ADN est toujours plus forte dans les cellules cybrides mutées que dans les cellules sauvages après un traitement de 12 h en présence de STS. En présence de 3-MA, la fragmentation de l'ADN est augmentée de manière significative dans les cellules cybrides mutées par rapport à la fragmentation induite par la STS seule.

Nous pouvons tenter d'interpréter ces résultats de la manière suivante. Premièrement, l'inhibiteur de l'autophagie seul serait capable, avec le temps, d'induire une augmentation de la fragmentation de l'ADN génomique. Il semble donc que dans nos lignées cellulaires,

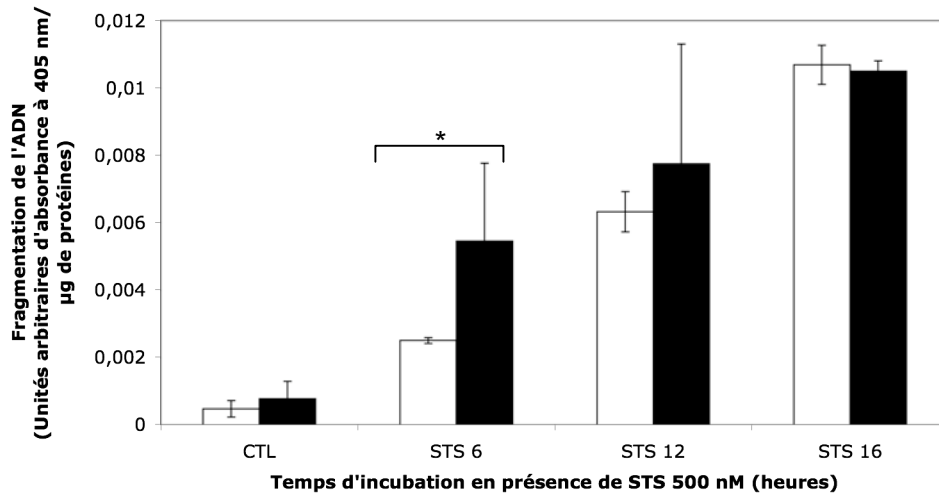
l'inhibition de l'autophagie induise une augmentation de la réponse apoptotique en condition basale.

Il semble qu'après 6 h de traitement à la STS en présence de l'inhibiteur de l'autophagie (3-MA), la fragmentation de l'ADN diminue légèrement mais significativement dans les cellules sauvages. Dans un premier temps, l'autophagie pourrait donc avoir un rôle pro-apoptotique dans les cellules sauvages.

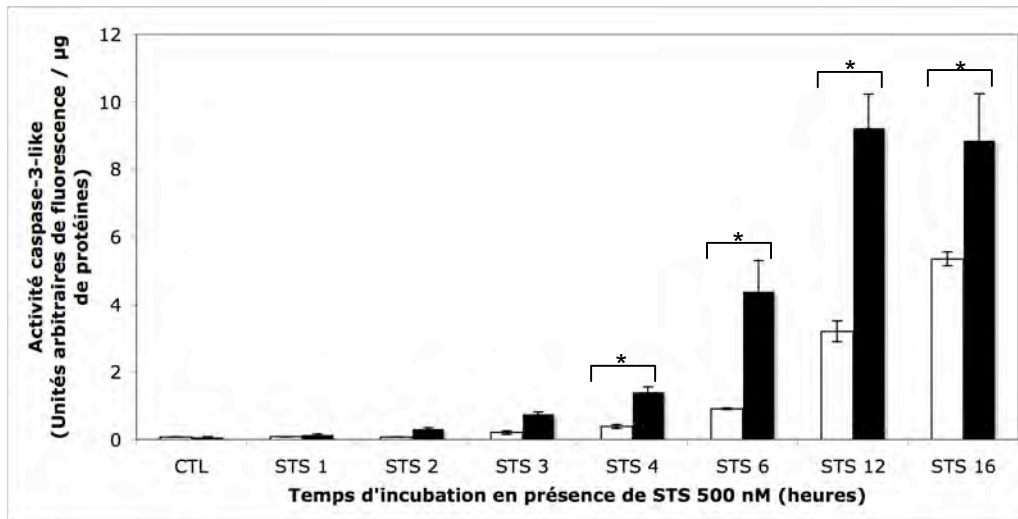
Cependant, après 12 h de traitement à la STS en présence 3-MA, nous pouvons voir une faible, mais significative, augmentation de la fragmentation de l'ADN génomique induite par la STS dans les cellules cybrides mutées par rapport à la fragmentation mesurée pour la condition STS seule. Sous réserve de confirmation par d'autres marqueurs comme l'étude de l'activité de la caspase-3, il semble qu'une inhibition prolongée de l'autophagie conduise à une augmentation de la réponse apoptotique dans la lignée mutée. L'autophagie aurait donc, dans ces conditions, un léger rôle protecteur contre l'apoptose induite par la STS dans des cellules cybrides mutées. Mentionnons que dans des cellules HeLa, une plus forte réponse apoptotique induite par l'oridonine (des diterpénoïdes extraits de plantes utilisés en médecine chinoise) a déjà été observée en présence de 3-MA (Cui *et al.*, 2006).

En effet, comme nous l'avons vu dans l'introduction (point 1.4.2.1), l'autophagie peut jouer un rôle protecteur face à l'induction de la mort cellulaire (Yang *et al.*, 2008, Boya *et al.*, 2005).

A.

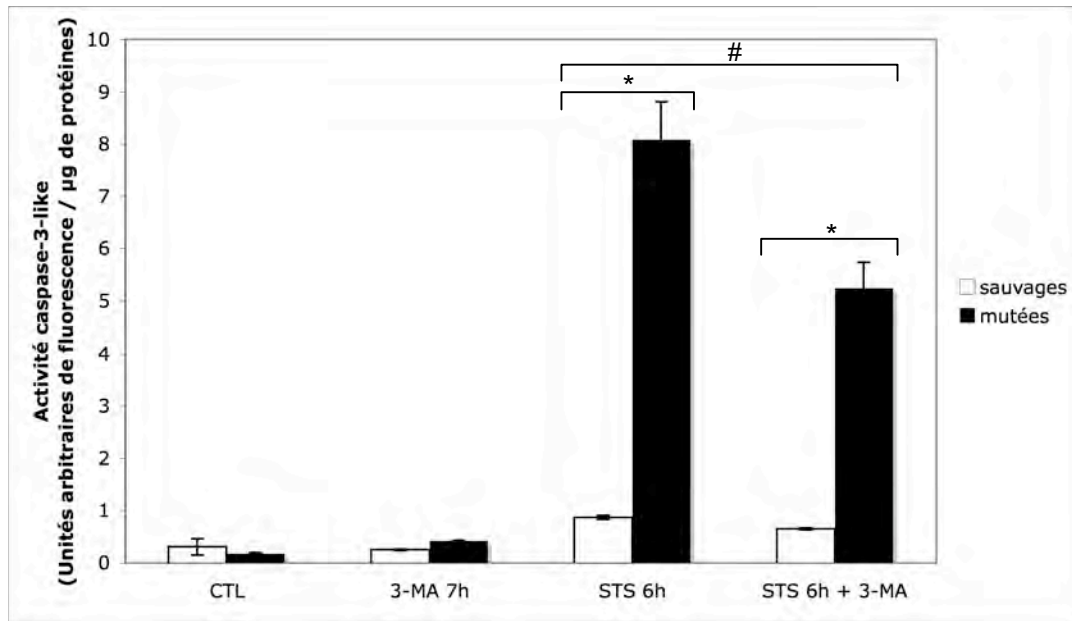


B.



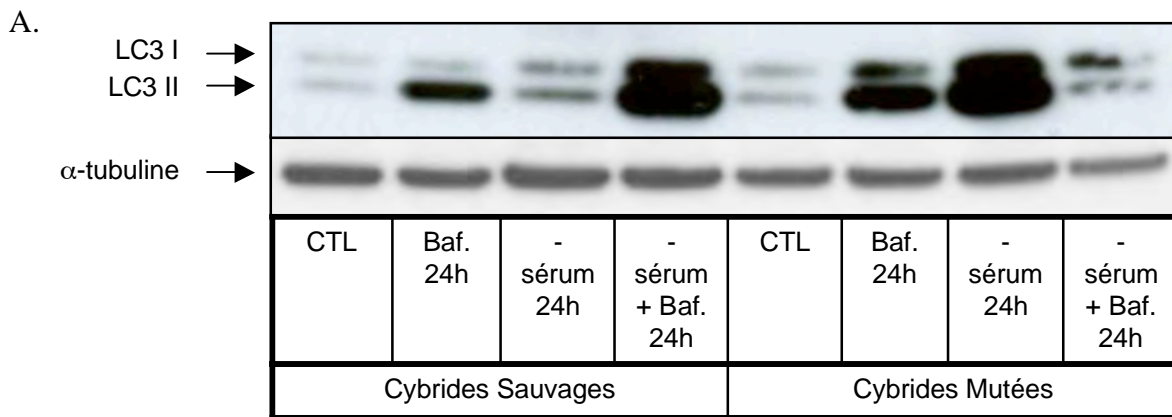
**Figure 1.23 : Effet de la staurosporine sur la fragmentation de l'ADN et l'activité de la caspase-3.**

(A) **Test de fragmentation d'ADN.** Des cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et cybrides mutées (colonnes noires) ont été incubées en présence de STS à 500 nM pendant 6, 12 et 16 heures avant de mesurer la fragmentation d'ADN à l'aide d'un kit de détection de type ELISA (voir matériel et méthodes). Le principe du test repose sur la détection des petits fragments d'ADN dans les échantillons par des anticorps dirigés contre les histones dont l'abondance est révélée en présence d'anticorps conjugués à la HRP dans une réaction colorimétrique conduisant à la formation d'un produit chromogène. L'absorbance du produit de la réaction est alors mesurée au spectrophotomètre à 605 nm. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance normalisées par la quantité de protéines et représentent la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour  $n=3$ . \* : statistiquement significativement différent des cellules cybrides sauvages avec  $p < 0,05$  comme déterminé par un test t-de Student. Les cellules contrôles (CTL) sont constituées de cellules incubées en absence de STS pendant 6 heures. (B) **Dosage de l'activité de la caspase-3.** Les cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) ont été incubées en présence de STS à 500 nM pendant 1, 2, 3, 4, 6, 12 ou 16 heures. Des lysats cellulaires ont ensuite été préparés et l'activité de la caspase-3 a été mesurée dans une réaction enzymatique reposant sur le clivage d'un substrat fluorescent spécifique d'une activité « caspase-3 like » (Ac-DEVD-AFC). Les résultats, exprimés en unités arbitraires de fluorescence, ont été normalisés par la quantité de protéines. Les résultats sont donc exprimés en unités arbitraires de fluorescence/ $\mu$ g de protéines et représentent la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour  $n=3$ . Les cellules contrôles (CTL) représentent des cellules incubées 6 heures en absence de staurosporine \* : statistiquement significativement différent des cellules cybrides sauvages avec  $p < 0,05$  comme déterminé par un test t-de Student.



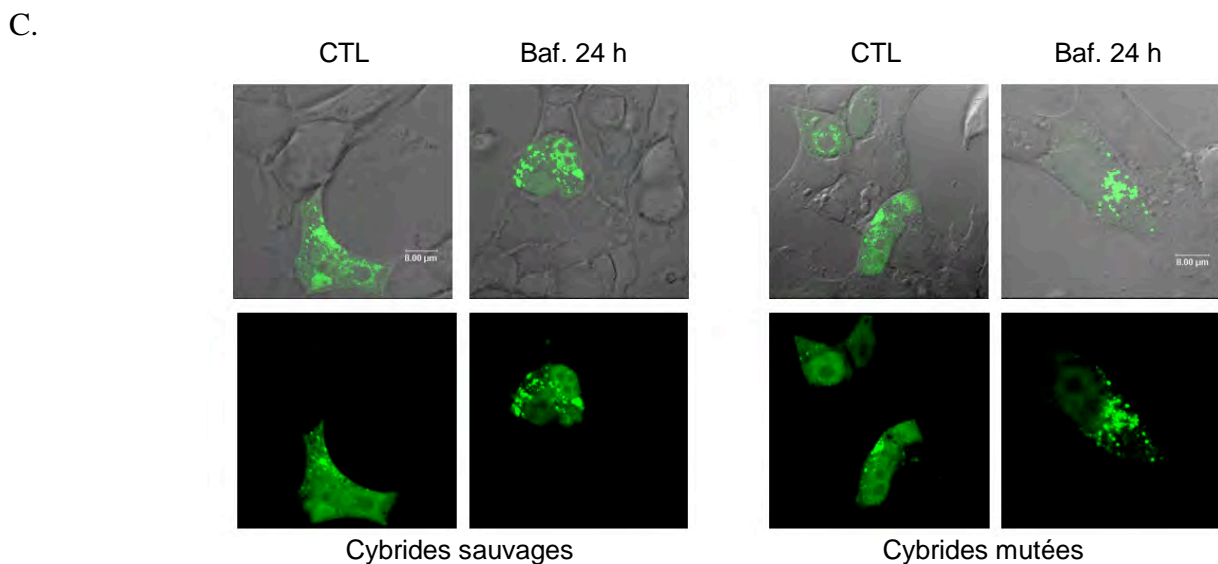
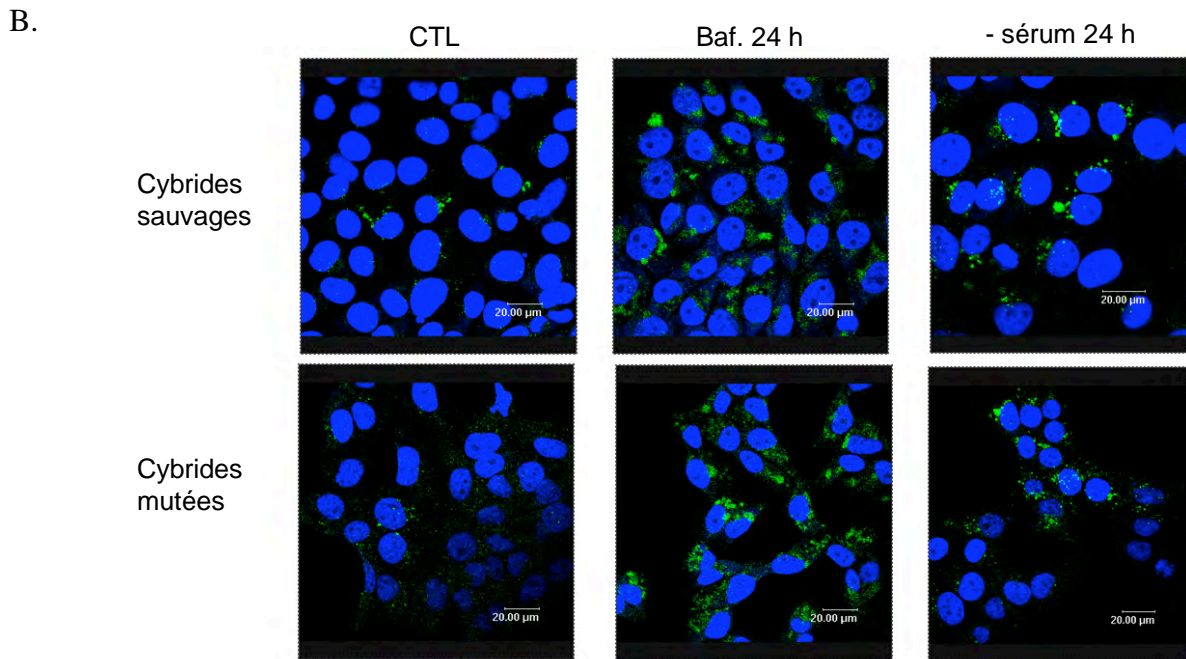
**Figure 3.1 : Effet du 3-MA sur l'activation de la caspase-3 induite par la staurosporine dans les cellules cybrides sauvages et mutées.**

Dosage de l'activité de la caspase-3. Les cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) ont été pré-incubées en présence ou en absence de 3 méthyladénine (3-MA) à 10 mM pendant 1 heure. Ensuite la staurosporine a été ajoutée (STS 6 h + 3-MA) ou non (3-MA 7 h) à la concentration de 500 nM pendant 6 heures. Des lysats cellulaires ont ensuite été préparés et l'activité de la caspase-3 a été mesurée dans une réaction enzymatique reposant sur le clivage d'un substrat fluorescent spécifique d'une activité « caspase-3 like » (Ac-DEVD-AFC). Les résultats exprimés en unités arbitraires de fluorescence ont été normalisés par la quantité de protéines. Les résultats sont donc exprimés en unités arbitraires de fluorescence/µg de protéines et représentent la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour n=3. Les cellules contrôles (CTL) représentent des cellules incubées 7 heures en absence de staurosporine et de 3-MA. \* : statistiquement significativement différent des cellules cybrides sauvages avec  $p < 0,05$  comme déterminé par un test t-de Student. # : statistiquement significativement différent des cellules cybrides mutées traitées pendant 6 h avec la staurosporine seule à 500 nM avec  $p < 0,05$  comme déterminé par un test t-de Student.



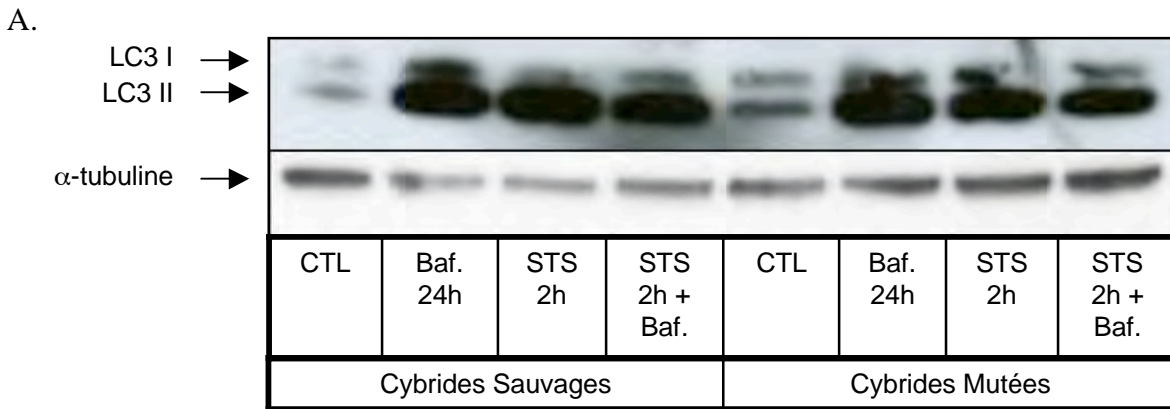
**Figure 3.2 : Caractérisation de l'autophagie par la détection de la protéine LC3.**

(A) Analyse par Western Blotting de l'abondance de la protéine autophagosomale LC3 I et LC3 II dans des lysats totaux préparés à partir de cellules incubées dans des conditions connues pour stimuler l'autophagie. Les cellules cybrides sauvages et mutées ont été incubées en présence (CTL) ou en absence de sérum (- sérum) pendant 24 heures ou mises en présence de bafilomycine A<sub>1</sub> (Baf.) à 100 nM pendant 24 h. Dans certaines conditions, l'absence de sérum est combinée à la bafilomycine pour stimuler au maximum la réponse autophagique (- sérum + Baf.). Au terme des incubations, des lysats totaux sont préparés et l'abondance des formes LC3 I et LC3 II est détectée par Western Blotting réalisé sur 20 µg de protéines grâce à un anticorps monoclonal de souris anti-LC3. La détection des protéines d'intérêt est révélée en chémoluminescence (ECL). Les photons émis impriment des films radiographiques qui ont ensuite été développés, fixés et séchés puis scannés. La charge protéique est vérifiée par l'immunodétection de l'α-tubuline.



**Figure 3.2 : Caractérisation de l'autophagie par la détection de la protéine LC3.**

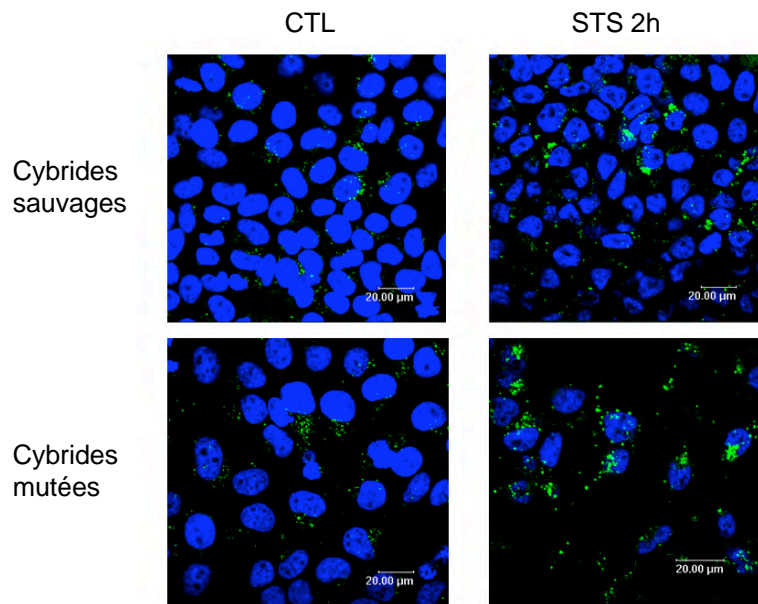
(B) Marquage en immunofluorescence et observations en microscopie confocale permettant de visualiser l'abondance et la distribution de la protéine LC3 (en vert) dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées ou non (CTL) avec la Bafilomycine A<sub>1</sub> à 100 nM (Baf.) ou incubées en absence de sérum (- sérum) pendant 24 heures. Après fixation et perméabilisation des cellules, le marquage est réalisé à l'aide d'un anticorps primaire de souris dirigé contre la protéine LC3 et d'un anticorps secondaire de type Alexa anti-IgG de souris (longueur d'onde d'émission 488 nm, vert). Le noyau des cellules est marqué au Topro-3 (longueur d'onde d'émission: 640 nm, bleu). (C) Visualisation de l'expression de la protéine LC3-GFP dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées ou non en présence de Bafilomycine A<sub>1</sub> à 100 nM pendant 24 heures. Les cellules sont transfectées transitoirement au Superfect avec un plasmide d'expression codant pour la protéine LC3-GFP. Après 16 heures de repos, elles sont incubées ou en absence (CTL) ou en présence de Bafilomycine A<sub>1</sub> à 100 nM (Baf.) pendant 24 heures puis sont fixées, montées sur lames et observées au microscope confocale.



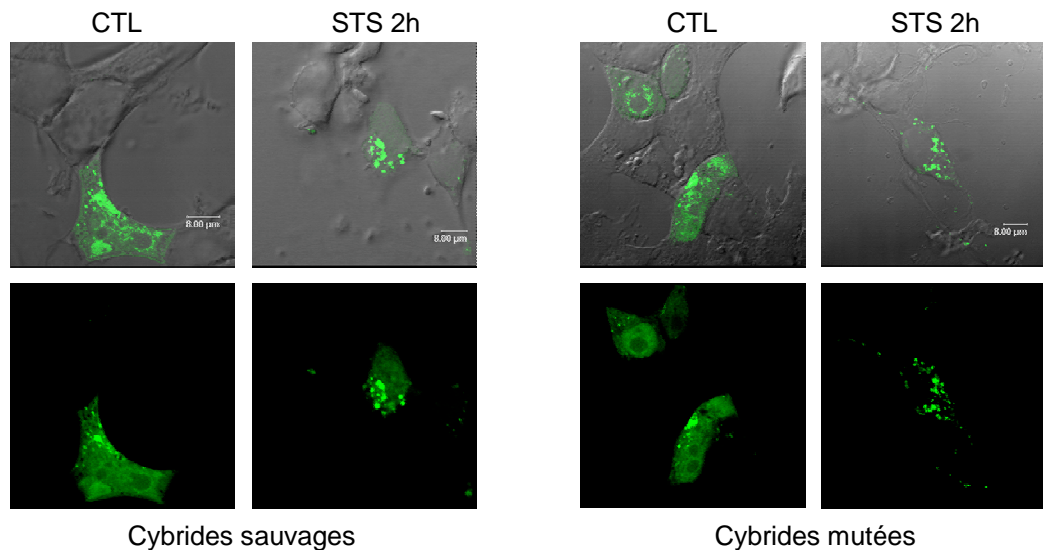
**Figure 3.3 : Caractérisation de l'autophagie par la détection de la protéine LC3 en réponse à la staurosporine (STS).**

(A) Analyse par Western blot de l'abondance de la protéine autophagosomale LC3 I et LC3 II dans des lysats totaux préparés à partir de cellules incubées en présence (STS 2 h) ou en absence (CTL) de STS à 500 nM durant 2h ou mises en présence de bafilomycine A<sub>1</sub> (Baf.) à 100 nM pendant 24 h. Dans certaines conditions, l'incubation en présence de staurosporine 2 h est combinée à la bafilomycine (2h) pour stimuler au maximum la réponse autophagique (STS 2 h + Baf.). Au terme des incubations, les lysats totaux sont préparés et l'abondance des formes LC3 I et LC3 II est détectée par Western Blotting réalisé sur 20 µg de protéines grâce à un anticorps monoclonal de souris anti-LC3. La détection des protéines d'intérêt est révélée en chémoluminescence (ECL). Les photons émis impriment des films radiographiques qui ont ensuite été développés, fixés et séchés puis scannés. La charge protéique est vérifiée par l'immunodétection de l' α-tubuline.

B.



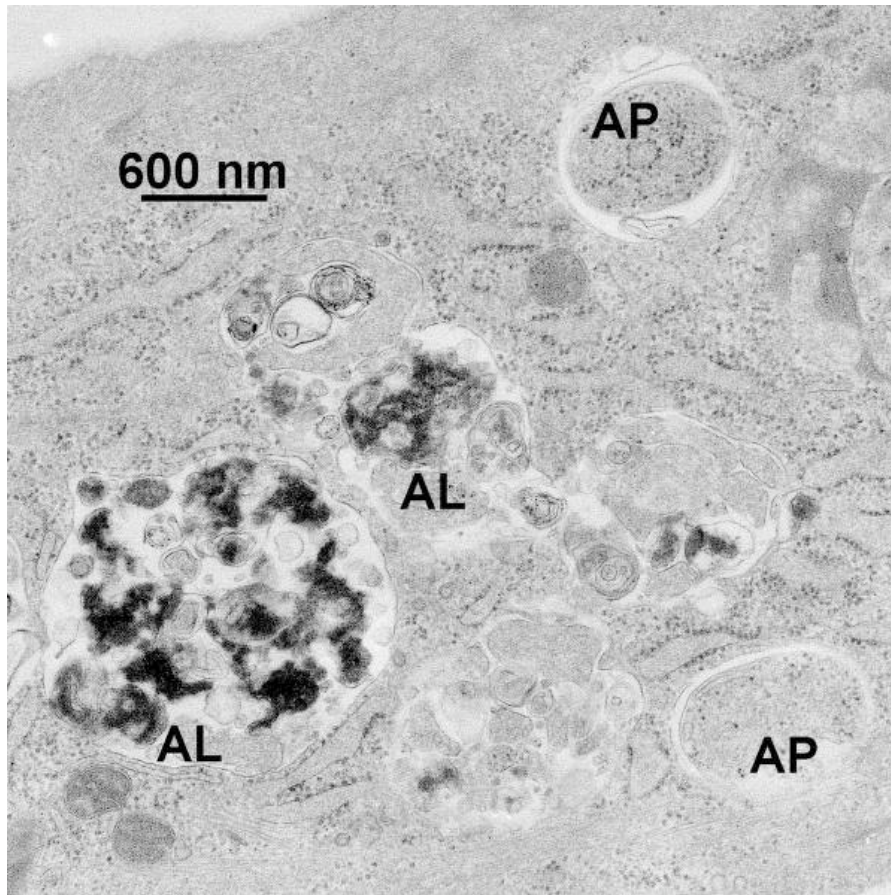
C.



**Figure 3.3 : Caractérisation de l'autophagie par la détection de la protéine LC3 en réponse à la staurosporine (STS).**

(B) Marquage en immunofluorescence et observations en microscopie confocale permettant de visualiser l'abondance et la distribution de la protéine LC3 (en vert) dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées ou non (CTL) avec la staurosporine à 500 nM durant 2 heures (STS 2h). Après fixation et perméabilisation des cellules, le marquage est réalisé à l'aide d'un anticorps primaire de souris dirigé contre la protéine LC3 et d'un anticorps secondaire de type Alexa anti-IgG de souris (longueur d'onde d'émission: 488 nm, vert). Le noyau des cellules est marqué au Topro-3 (longueur d'onde d'émission: 640 nm, bleu). (C) Visualisation de l'expression de la protéine LC3-GFP dans des cellules cybrides sauvages et mutées incubées ou non en présence de staurosporine à 500 nM pendant 2 heures. Les cellules sont transfectées transitoirement au Superfect avec un plasmide d'expression codant pour la protéine LC3-GFP. Après 16 heures de repos, elles sont incubées en absence (CTL) ou en présence de staurosporine à 500 nM (STS) pendant 2 heures puis sont fixées, montées sur lames et observées au microscope confocale.

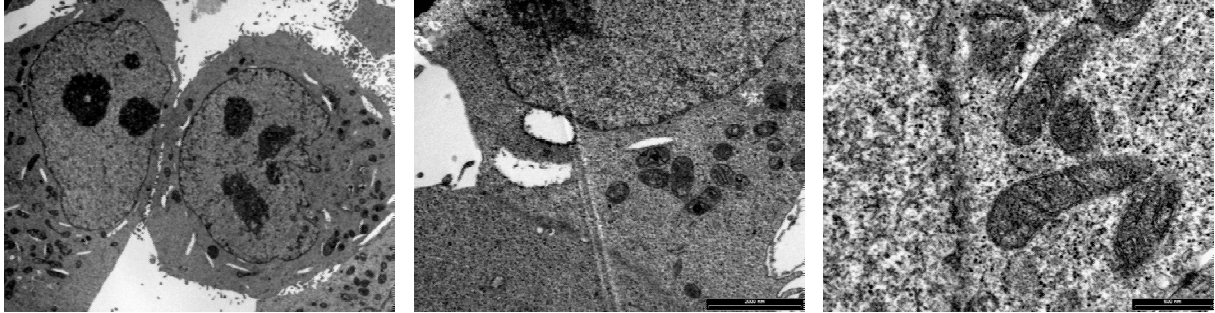




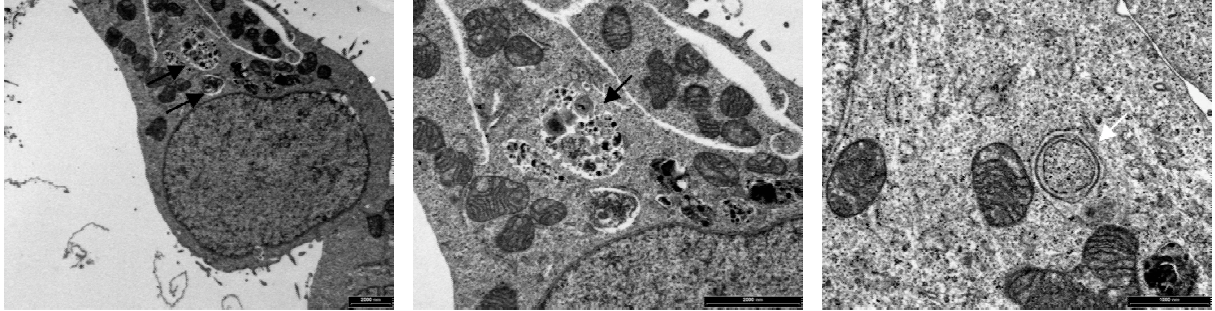
**Figure 3.4 : Microscopie électronique montrant l'ultrastructure d'autophagosomes (AP) et d'autolysosomes (AL) dans des fibroblastes de souris.**

Les cellules ont été incubées en absence de sérum pendant 2 h avant la fixation pour la microscopie. Les autophagosomes précoces (AP) séquestrent une partie de cytoplasme intacte. Les autophagolysosomes (AL) sont caractérisés par la présence de parties de cytoplasme partiellement dégradées avec des agrégats plus denses aux électrons correspondant à l'accumulation de ribosomes.

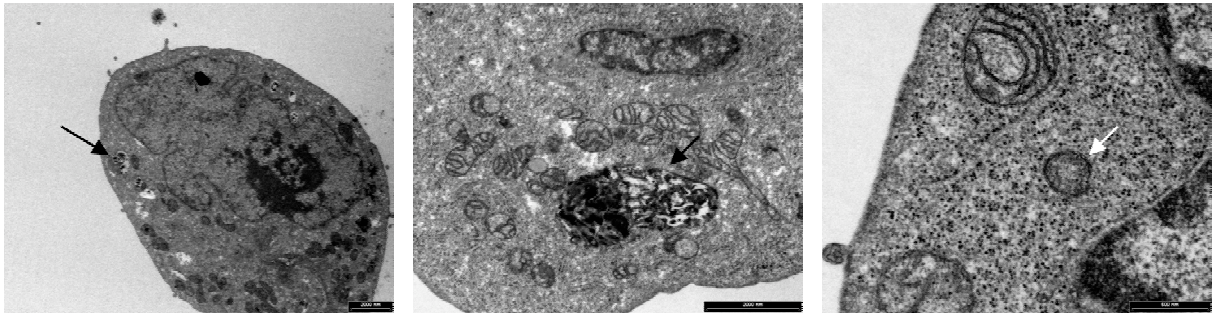
A. Cellules cybrides sauvages CTL



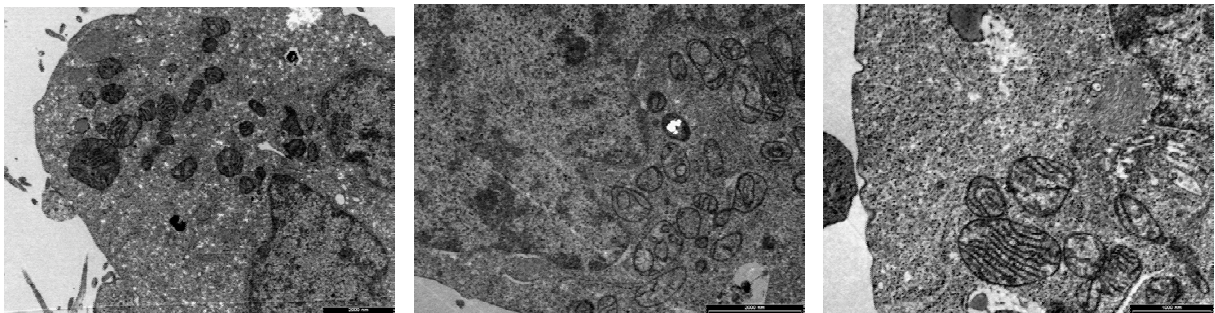
B. Cellules cybrides sauvages - sérum + Baf.



C. Cellules cybrides sauvages + STS 2h



D. Cellules cybrides sauvages + STS 2h + 3-MA



3700 X

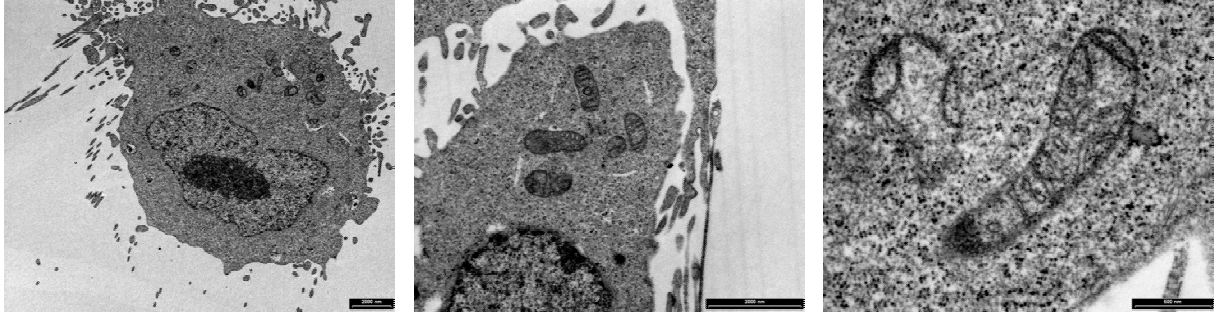
8900 X

30 000 X

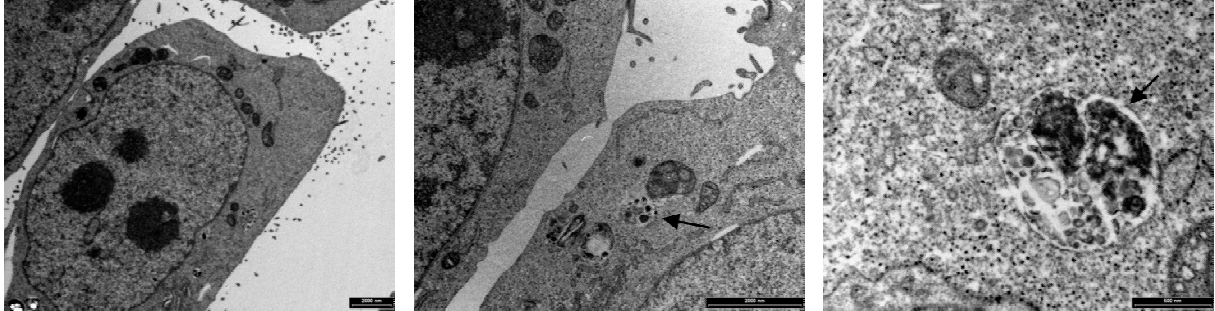
**Figure 3.5 : Visualisation vacuoles autophagiques dans des cellules cybrides sauvages incubées avec de la bafilomycine A1 en absence de sérum ou en présence de STS.**

Micrographies obtenues en microscopie électronique de cellules cybrides sauvages contrôles (A), incubées 24 h en absence de sérum et en présence de bafilomycine A<sub>1</sub> à 100 μM (B), incubées 2 h en présence de STS à 500 nM (C) ou incubées pendant 2 h avec la STS à 500 nM en présence de 3-MA à 10 mM (D). Grossissements utilisés : 3700 x, 8900 x et 30 000x. Les flèches blanches indiquent les vacuoles autophagiques précoces (autophagosomes) et les flèches noires les vacuoles autophagiques tardives (autophagolysosomes).

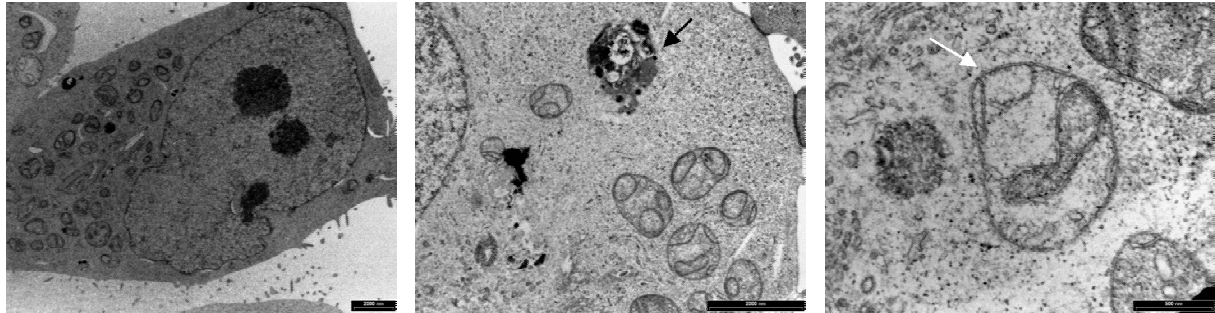
A. Cellules cybrides mutées CTL



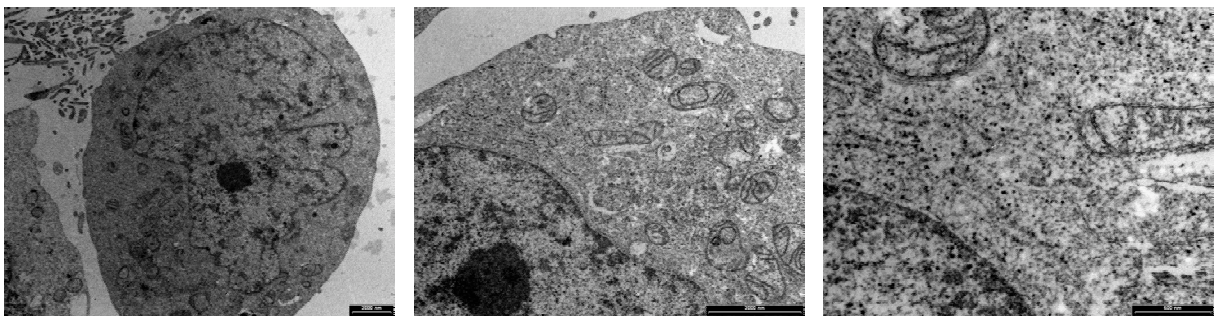
B. Cellules cybrides mutées - sérum + Baf.



C. Cellules cybrides mutées + STS 2h



D. Cellules cybrides mutées + STS 2h + 3-MA



3700 X

8900 X

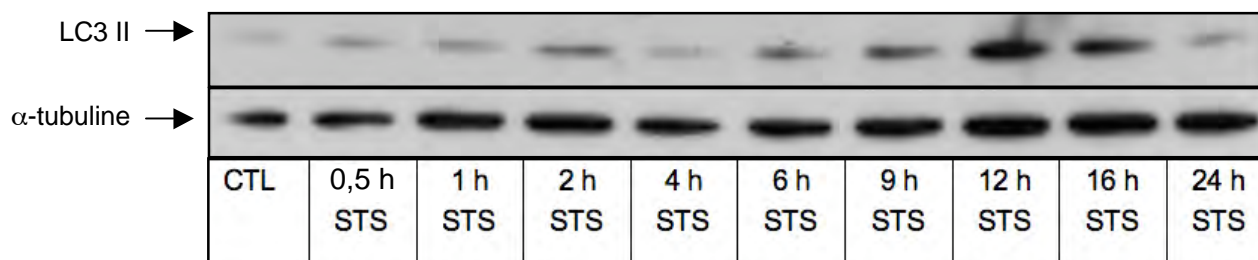
30 000 X

**Figure 3.6 : Visualisation vacuoles autophagiques dans des cellules cybrides mutées incubées avec de la bafilomycine A<sub>1</sub> en absence de sérum ou en présence de STS.**

Micrographies obtenues en microscopie électronique de cellules cybrides mutées contrôles (A), incubées 24 h en absence de sérum et en présence de bafilomycine A<sub>1</sub> à 100  $\mu$ M (B), incubées 2 h en présence de STS à 500 nM (C) ou incubées pendant 2 h avec la STS à 500 nM en présence de 3-MA à 10 mM (D). Grossissements utilisés : 3700 x, 8900 x et 30 000x. Les flèches blanches indiquent les vacuoles autophagiques précoces (autophagosomes) et les flèches noires les vacuoles autophagiques tardives (autophagolysosomes).

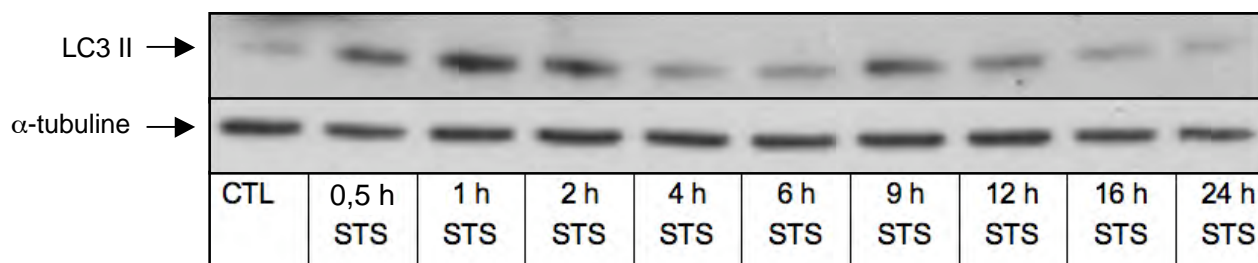
A.

Cybrides sauvages



B.

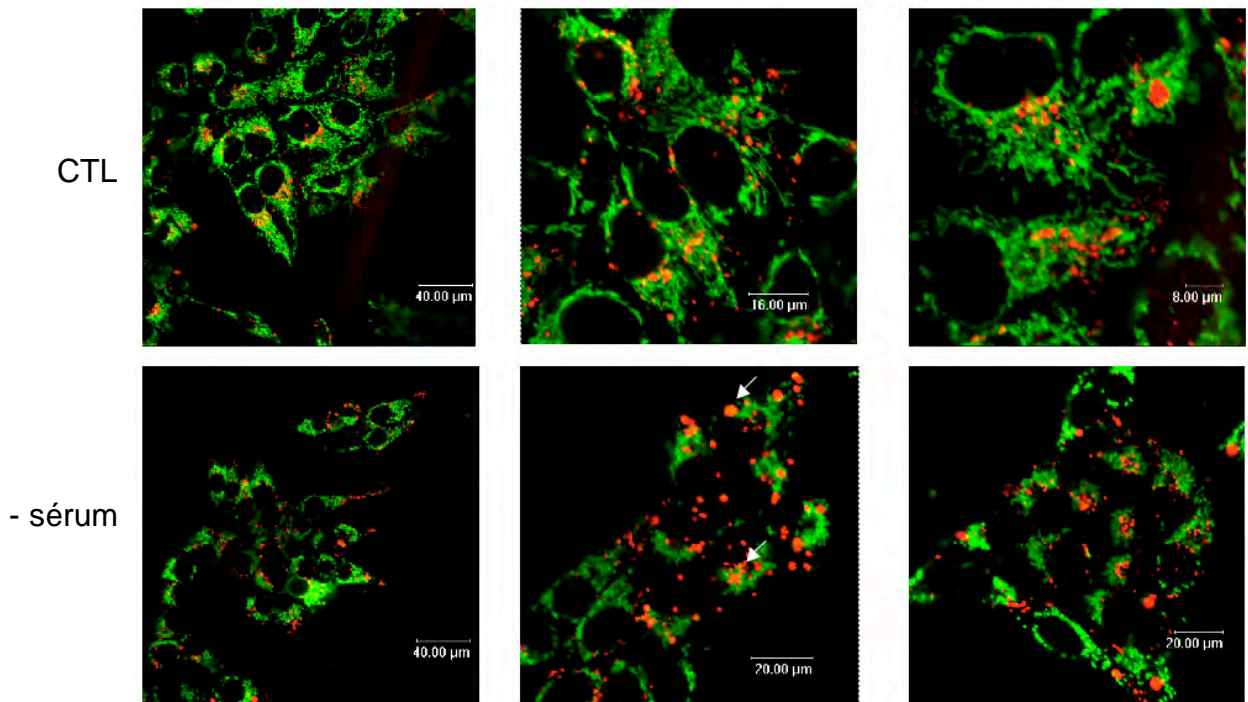
Cybrides mutées



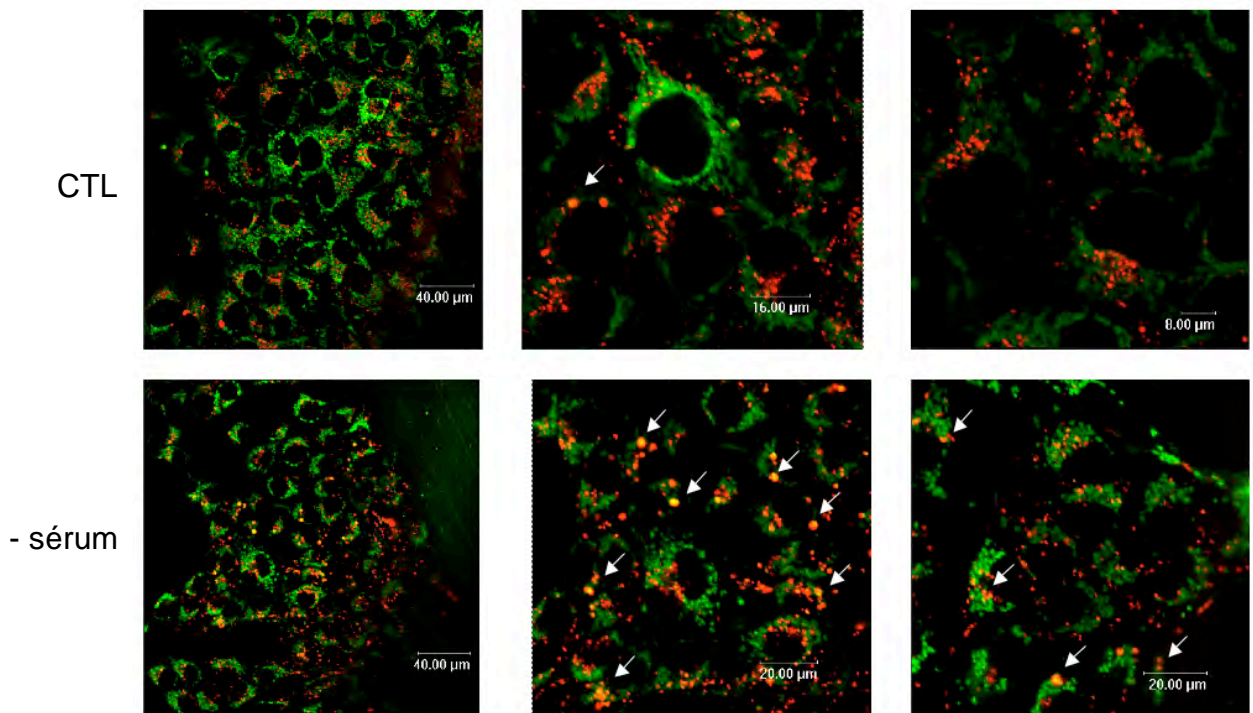
**Figure 3.7 : Analyse de l'abondance de la protéine LC3 II en Western Blot sur des lysats cellulaires préparés à partir de cellules incubées avec de la staurosporine (STS).**

Analyse par Western blot de l'abondance de la protéine autophagosomale LC3 II dans des lysats totaux préparés à partir de cellules cybrides sauvages (A) et mutées (B) qui ont été ou non (CTL) incubées durant 0,5; 1; 2; 4; 6; 9; 12; 16 et 24h en présence de staurosporine à 500 nM. Au terme des incubations, les lysats totaux sont préparés et l'abondance de la protéine LC3 II est détectée par Western Blotting réalisé sur 20  $\mu$ g de protéines grâce à un anticorps monoclonal de souris anti-LC3. La détection des protéines d'intérêt est révélée en chémoluminescence (ECL) sur des films radiographiques qui ont ensuite été développés, fixés et séchés puis scannés. La charge protéique est vérifiée par l'immunodétection de l'  $\alpha$ -tubuline.

A. Cybrides sauvages

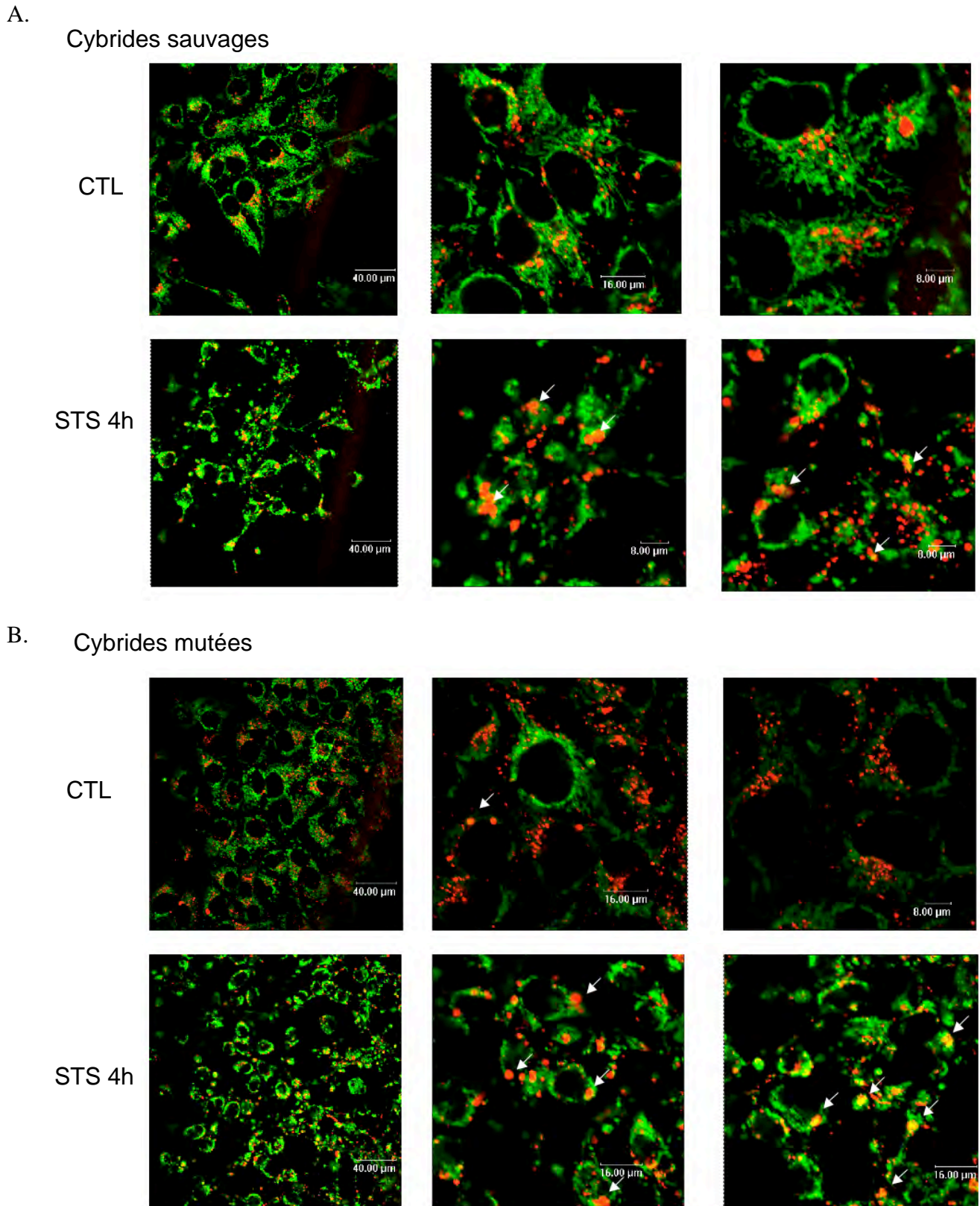


B. Cybrides mutées



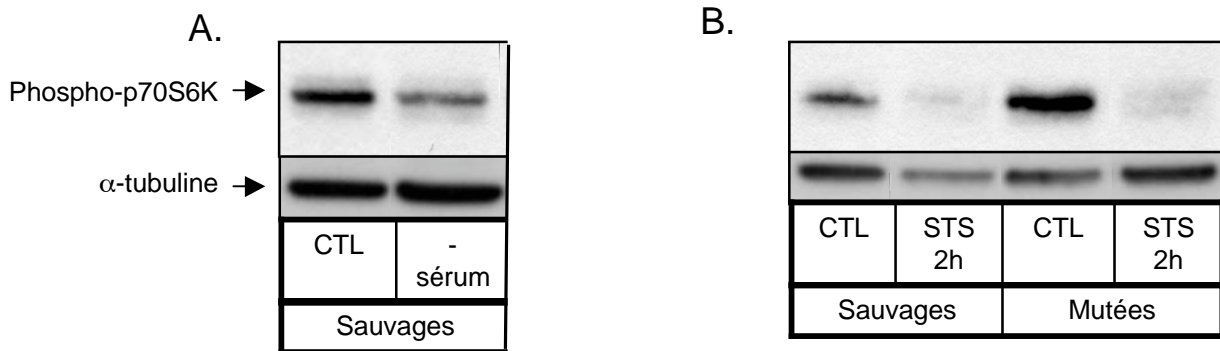
**Figure 3.8 : Effet de la privation de sérum sur la mitophagie.**

Les cellules cybrides sauvages (A) et mutées (B) ont été incubées en présence (CTL) ou en absence de sérum (-sérum) durant 24h avant d'être incubées durant 30 minutes avec les sondes MitoTracker green à 50 nM et LysoTrackerRed à 100 nM. Les cellules ont ensuite été rincées avant d'être observées vivantes au microscope confocal. Les mitochondries apparaissent en vert et les lysosomes en rouge. Le processus de mitophagie, qui peut être mis en évidence par la recherche des événements de colocalisation (marquage jaune), est pointé sur les photographies par des flèches blanches.



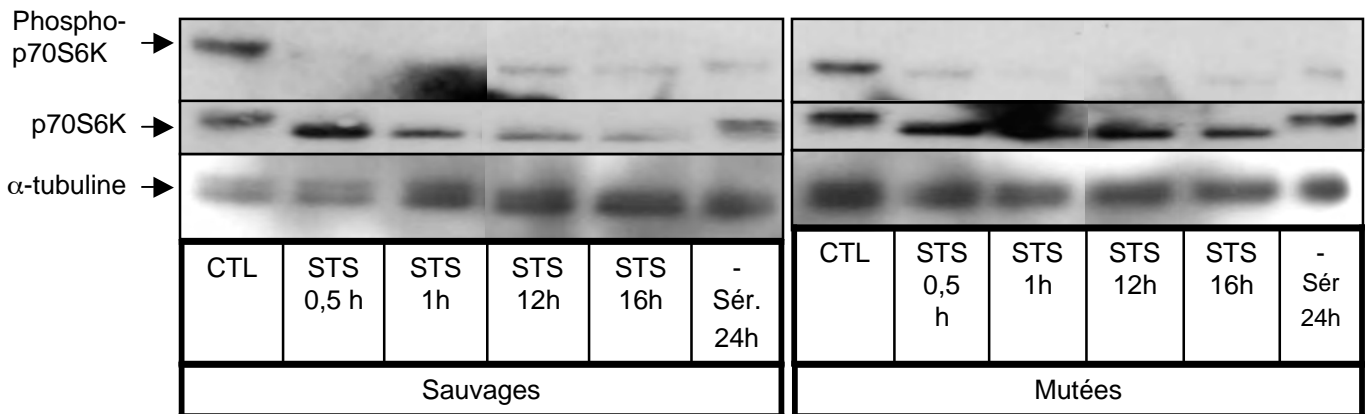
**Figure 3.9 : Effet de la staurosporine sur la mitophagie.**

Les cellules cybrides sauvages (A) et mutées (B) ont été incubées en absence (CTL) ou en présence de staurosporine à 500 nM durant 4h (STS 4h) avant d'être incubées durant 30 minutes avec les sondes Mitotracker green à 50 nM et LysoTrackerRed à 100 nM. Les cellules ont ensuite été rincées avant d'être observées vivantes au microscope confocal. Les mitochondries apparaissent en vert et les lysosomes en rouge. Le processus de mitophagie, qui peut être mis en évidence par la recherche des événements de colocalisation (marquage jaune), est pointé sur les photographies par des flèches blanches.



**Figure 3.10 : Analyse de l'abondance de la forme phosphorylée de la protéine p70S6K en Western Blot dans des lysats de cellules incubées pendant 24h en absence de sérum ou traitées 2h en présence de staurosporine (STS).**

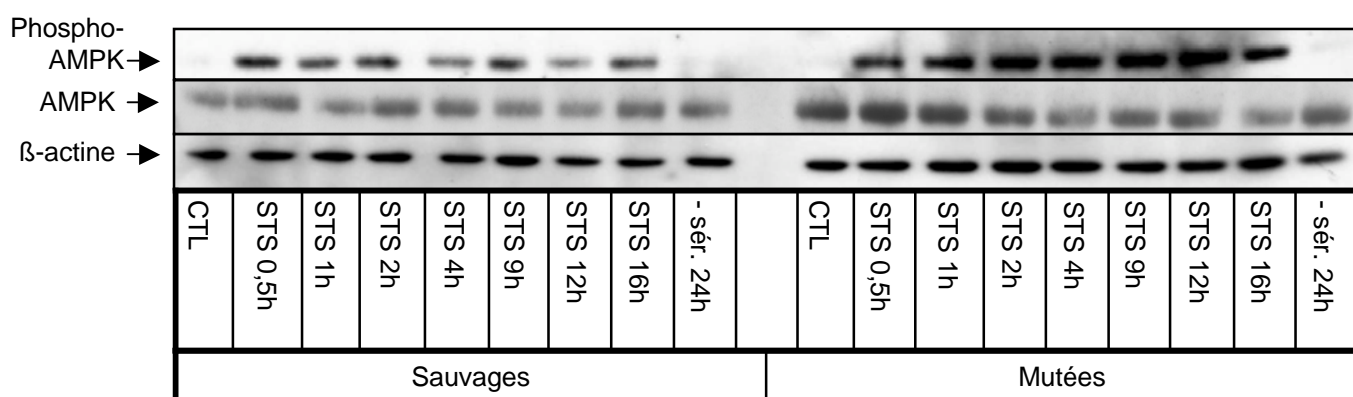
Analyse par Western blot de l'abondance de la protéine p70S6K phosphorylée sur la Thréonine 389 dans des lysats totaux préparés à partir de cellules cybrides sauvages qui ont été ou non incubées en absence de sérum durant 24h (-sérum, A) ou des cellules cybrides sauvages et mutées en présence de staurosporine à 500 nM durant 2h (STS 2h, B). Au terme des incubations, les lysats totaux sont préparés et l'abondance de la protéine p70S6K phosphorylée sur la Thréonine 389 est détectée par Western Blotting réalisé sur 20 µg de protéines grâce à un anticorps monoclonal de lapin anti-p70S6K phosphorylée (Thr 389). La détection des protéines d'intérêt est révélée en chémoluminescence (ECL) sur des films radiographiques qui ont ensuite été séchés puis scannés. La charge protéique est vérifiée par l'immunodétection de l'α-tubuline.



**Figure 3.11 : Analyse de l'abondance de la forme phosphorylée de la protéine p70S6K en Western Blot dans des lysats de cellules incubées pendant 4h en absence de sérum ou traitées 24h en présence de staurosporine (STS).**

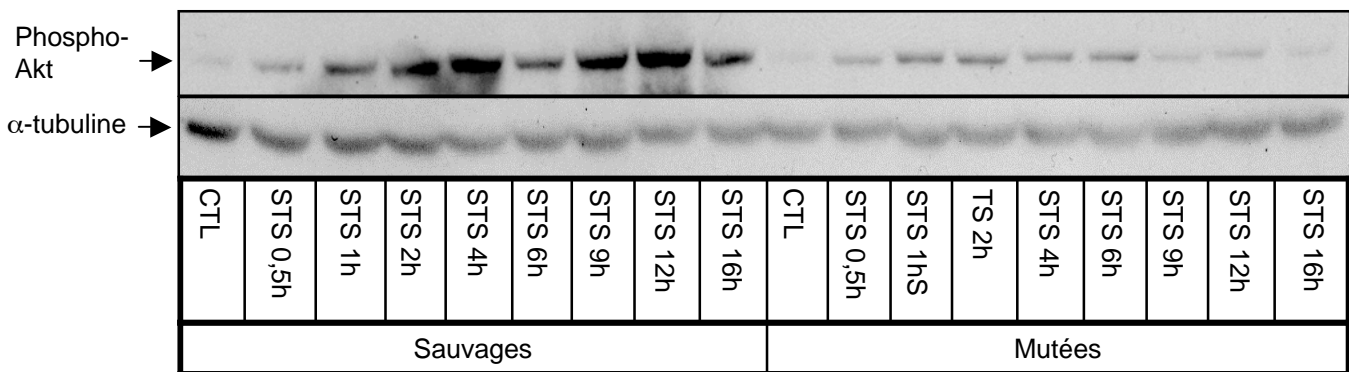
Analyse par Western blot de l'abondance de la protéine p70S6K et sa forme phosphorylée sur la Thréonine 389 dans des lysats totaux préparés à partir de cellules cybrides sauvages et mutées qui ont été ou non incubées en absence (CTL) ou en présence de staurosporine à 500 nM durant 0,5; 1; 12 et 16h (STS) ou en absence de sérum durant 24h (-Sér. 24h). Au terme des incubations, les lysats totaux sont préparés et l'abondance de la protéine p70S6K et de sa forme phosphorylée sur la Thréonine 389 est détectée par Western Blotting réalisé sur 20 µg de protéines grâce à un anticorps monoclonal de lapin anti-p70S6K et un anticorps monoclonal phosphorylée de lapin anti-p70S6K (Thr 389). La détection des protéines d'intérêt est révélée en chémoluminescence (ECL) sur des films radiographiques qui ont ensuite été développés, fixés et séchés puis scannés. La charge protéique est vérifiée par l'immunodétection de l' α-tubuline.





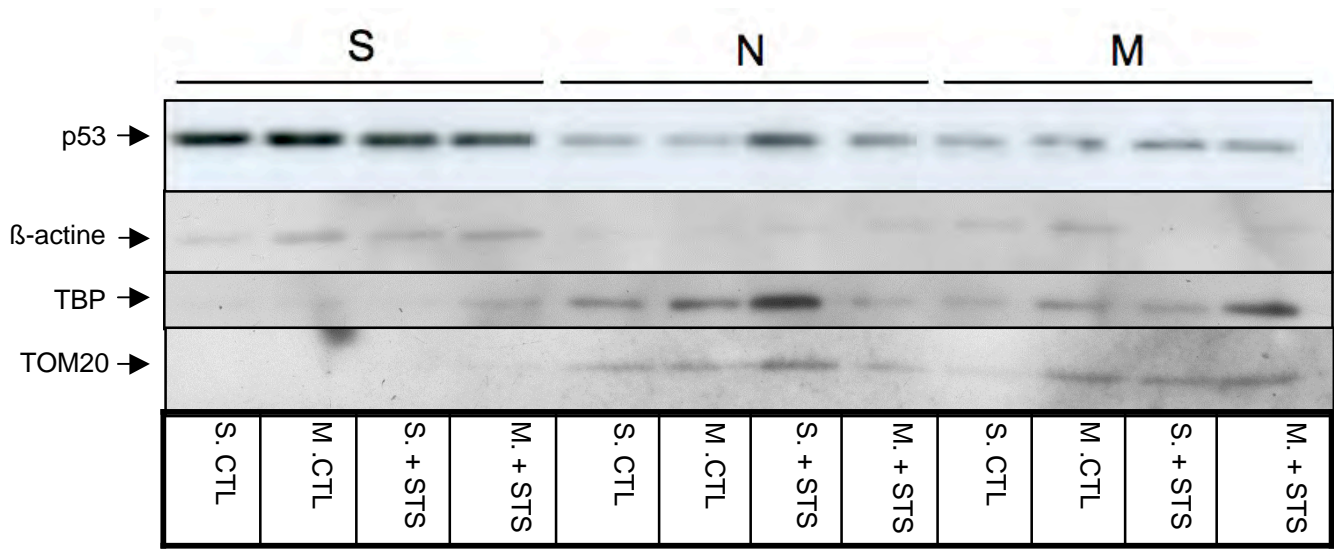
**Figure 3.12 : Analyse de l'abondance de la protéine AMPK et de sa forme phosphorylée en Western Blot sur des lysats cellulaires préparés à partir de cellules incubées avec de la staurosporine (STS) ou en absence de sérum durant 24h.**

Analyse par Western blot de l'abondance de la protéine AMPK et de sa forme phosphorylée sur la Thréonine 172 dans des lysats totaux préparés à partir de cellules cybrides sauvages et mutées qui ont été ou non (CTL) incubées durant 0,5; 1; 2; 4; 9; 12; 16 et 24h en présence de staurosporine à 500 nM (STS) ou en absence de sérum durant 24h (-sér. 24h). Au terme des incubations, les lysats totaux sont préparés et l'abondance de la protéine AMPK et de sa forme phosphorylée est détectée par Western Blotting réalisé sur 20 µg de protéines grâce à un anticorps monoclonal de souris anti-AMPKt et un anticorps monoclonal de souris anti-phospho-AMPK (Thr 172). La détection des protéines d'intérêt est révélée en chémoluminescence (ECL) sur des films radiographiques qui ont ensuite été séchés puis scannés. La charge protéique est vérifiée par l'immunodétection de la β-actine



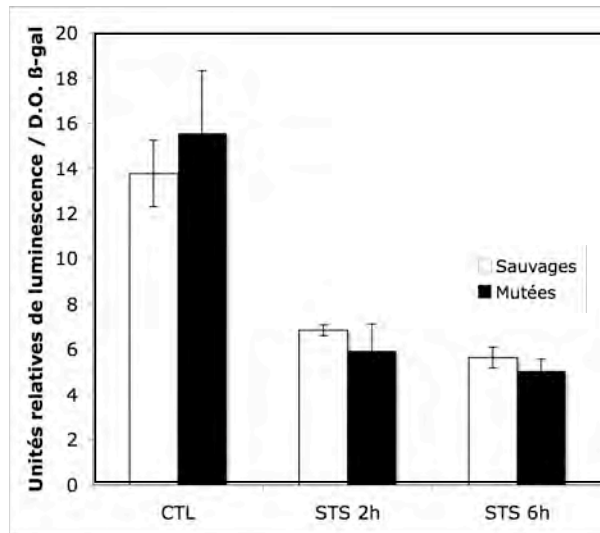
**Figure 3.13 : Analyse de l'abondance de la protéine Akt et de sa forme phosphorylée en Western Blot sur des lysats cellulaires préparés à partir de cellules incubées avec de la staurosporine (STS).**

Analyse par Western blot de l'abondance de la protéine Akt et de sa forme phosphorylée sur la Sérine 473 dans des lysats totaux préparés à partir de cellules cybrides sauvages et mutées qui ont été ou non (CTL) incubées durant 0,5; 1; 2; 4; 6; 9; 12; 16 et 24h en présence de staurosporine à 500 nM (STS). Au terme des incubations, les lysats totaux sont préparés et l'abondance de la protéine Akt et de sa forme phosphorylée est détectée par Western Blotting réalisé sur 20 µg de protéines grâce à un anticorps monoclonal de souris anti-Akt et un anticorps monoclonal de souris anti-phospho-Akt (Ser 473). La détection des protéines d'intérêt est révélée en chémoluminescence (ECL) sur des films radiographiques qui ont ensuite été développés, fixés et séchés puis scannés. La charge protéique est vérifiée par l'immunodétection de l'  $\alpha$ -tubuline.



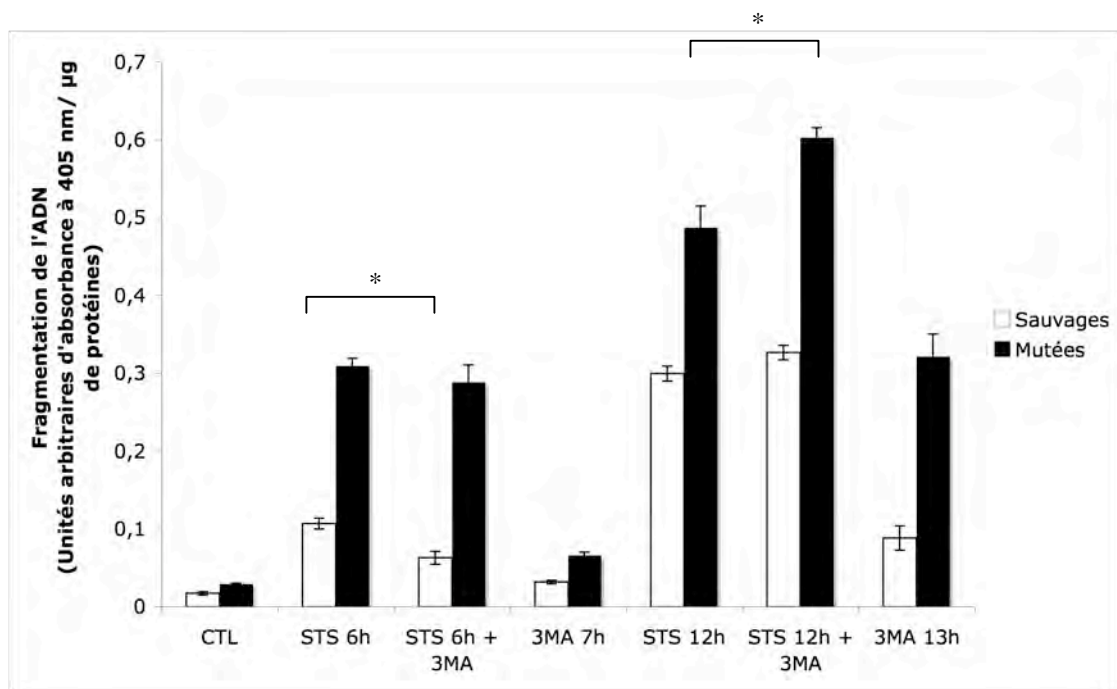
**Figure 3.14 : Analyse de l'abondance et de la localisation de la protéine p53 en Western Blot dans des fractions subcellulaires préparées à partir de cellules incubées avec de la staurosporine (STS).**

Analyse par Western blot de l'abondance et de la localisation de la protéine p53 dans des fractions subcellulaires préparées à partir de cellules cybrides sauvages et mutées qui ont été incubées durant 6h en présence ou en absence (CTL) de staurosporine à 500 nM (STS). Au terme des incubations, des fractions subcellulaires enrichies en noyaux (N), en mitochondries (M) ainsi qu'une fraction soluble (S) sont préparées par fractionnement par centrifugations différentielles. L'abondance de la protéine p53 est détectée par Western Blotting réalisé sur 20 µg de protéines grâce à un anticorps monoclonal de souris anti-p53. La détection des protéines d'intérêt est révélée en chémoluminescence (ECL) sur des films radiographiques qui ont ensuite été séchés puis scannés. La charge protéique est vérifiée par l'immunodétection de la β-actine pour la fraction S, de TBP (TATA Binding Protein) pour la fraction N et de TOM20 (Transporter of Outer Membrane 20) pour la fraction M.



**Figure 3.15 : Effet de la staurosporine sur l'activité transcriptionnelle de p53.**

Les cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) ont été transfectées pendant 6 heures avec les plasmides rapporteurs p53-luciférase et PCMV $\beta$ . Après 16 heures de récupération, les cellules ont été incubées en présence ou en absence (CTL) de staurosporine à 500 nM pendant 2 et 6 heures (STS) puis lysées afin de mesurer les activités luciférase et  $\beta$ -galactosidase. Pour la luciférase, un substrat luminogène est mis en présence du lysat et une mesure des photons émis est réalisée au luminomètre tandis que pour la  $\beta$ -galactosidase, les lysats sont mis en présence d'un substrat chromogène de l'enzyme et une mesure de l'absorbance du produit de la réaction est réalisée après 30 minutes au spectrophotomètre à 405 nm. Les résultats exprimés en unités relatives de luminescence normalisées par l'activité  $\beta$ -galactosidase représentent la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour n=3.



**Figure 3.16 : Effet du 3-méthyladénine sur la fragmentation de l'ADN induite par la staurosporine durant 6 et 12 h.**

Test de fragmentation d'ADN. Les cellules cybrides sauvages (colonnes blanches) et mutées (colonnes noires) ont été pré-incubées en présence ou en absence de 3 méthyladénine à 10 mM durant 1 heure. Ensuite la staurosporine a été ajoutée (STS + 3-MA) ou non (3-MA 7h et 13h) à la concentration de 500 nM durant 6 heures ou 12 heures avant de mesurer la fragmentation d'ADN à l'aide d'un kit de détection de type ELISA (voir matériel et méthodes). Le principe du test repose sur la détection des petits fragments d'ADN dans les échantillons par des anticorps dirigés contre les histones dont l'abondance est révélée en présence d'anticorps conjugués à la HRP dans une réaction colorimétrique conduisant à la formation d'un chromogène. L'absorbance du produit de la réaction est alors mesurée au spectrophotomètre à 605 nm. Les résultats sont exprimés en unités d'absorbance normalisées par la quantité de protéines et représentent la moyenne  $\pm$  1 S.D. pour n=3. \* : statistiquement significativement différent des cellules cybrides sauvages avec  $p < 0,05$  comme déterminé par un test t-de Student. Les cellules contrôles (CTL) sont constituées de cellules incubées en absence de STS pendant 7 heures.

## 4 Conclusion et perspectives

Chez un être humain adulte, les mitochondries consomment près de 400 l d'oxygène et synthétisent près de 65 kg d'ATP par jour. Il est donc facile d'imaginer les conséquences catastrophiques d'une altération de la phosphorylation oxydative. En effet, le dysfonctionnement mitochondrial est directement ou indirectement associé à de nombreuses maladies neurodégénératives telles que des encéphalo-myopathies, mais le dysfonctionnement mitochondrial jouerait également un rôle dans l'apparition du diabète de type 2 et la résistance à l'insuline et dans le développement de certains cancers (Schapira, 2006). Les maladies mitochondriales, au sens strict, sont définies par les conséquences d'altérations de l'activité bioénergétique des mitochondries résultant exclusivement de modifications dans le génome mitochondrial et qui peuvent prendre plusieurs formes comme des mutations ponctuelles à l'origine des syndromes MERRF et MELAS, des délétions plus ou moins importantes, des déléptions (beaucoup plus rares) et des duplications dans l'ADNmt (Wallace, 1999). L'expression phénotypique de ces modifications dans l'ADN mitochondrial dépendra du type de mutations, du degré d'hétéroplasmie atteint et des tissus affectés. Mentionnons également que l'interprétation des signes cliniques des maladies mitochondriales est rendue difficile par le fait qu'une même mutation peut être à l'origine des symptômes très différents et qu'une même manifestation symptomatique peut être causée par de multiples mutations différentes (DiMauro, 2004).

Nous avons vu dans l'introduction de ce travail que la mitochondrie est un organe capable d'intégrer de nombreux signaux de survie et de mort cellulaire (Chan, 2006a). Plus particulièrement, le dysfonctionnement de la mitochondrie est souvent une modification nécessaire et suffisante pour initier une réponse apoptotique spontanée. La mort par apoptose de cellules neuronales et/ou musculaires a d'ailleurs été mise en évidence sur des biopsies de patients atteints du syndrome MERRF (Schmiedel et al., 2003). Une question légitime que l'on est en droit de se poser est donc de savoir si la mort par apoptose dans ces conditions résulte d'une mort spontanée liée au dysfonctionnement mitochondrial ou un changement de sensibilité à la présence de molécules pro-apoptotiques comme le TNF $\alpha$ , Fas-Ligand, etc (DiMauro, 2004).

Dans ce contexte, nous nous intéressons au laboratoire à la question de savoir si des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial généré par des mutations ponctuelles différentes et à l'origine des syndromes MERRF et MELAS sont plus ou moins sensibles à l'apoptose induite par différents inducteurs comme le TNF $\alpha$ , TRAIL, l'étoposide et la staurosporine. En effet, il est aujourd'hui généralement bien accepté que l'apoptose joue un rôle très important dans les caractéristiques et manifestations cliniques des maladies mitochondriales humaines (Wallace, 1999). De plus, des études ont été réalisées sur des biopsies musculaires de patients atteints d'encéphalomyopathies mitochondriales telles que MELAS ou MERRF et ont montré la présence de marqueurs apoptotiques dans ces cellules

Au laboratoire, il a été montré que des cellules présentant une diminution de l'activité mitochondriale telles que des cellules cybrides MERRF (qui rappellent le sont des cellules  $\rho^0$

143B repeuplées avec des mitochondries portant la mutation A8344G dans le gène codant pour l'ARNt<sup>Lys</sup>) ont une sensibilité plus importante à un inducteur apoptotique comme la staurosporine.

De manière intéressante et pour complexifier la compréhension des mécanismes conduisant à la survie ou à la mort cellulaire dans de multiples conditions, de plus en plus de données de la littérature suggèrent que la mort cellulaire par autophagie (type II) peut également jouer un rôle tantôt s'opposant (Shintani & Klionsky, 2004), tantôt renforçant la réponse de mort des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial induite par des inducteurs apoptotiques (Baehrecke, 2005).

L'autophagie est, en effet, reconnue comme la principale voie de mort cellulaire alternative ou complémentaire à l'apoptose (Gozuacik & Kimchi, 2007). De plus, dans certains modèles, elle peut constituer une réponse cellulaire primaire qui sera suivie par la réponse apoptotique (Maiuri et al., 2007b). Cependant, les mécanismes qui régulent la réponse autophagique dans des cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial et son rôle éventuel dans la survie ou la mort de ces cellules en réponse à un inducteur apoptotique sont encore mal compris.

Il est aujourd'hui reconnu qu'il existe une interrelation entre l'apoptose et l'autophagie (Maiuri et al., 2007b). De plus, comme nous l'avons vu dans l'introduction de ce travail, plusieurs voies régulatrices (voies dépendantes de la PI3K/AKT/PKB ; de mTOR, de l'AMPK, et de p53, voir point 1.5.2) ainsi que plusieurs protéines effectrices (famille des protéines « BH3-only », Atg5, ..., voir point 1.5.1) sont communes et jouent des rôles essentiels tant dans l'apoptose que dans l'autophagie.

Dans ce travail, nous avons donc tenté d'éclaircir l'implication et l'éventuelle interrelation entre l'apoptose et l'autophagie dans la mort cellulaire des cellules cybrides sauvages et mutées (portant la mutation MERRF) induite par l'inducteur apoptotique staurosporine. Les objectifs principaux de ce travail étaient donc : 1) de caractériser la réponse autophagique dans les deux lignées cellulaires lors d'une stimulation à la staurosporine et d'implémenter les techniques et les marqueurs moléculaires permettant de la mettre en évidence, 2) de tenter d'identifier et de déterminer l'état d'activité de certains effecteurs moléculaires par lesquels la staurosporine pourrait induire l'autophagie dans ces lignées cellulaires et 3) d'étudier la relation réciproque entre apoptose et autophagie dans les deux lignées cellulaires.

Dans la première partie de ce mémoire, nous avons décidé de mettre au point et de valider plusieurs marqueurs de l'autophagie. Nous avons montré que deux inducteurs utilisés de manière courante pour induire la formation d'autophagosome, la bafilomycine<sub>A1</sub> et la privation de sérum (Gonzalez-Polo et al., 2005) (Yamamoto et al., 1998), induisaient bien l'accumulation de la protéine LC3-II reflétant l'accumulation d'autophagosomes dans nos lignées cellulaires.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'effet de la STS sur la réponse autophagique. Dans ce travail, nous montrons clairement que la staurosporine, connue pour être un inducteur

apoptotique (Liu et al., 2004), est également capable d'induire, tant dans des cellules cybrides sauvages que dans des cellules cybrides mutées, la formation de vacuoles autophagiques. Ces résultats sont en accord avec les données de la littérature (Bampton et al., 2005). La capacité de la STS d'induire la formation de vacuoles autophagiques a été confirmée par des observations de l'ultrastructure réalisées par microscopie électronique dans les différentes conditions décrites ci-dessus et en les comparant aux données retrouvées dans la littérature et traitant de la caractérisation des différents types de vésicules observables dans le processus d'autophagie (Eskelinen, 2008).

Nos résultats montrent donc que la STS, en plus de son activité pro-apoptotique dans des cellules cybrides sauvages et mutées, est capable d'agir comme un inducteur autophagique dans les deux lignées cellulaires. De plus, cette induction semble plus rapide dans les cellules cybrides mutées.

Afin de mettre en évidence une possible augmentation de l'autophagie mitochondriale (mitophagie) dans les deux lignées cellulaires pendant la réponse autophagique déclenchée par la staurosporine, nous avons utilisé une méthode permettant de déterminer une éventuelle co-localisation entre les mitochondries et les lysosomes. Lorsque les cellules ont été incubées en absence de sérum ou en présence de STS, nous avons observé une augmentation de la co-localisation entre les mitochondries et les lysosomes, reflétant une augmentation de la « mitophagie » dans ces conditions. De manière très intéressante, la mitophagie induite par la privation de sérum dans les cellules cybrides mutées semble être plus importante. Des résultats comparables ont déjà été obtenus dans la littérature sur des cellules  $\rho^0$  et des cellules cybrides MELAS en réponse à la privation de sérum (Gu et al., 2004). Cette mitophagie différentielle observée pour les cellules incubées en absence de sérum pourrait être expliquée par le fait que les cellules cybrides mutées atteintes du dysfonctionnement mitochondrial montrent une diminution de leur potentiel de membrane mitochondrial (James *et al.*, 1996). Or, il a récemment été montré que la protéine Parkin, codée par un gène qui est muté dans la maladie de Parkinson, est impliquée dans le recrutement sélectif des mitochondries à dégrader. Cette protéine est donc capable de cibler spécifiquement les mitochondries présentant une diminution de leur potentiel de membrane mitochondrial (Narendra et al., 2008). La recherche de l'expression et de la localisation de la Parkin pourrait être envisagée dans nos lignées cellulaires incubées en présence de STS dans le but de rechercher une éventuelle participation de cette protéine à la mitophagie observée dans ces conditions.

Après avoir montré que la staurosporine induit l'autophagie dans les cellules cybrides sauvages et mutées, nous avons recherché les effets éventuels de ce traitement sur l'activité de certains acteurs moléculaires décrits pour contrôler la réponse apoptotique et/ou l'autophagie. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés à l'état d'activité du principal régulateur de l'autophagie, la kinase mTOR. Pour cela, nous avons étudié la phosphorylation de p70S6K, kinase dépendante de mTOR et qui constitue un marqueur indirect endogène de l'état d'activité de mTOR (Tee & Proud, 2001). Nos résultats ont montré que la STS est capable de diminuer l'activité de mTOR. Cette diminution est donc corrélée à l'activation de l'autophagie dans nos deux lignées cellulaires induite par la STS. De plus, il semble que l'inhibition de mTOR dans les cellules observées en réponse à un traitement en présence de



STS soit plus rapide que l'effet de la STS sur l'activation des caspases comme la caspase-3 qui n'est observée que pour des temps d'incubation supérieurs à 2 ou 4 h et de manière plus importante dans les cellules cybrides mutées. Le processus autophagique induit par la STS pourrait donc précéder l'activation de l'apoptose dans nos lignées cellulaires. Comme déjà mentionné dans la partie résultats, la surexpression d'une forme constitutivement active et non inhibable en conditions de STS, devrait pouvoir répondre à la question de savoir si mTOR est l'acteur principal de la mise en place de la réponse autophagique dans les cellules incubées en présence de STS.

Cette diminution de l'activité de mTOR observée dans les cellules incubées en présence de STS pourrait être expliquée par les résultats de notre expérience montrant une augmentation de la phosphorylation de l'AMPK sur la Thr172, un marqueur reconnu de son activation (Hadad et al., 2008). En effet, l'AMPK est capable de phosphoryler et d'activer TSC2, conduisant à une forte diminution de l'activité de mTOR. Il est donc possible que la staurosporine, dans ces lignées cellulaires, induise l'autophagie de manière dépendante, bien qu'indirectement, de l'AMPK. Une explication plausible serait que la STS induise une augmentation de la  $[Ca^{2+}]_c$ , un effet déjà démontré de la STS (Liu et al., 2004) ce qui permettrait l'activation d'une kinase en amont des calmoduline-kinases comme la CaMKK $\beta$  (Hoyer-Hansen & Jaattela, 2007). Cette dernière activerait l'AMPK qui, à son tour, inhiberait mTOR et permettrait ainsi de lever l'effet inhibiteur exercé par cette enzyme sur le déclenchement de l'autophagie (Maiuri et al., 2007b). Il faut rappeler que l'activation de l'AMPK est plus importante dans les cellules mutées. Il serait donc très intéressant d'étudier l'activation de la CaMKK $\beta$  en réponse à l'augmentation du  $[Ca^{2+}]_c$  induite par la STS dans les deux lignées cellulaires. Les résultats obtenus au laboratoire (G. Rommelaere, thèse en cours) montrent d'ailleurs que l'augmentation de la concentration en calcium cytosolique libre est plus forte dans les cellules cybrides mutées incubées en présence de STS que dans les cellules sauvages.

Nous avons également étudié l'activation de la protéine kinase Akt/PKB dans nos deux lignées cellulaires stimulées par la STS. Cette enzyme est une Ser/Thr kinase en aval de la PI3K qui est un régulateur essentiel de la prolifération et de la survie cellulaires (Hill & Hemmings, 2002). Nous avons mis en évidence que la phosphorylation activatrice d'Akt/PKB (Thr 172) en réponse à la STS est nettement plus faible dans les cellules cybrides mutées que dans les cellules cybrides sauvages. Cette activation différentielle d'Akt entre les deux lignées en réponse à une incubation en présence de STS est certainement une donnée majeure de ce travail puisque ce résultat ouvre des perspectives intéressantes qui viseront à rechercher le rôle éventuel de la voie PI3K/Akt/PKB dans la plus grande sensibilité des cellules cybrides mutées et/ou la plus grande résistance des cellules sauvages. Les mécanismes responsables de cette plus faible activation en réponse à la STS dans les cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial seront également recherchés.

De manière intéressante, Allen et ses collaborateurs ont également montré que l'action anti-apoptotique de l'IGF-1 sur la mortalité de cellules musculaires lisses d'origine vasculaire (VSMC) induite par la STS, passait par une activation d'Akt/PKB capable d'inhiber l'activation de facteurs pro-apoptotiques (Allen et al., 2005). Nous pouvons donc proposer

que la sensibilité accrue de cellules cybrides mutées à l'apoptose induite par la STS pourrait, être due, du moins en partie, à une diminution de l'activité protectrice (anti-apoptotique) d'Akt/PKB dans cette lignée cellulaire. Ajoutons encore, que bien qu'intéressants, ces résultats préliminaires devraient être confirmés par la recherche de la phosphorylation de la Thr308 dans ces conditions. En effet, il a été montré que la phosphorylation de la Thr308 active seulement partiellement Akt/PKB alors que la phosphorylation des deux résidus conduit à l'activation maximale de l'enzyme. De plus la phosphorylation sur la Ser473 ne serait pas le meilleur indicateur de l'activation de l'enzyme, car seule, cette modification ne change pas l'activité de l'enzyme (Alessi et al., 1996). L'inhibition de la voie PI3K/Akt/PKB dans les cellules sauvages par le LY29004 devrait donc sensibiliser les cellules sauvages à l'apoptose induite par la STS.

Le dernier effecteur moléculaire que nous avons étudié est p53. Le rôle de cette protéine est bien décrit dans l'apoptose et reposerait tant sur son activité transcriptionnelle (Zamzami & Kroemer, 2005) que sur son action cytosolique et mitochondriale qui sont indépendantes de sa fonction de facteur de transcription (Vaseva & Moll, 2008). Récemment, il a été identifié comme une protéine capable d'exercer une double activité dans le contrôle de l'autophagie (Levine & Abrams, 2008). Dans le but rechercher si l'activité de p53 est modifiée dans des cellules incubées en présence de STS, sur base des translocations décrites et des effets médiés par p53 ne dépendant pas de son activité transcriptionnelle, nous avons premièrement analysé l'abondance de p53 dans différentes fractions cellulaires. La principale information fournie par cette expérience est que la STS ne semble pas induire de modification de l'abondance et/ou de la distribution de p53 dans des compartiments subcellulaires différents et ce, quelque soit la lignée cellulaire considérée. Ces résultats devraient à l'avenir être confirmés par des marquages en immunocytochimie et des observations en microscopie confocale. Ces résultats devraient également être complétés par une analyse de l'abondance totale de p53 dans des lysats cellulaires totaux pour déterminer si l'abondance totale de la protéine est modifiée ou non dans ces conditions.

Nous avons ensuite dosé l'activité de p53 à l'aide un système rapporteur. À l'aide de cet outil, nous avons observé une diminution de l'activité de p53 dans les cellules incubées en présence de STS. Il s'embles donc que l'apoptose induite en réponse à la staurosporine dans nos deux lignées cellulaires soit indépendante d'un effet positif de l'activité transcriptionnelle de p53 sur l'expression de gènes pro-apoptotiques comme Bax. Il a d'ailleurs été montré au laboratoire que si la protéine Bax subit un changement de localisation depuis le cytosol vers la MME en réponse à la staurosporine, l'abondance de la protéine ne semble pas augmenter. De plus, dans la littérature, on retrouve plusieurs arguments en faveur du fait que la staurosporine et le 7-hydroxystaurosporine (UCN-01), un inhibiteur des PKCs plus spécifique que la staurosporine induisent l'apoptose de manière indépendante de p53 (Byrd et al., 2001) (Husain et al., 1997) (Chen et al., 1999).

Finalement, nous avons recherché une connexion éventuelle entre l'autophagie et l'apoptose dans la mort des cellules cybrides sauvages et mutées induite par la staurosporine.

Nous avons donc tenté de mettre en évidence une éventuelle modification quantitative de la fragmentation de l'ADN génomique induite par la STS dans nos lignées cellulaires incubées en présence ou en absence d'un inhibiteur de l'autophagie comme le 3-MéthylAdénine (3-MA). De manière intéressante, nous avons mis en évidence que le 3-MA seul est capable de doubler la fragmentation de l'ADN dans les cellules sauvages et mutées par rapport à la fragmentation basale observée pour les cellules contrôles. Il semble donc que dans nos lignées cellulaires, l'inhibition de l'autophagie induise une augmentation de la réponse apoptotique. L'autophagie en condition basale aurait donc un rôle protecteur contre l'apoptose spontanée. L'effet du 3-MA sur l'induction de la fragmentation d'ADN génomique est cependant beaucoup plus élevée dans les cellules cybrides mutées. Lorsque nous traitons nos cellules pendant 12 h à la STS en présence de l'inhibiteur de l'autophagie 3-MA, nous remarquons une augmentation de la fragmentation plus forte dans les cellules cybrides mutées incubées en présence de l'inhibiteur autophagique. Mentionnons également que des cellules HeLa, montrent une plus forte réponse apoptotique induite par l'oridonine (extraits de plantes utilisés en médecine chinoise) en présence de 3-MA (Cui et al., 2006). Si les mécanismes par lesquels une inhibition de l'autophagie se traduit par un renforcement de la mort par apoptose ne sont pas encore bien connus, il a cependant été montré dans la littérature que l'inhibiteur de l'autophagie pourrait moduler et augmenter la libération de cytochrome c et l'activation de la caspase-3 dans des cellules HL60 incubées en présence de  $As_2O_3$ , une molécule capable d'induire l'apoptose (Yang et al., 2008). L'influence de l'inhibition de l'autophagie sur l'augmentation de la mort par apoptose par un mécanisme dépendant de la perméabilisation de la MME et l'activation subséquente des caspases a également été montré dans des cellules HeLa répondant à une privation de sérum (Boya et al., 2005). Sous réserve de la confirmation de ces résultats par d'autres marqueurs, il semble qu'une inhibition prolongée de l'autophagie conduise à une augmentation de la réponse apoptotique et ce seulement dans les cellules cybrides mutées alors que cette condition conduit à une diminution légère mais significative de l'activation de la caspase-3 dans ces cellules (Figure 1.23). Ce paradoxe apparent devra être résolu dans le futur mais précisons que la fragmentation de l'ADN génomique dans les cellules cybrides mutées induite par la STS n'est peut-être pas complètement médiée par un processus dépendant de la caspase-3.

L'autophagie aurait donc, dans cette condition, un léger rôle protecteur contre l'apoptose induite par la STS dans des cellules cybrides mutées. Afin de confirmer ces résultats, le silençage de l'expression de gènes codant pour des protéines nécessaires à l'autophagie comme la Becline1 ou Atg5 et les effets de ces « knockdown » sur les marqueurs de mort par apoptose devront être recherchés.

La seconde approche expérimentale que nous n'avons pu réaliser pour des raisons de temps dans le cadre de ce travail mais qui constitue une perspective intéressante à ce travail, sera d'étudier la relation inverse, c'est à dire, d'inhiber l'apoptose et de regarder l'effet sur la réponse autophagique. Pour cela nous inhiberons l'apoptose à l'aide du Z-VAD-fmk (un inhibiteur des pancaspases bien accepté (Wu *et al.*, 2008) et nous caractériserons la réponse autophagique par l'étude de l'accumulation de la protéine LC3-II dans les cellules incubées en présence de STS.

En conclusion, la mise au point de marqueurs autophagiques nous a permis de montrer que l'inducteur apoptotique STS était capable d'induire l'autophagie ainsi qu'une autophagie spécifique des mitochondries (mitophagie) dans nos deux lignées cellulaires. Nous avons également montré que la privation de sérum induit une mitophagie plus importante dans les cellules portant la mutation MERRF. L'induction de cette autophagie par la STS serait probablement liée à l'activation de l'AMPK et à son effet inhibiteur sur la voie de mTOR. Nous avons également montré que la kinase protégeant la cellule de l'apoptose Akt/PKB était activée de manière plus importante dans les cellules sauvages incubées en présence de STS. Ce résultat nous permet d'émettre l'hypothèse selon laquelle les cellules cybrides sauvages seraient mieux protégées contre l'apoptose induite par la STS.

Dans leur ensemble ces résultats constituent des données nouvelles susceptibles de mieux comprendre la sensibilité accrue de cellules présentant un dysfonctionnement mitochondrial aux molécules pro-apoptotiques. Ces recherches devront être étendues à d'autres modèles cellulaires de dysfonctionnement mitochondrial et à d'autres stress pro-apoptotiques pour tenter de généraliser les données obtenues. Ils apportent en tout cas un éclairage nouveau sur le rôle de l'activité mitochondriale dans la sensibilité ou la résistance à l'apoptose induite dans des cellules cancéreuses puisque les cellules utilisées dans ce travail sont issues d'un ostéosarcome humain.

## 5 Bibliographie

- Alessi, D. R., M. Andjelkovic, B. Caudwell, P. Cron, N. Morrice, P. Cohen & B. A. Hemmings, (1996) Mechanism of activation of protein kinase B by insulin and IGF-1. *EMBO J* **15**: 6541-6551.
- Allen, R. T., K. D. Krueger, A. Dhume & D. K. Agrawal, (2005) Sustained Akt/PKB activation and transient attenuation of c-jun N-terminal kinase in the inhibition of apoptosis by IGF-1 in vascular smooth muscle cells. *Apoptosis* **10**: 525-535.
- Andersson, S. G., A. Zomorodipour, J. O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U. C. Alsmark, R. M. Podowski, A. K. Naslund, A. S. Eriksson, H. H. Winkler & C. G. Kurland, (1998) The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature* **396**: 133-140.
- Arsham, A. M. & T. P. Neufeld, (2006) Thinking globally and acting locally with TOR. *Curr Opin Cell Biol* **18**: 589-597.
- Aure, K., G. Fayet, J. P. Leroy, E. Lacene, N. B. Romero & A. Lombes, (2006) Apoptosis in mitochondrial myopathies is linked to mitochondrial proliferation. *Brain* **129**: 1249-1259.
- Baehrecke, E. H., (2005) Autophagy: dual roles in life and death? *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**: 505-510.
- Baines, C. P., R. A. Kaiser, T. Sheiko, W. J. Craigen & J. D. Molkentin, (2007) Voltage-dependent anion channels are dispensable for mitochondrial-dependent cell death. *Nat Cell Biol* **9**: 550-555.
- Bampton, E. T., C. G. Goemans, D. Niranjana, N. Mizushima & A. M. Tolkovsky, (2005) The dynamics of autophagy visualized in live cells: from autophagosome formation to fusion with endo/lysosomes. *Autophagy* **1**: 23-36.
- Barkett, M. & T. D. Gilmore, (1999) Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene* **18**: 6910-6924.
- Biswas, G., O. A. Adebajo, B. D. Freedman, H. K. Anandatheerthavarada, C. Vijayasarathy, M. Zaidi, M. Kotlikoff & N. G. Avadhani, (1999) Retrograde Ca<sup>2+</sup> signaling in C2C12 skeletal myocytes in response to mitochondrial genetic and metabolic stress: a novel mode of inter-organelle crosstalk. *EMBO J* **18**: 522-533.
- Bohr, V. A., T. Stevnsner & N. C. de Souza-Pinto, (2002) Mitochondrial DNA repair of oxidative damage in mammalian cells. *Gene* **286**: 127-134.
- Boya, P., R. A. Gonzalez-Polo, N. Casares, J. L. Perfettini, P. Dessen, N. Larochette, D. Metivier, D. Meley, S. Souquere, T. Yoshimori, G. Pierron, P. Codogno & G. Kroemer, (2005) Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* **25**: 1025-1040.
- Bradford, M. M., (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254.
- Brini, M., (2003) Ca<sup>2+</sup> signalling in mitochondria: mechanism and role in physiology and pathology. *Cell Calcium* **34**: 399-405.
- Brookes, P. S., Y. Yoon, J. L. Robotham, M. W. Anders & S. S. Sheu, (2004) Calcium, ATP, and ROS: a mitochondrial love-hate triangle. *Am J Physiol Cell Physiol* **287**: C817-833.
- Buchet, K. & C. Godinot, (1998) Functional F1-ATPase essential in maintaining growth and membrane potential of human mitochondrial DNA-depleted rho degrees cells. *J Biol Chem* **273**: 22983-22989.

- Byrd, J. C., C. Shinn, C. R. Willis, I. W. Flinn, T. Lehman, E. Sausville, D. Lucas & M. R. Grever, (2001) UCN-01 induces cytotoxicity toward human CLL cells through a p53-independent mechanism. *Exp Hematol* **29**: 703-708.
- Canu, N., R. Tufi, A. L. Serafino, G. Amadoro, M. T. Ciotti & P. Calissano, (2005) Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* **92**: 1228-1242.
- Cao, C., S. Lu, R. Kivlin, B. Wallin, E. Card, A. Bagdasarian, T. Tamakloe, W. M. Chu, K. L. Guan & Y. Wan, (2008) AMP-activated protein kinase contributes to UV- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced apoptosis in human skin keratinocytes. *J Biol Chem* **283**: 28897-28908.
- Capano, M. & M. Crompton, (2006) Bax translocates to mitochondria of heart cells during simulated ischaemia: involvement of AMP-activated and p38 mitogen-activated protein kinases. *Biochem J* **395**: 57-64.
- Castedo, M., K. F. Ferri & G. Kroemer, (2002) Mammalian target of rapamycin (mTOR): pro- and anti-apoptotic. *Cell Death Differ* **9**: 99-100.
- Chan, D. C., (2006a) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* **125**: 1241-1252.
- Chan, D. C., (2006b) Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol* **22**: 79-99.
- Chen, C. Y., J. D. Oliner, Q. Zhan, A. J. Fornace, Jr., B. Vogelstein & M. B. Kastan, (1994) Interactions between p53 and MDM2 in a mammalian cell cycle checkpoint pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**: 2684-2688.
- Chen, H., S. A. Detmer, A. J. Ewald, E. E. Griffin, S. E. Fraser & D. C. Chan, (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* **160**: 189-200.
- Chen, X., M. Lowe & K. Keyomarsi, (1999) UCN-01-mediated G1 arrest in normal but not tumor breast cells is pRb-dependent and p53-independent. *Oncogene* **18**: 5691-5702.
- Chinnery, P. F., N. Howell, R. N. Lightowlers & D. M. Turnbull, (1998) MELAS and MERRF. The relationship between maternal mutation load and the frequency of clinically affected offspring. *Brain* **121 ( Pt 10)**: 1889-1894.
- Chipuk, J. E., T. Kuwana, L. Bouchier-Hayes, N. M. Droin, D. D. Newmeyer, M. Schuler & D. R. Green, (2004) Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* **303**: 1010-1014.
- Chomyn, A., (1998) The myoclonic epilepsy and ragged-red fiber mutation provides new insights into human mitochondrial function and genetics. *Am J Hum Genet* **62**: 745-751.
- Chomyn, A., G. Meola, N. Bresolin, S. T. Lai, G. Scarlato & G. Attardi, (1991) In vitro genetic transfer of protein synthesis and respiration defects to mitochondrial DNA-less cells with myopathy-patient mitochondria. *Mol Cell Biol* **11**: 2236-2244.
- Crichton, D., S. Wilkinson, J. O'Prey, N. Syed, P. Smith, P. R. Harrison, M. Gasco, O. Garrone, T. Crook & K. M. Ryan, (2006) DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* **126**: 121-134.
- Cui, Q., S. Tashiro, S. Onodera & T. Ikejima, (2006) Augmentation of oridonin-induced apoptosis observed with reduced autophagy. *J Pharmacol Sci* **101**: 230-239.
- Datta, S. R., A. Brunet & M. E. Greenberg, (1999) Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev* **13**: 2905-2927.
- Degterev, A. & J. Yuan, (2008) Expansion and evolution of cell death programmes. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**: 378-390.
- Delettre, C., G. Lenaers, J. M. Griffoin, N. Gigarel, C. Lorenzo, P. Belenguer, L. Pelloquin, J. Grosgeorge, C. Turc-Carel, E. Perret, C. Astarie-Dequeker, L. Lasquelléc, B. Arnaud, B. Ducommun, J. Kaplan & C. P. Hamel, (2000) Nuclear gene OPA1, encoding a

- mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* **26**: 207-210.
- Detmer, S. A. & D. C. Chan, (2007) Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 870-879.
- DiMauro, S., (2004) Mitochondrial diseases. *Biochim Biophys Acta* **1658**: 80-88.
- Enriquez, J. A., A. Chomyn & G. Attardi, (1995) MtDNA mutation in MERRF syndrome causes defective aminoacylation of tRNA(Lys) and premature translation termination. *Nat Genet* **10**: 47-55.
- Eskelinen, E. L., (2008) New insights into the mechanisms of macroautophagy in mammalian cells. *Int Rev Cell Mol Biol* **266**: 207-247.
- Espert, L., M. Denizot, M. Grimaldi, V. Robert-Hebmann, B. Gay, M. Varbanov, P. Codogno & M. Biard-Piechaczyk, (2006) Autophagy is involved in T cell death after binding of HIV-1 envelope proteins to CXCR4. *J Clin Invest* **116**: 2161-2172.
- Feng, Z., W. Hu, E. de Stanchina, A. K. Teresky, S. Jin, S. Lowe & A. J. Levine, (2007) The regulation of AMPK beta1, TSC2, and PTEN expression by p53: stress, cell and tissue specificity, and the role of these gene products in modulating the IGF-1-AKT-mTOR pathways. *Cancer Res* **67**: 3043-3053.
- Feng, Z., H. Zhang, A. J. Levine & S. Jin, (2005) The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 8204-8209.
- Fenton, W. A., (1995) Mitochondrial protein transport--a system in search of mutations. *Am J Hum Genet* **57**: 235-238.
- Ferri, K. F. & G. Kroemer, (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* **3**: E255-263.
- Gollapudi, L. & K. E. Neet, (1997) Different mechanisms for inhibition of cell proliferation via cell cycle proteins in PC12 cells by nerve growth factor and staurosporine. *J Neurosci Res* **49**: 461-474.
- Gonzalez-Polo, R. A., P. Boya, A. L. Pauleau, A. Jalil, N. Larochette, S. Souquere, E. L. Eskelinen, G. Pierron, P. Saftig & G. Kroemer, (2005) The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci* **118**: 3091-3102.
- Gozuacik, D. & A. Kimchi, (2007) Autophagy and cell death. *Curr Top Dev Biol* **78**: 217-245.
- Gross, A., J. M. McDonnell & S. J. Korsmeyer, (1999) BCL-2 family members and the mitochondria in apoptosis. *Genes Dev* **13**: 1899-1911.
- Grossman, S. R., M. Perez, A. L. Kung, M. Joseph, C. Mansur, Z. X. Xiao, S. Kumar, P. M. Howley & D. M. Livingston, (1998) p300/MDM2 complexes participate in MDM2-mediated p53 degradation. *Mol Cell* **2**: 405-415.
- Gu, Y., C. Wang & A. Cohen, (2004) Effect of IGF-1 on the balance between autophagy of dysfunctional mitochondria and apoptosis. *FEBS Lett* **577**: 357-360.
- Gunter, T. E., D. I. Yule, K. K. Gunter, R. A. Eliseev & J. D. Salter, (2004) Calcium and mitochondria. *FEBS Lett* **567**: 96-102.
- Hadad, S. M., S. Fleming & A. M. Thompson, (2008) Targeting AMPK: a new therapeutic opportunity in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* **67**: 1-7.
- Hill, M. M. & B. A. Hemmings, (2002) Inhibition of protein kinase B/Akt. implications for cancer therapy. *Pharmacol Ther* **93**: 243-251.
- Hoyer-Hansen, M. & M. Jaattela, (2007) AMP-activated protein kinase: a universal regulator of autophagy? *Autophagy* **3**: 381-383.
- Husain, A., X. J. Yan, N. Rosales, C. Aghajanian, G. K. Schwartz & D. R. Spriggs, (1997) UCN-01 in ovary cancer cells: effective as a single agent and in combination with cis-diamminedichloroplatinum(II) independent of p53 status. *Clin Cancer Res* **3**: 2089-2097.

- Inoki, K. & K. L. Guan, (2006) Complexity of the TOR signaling network. *Trends Cell Biol* **16**: 206-212.
- James, A. M., P. W. Sheard, Y. H. Wei & M. P. Murphy, (1999) Decreased ATP synthesis is phenotypically expressed during increased energy demand in fibroblasts containing mitochondrial tRNA mutations. *Eur J Biochem* **259**: 462-469.
- James, A. M., Y. H. Wei, C. Y. Pang & M. P. Murphy, (1996) Altered mitochondrial function in fibroblasts containing MELAS or MERRF mitochondrial DNA mutations. *Biochem J* **318 ( Pt 2)**: 401-407.
- James, D. I., P. A. Parone, Y. Mattenberger & J. C. Martinou, (2003) hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* **278**: 36373-36379.
- Jefferies, H. B., S. Fumagalli, P. B. Dennis, C. Reinhard, R. B. Pearson & G. Thomas, (1997) Rapamycin suppresses 5'TOP mRNA translation through inhibition of p70s6k. *EMBO J* **16**: 3693-3704.
- Jin, Z. & W. S. El-Deiry, (2005) Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther* **4**: 139-163.
- Kakkar, P. & B. K. Singh, (2007) Mitochondria: a hub of redox activities and cellular distress control. *Mol Cell Biochem* **305**: 235-253.
- Kim, D. H., D. D. Sarbassov, S. M. Ali, J. E. King, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst & D. M. Sabatini, (2002) mTOR interacts with raptor to form a nutrient-sensitive complex that signals to the cell growth machinery. *Cell* **110**: 163-175.
- Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez & J. J. Lemasters, (2007) Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys* **462**: 245-253.
- King, M. P. & G. Attardi, (1989) Human cells lacking mtDNA: repopulation with exogenous mitochondria by complementation. *Science* **246**: 500-503.
- Klionsky, D. J., H. Abeliovich, P. Agostinis, D. K. Agrawal, G. Aliev, D. S. Askew, M. Baba, E. H. Baehrecke, B. A. Bahr, A. Ballabio, B. A. Bamber, D. C. Bassham, E. Bergamini, X. Bi, M. Biard-Piechaczyk, J. S. Blum, D. E. Bredesen, J. L. Brodsky, J. H. Brumell, U. T. Brunk, W. Bursch, N. Camougrand, E. Cebollero, F. Cecconi, Y. Chen, L. S. Chin, A. Choi, C. T. Chu, J. Chung, P. G. Clarke, R. S. Clark, S. G. Clarke, C. Clave, J. L. Cleveland, P. Codogno, M. I. Colombo, A. Coto-Montes, J. M. Cregg, A. M. Cuervo, J. Debnath, F. Demarchi, P. B. Dennis, P. A. Dennis, V. Deretic, R. J. Devenish, F. Di Sano, J. F. Dice, M. Difulgia, S. Dinesh-Kumar, C. W. Distelhorst, M. Djavaheri-Mergny, F. C. Dorsey, W. Droge, M. Dron, W. A. Dunn, Jr., M. Duszenko, N. T. Eissa, Z. Elazar, A. Esclatine, E. L. Eskelinen, L. Fesus, K. D. Finley, J. M. Fuentes, J. Fueyo, K. Fujisaki, B. Galliot, F. B. Gao, D. A. Gewirtz, S. B. Gibson, A. Gohla, A. L. Goldberg, R. Gonzalez, C. Gonzalez-Estevez, S. Gorski, R. A. Gottlieb, D. Haussinger, Y. W. He, K. Heidenreich, J. A. Hill, M. Hoyer-Hansen, X. Hu, W. P. Huang, A. Iwasaki, M. Jaattela, W. T. Jackson, X. Jiang, S. Jin, T. Johansen, J. U. Jung, M. Kadowaki, C. Kang, A. Kelekar, D. H. Kessel, J. A. Kiel, H. P. Kim, A. Kimchi, T. J. Kinsella, K. Kiselyov, K. Kitamoto, E. Knecht, et al., (2008) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **4**: 151-175.
- Kops, G. J. & B. M. Burgering, (2000) Forkhead transcription factors are targets of signalling by the proto-oncogene PKB (C-AKT). *J Anat* **197 Pt 4**: 571-574.
- Kroemer, G., L. Galluzzi & C. Brenner, (2007) Mitochondrial membrane permeabilization in cell death. *Physiol Rev* **87**: 99-163.
- Kuwana, T., M. R. Mackey, G. Perkins, M. H. Ellisman, M. Latterich, R. Schneider, D. R. Green & D. D. Newmeyer, (2002) Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* **111**: 331-342.



- Lee, W., H. I. Choi, M. J. Kim & S. Y. Park, (2008) Depletion of mitochondrial DNA up-regulates the expression of MDR1 gene via an increase in mRNA stability. *Exp Mol Med* **40**: 109-117.
- Levine, B. & J. Abrams, (2008) p53: The Janus of autophagy? *Nat Cell Biol* **10**: 637-639.
- Levine, B. & J. Yuan, (2005) Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* **115**: 2679-2688.
- Liu, C. Y., C. F. Lee, C. H. Hong & Y. H. Wei, (2004) Mitochondrial DNA mutation and depletion increase the susceptibility of human cells to apoptosis. *Ann N Y Acad Sci* **1011**: 133-145.
- Lozano, J., S. Menendez, A. Morales, D. Ehleiter, W. C. Liao, R. Wagman, A. Haimovitz-Friedman, Z. Fuks & R. Kolesnick, (2001) Cell autonomous apoptosis defects in acid sphingomyelinase knockout fibroblasts. *J Biol Chem* **276**: 442-448.
- Maiuri, M. C., G. Le Toumelin, A. Criollo, J. C. Rain, F. Gautier, P. Juin, E. Tasdemir, G. Pierron, K. Troulinaki, N. Tavernarakis, J. A. Hickman, O. Geneste & G. Kroemer, (2007a) Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J* **26**: 2527-2539.
- Maiuri, M. C., E. Zalckvar, A. Kimchi & G. Kroemer, (2007b) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **8**: 741-752.
- Manning, B. D. & L. C. Cantley, (2007) AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell* **129**: 1261-1274.
- Marchenko, N. D., A. Zaika & U. M. Moll, (2000) Death signal-induced localization of p53 protein to mitochondria. A potential role in apoptotic signaling. *J Biol Chem* **275**: 16202-16212.
- Martinet, W., G. R. De Meyer, L. Andries, A. G. Herman & M. M. Kockx, (2006) In situ detection of starvation-induced autophagy. *J Histochem Cytochem* **54**: 85-96.
- Martinez-Diez, M., G. Santamaria, A. D. Ortega & J. M. Cuezva, (2006) Biogenesis and dynamics of mitochondria during the cell cycle: significance of 3'UTRs. *PLoS ONE* **1**: e107.
- Mijaljica, D., M. Prescott & R. J. Devenish, (2006) Endoplasmic reticulum and Golgi complex: Contributions to, and turnover by, autophagy. *Traffic* **7**: 1590-1595.
- Mijaljica, D., M. Prescott & R. J. Devenish, (2007) Different fates of mitochondria: alternative ways for degradation? *Autophagy* **3**: 4-9.
- Mirabella, M., S. Di Giovanni, G. Silvestri, P. Tonali & S. Servidei, (2000) Apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies with mitochondrial DNA mutations: a potential pathogenic mechanism. *Brain* **123** ( Pt 1): 93-104.
- Mizushima, N. & T. Yoshimori, (2007) How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy* **3**: 542-545.
- Mortimore, G. E. & C. M. Schworer, (1977) Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver. *Nature* **270**: 174-176.
- Narendra, D., A. Tanaka, D. F. Suen & R. J. Youle, (2008) Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol* **183**: 795-803.
- Nave, B. T., M. Ouwens, D. J. Withers, D. R. Alessi & P. R. Shepherd, (1999) Mammalian target of rapamycin is a direct target for protein kinase B: identification of a convergence point for opposing effects of insulin and amino-acid deficiency on protein translation. *Biochem J* **344** Pt 2: 427-431.
- Ohizumi, Y., (1997) Application of physiologically active substances isolated from natural resources to pharmacological studies. *Jpn J Pharmacol* **73**: 263-289.
- Olsson, A., C. Manzl, A. Strasser & A. Villunger, (2007) How important are post-translational modifications in p53 for selectivity in target-gene transcription and tumour suppression? *Cell Death Differ* **14**: 1561-1575.

- Orrenius, S., (2007) Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev* **39**: 443-455.
- Park, S. Y., G. H. Choi, H. I. Choi, J. Ryu, C. Y. Jung & W. Lee, (2005) Depletion of mitochondrial DNA causes impaired glucose utilization and insulin resistance in L6 GLUT4myc myocytes. *J Biol Chem* **280**: 9855-9864.
- Pattingre, S., L. Espert, M. Biard-Piechaczyk & P. Codogno, (2008) Regulation of macroautophagy by mTOR and Beclin 1 complexes. *Biochimie* **90**: 313-323.
- Pattingre, S. & B. Levine, (2006) Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res* **66**: 2885-2888.
- Peterson, R. T., P. A. Beal, M. J. Comb & S. L. Schreiber, (2000) FKBP12-rapamycin-associated protein (FRAP) autophosphorylates at serine 2481 under translationally repressive conditions. *J Biol Chem* **275**: 7416-7423.
- Pietsch, E. C., E. Perchiniak, A. A. Canutescu, G. Wang, R. L. Dunbrack & M. E. Murphy, (2008a) Oligomerization of BAK by p53 utilizes conserved residues of the p53 DNA binding domain. *J Biol Chem* **283**: 21294-21304.
- Pietsch, E. C., S. M. Sykes, S. B. McMahon & M. E. Murphy, (2008b) The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* **27**: 6507-6521.
- Pugazhenthii, S., A. Nesterova, C. Sable, K. A. Heidenreich, L. M. Boxer, L. E. Heasley & J. E. Reusch, (2000) Akt/protein kinase B up-regulates Bcl-2 expression through cAMP-response element-binding protein. *J Biol Chem* **275**: 10761-10766.
- Pyo, J. O., M. H. Jang, Y. K. Kwon, H. J. Lee, J. I. Jun, H. N. Woo, D. H. Cho, B. Choi, H. Lee, J. H. Kim, N. Mizushima, Y. Oshumi & Y. K. Jung, (2005) Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem* **280**: 20722-20729.
- Raymond, S. & L. Weintraub, (1959) Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis. *Science* **130**: 711.
- Rizzuto, R. & T. Pozzan, (2006) Microdomains of intracellular Ca<sup>2+</sup>: molecular determinants and functional consequences. *Physiol Rev* **86**: 369-408.
- Rodriguez-Enriquez, S., I. Kim, R. T. Currin & J. J. Lemasters, (2006) Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes. *Autophagy* **2**: 39-46.
- Sarbassov, D. D., S. M. Ali, D. H. Kim, D. A. Guertin, R. R. Latek, H. Erdjument-Bromage, P. Tempst & D. M. Sabatini, (2004) Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. *Curr Biol* **14**: 1296-1302.
- Schapira, A. H., (2006) Mitochondrial disease. *Lancet* **368**: 70-82.
- Schatz, G., (1996) The protein import system of mitochondria. *J Biol Chem* **271**: 31763-31766.
- Scherz-Shouval, R., E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil & Z. Elazar, (2007) Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO J* **26**: 1749-1760.
- Schmiedel, J., S. Jackson, J. Schafer & H. Reichmann, (2003) Mitochondrial cytopathies. *J Neurol* **250**: 267-277.
- Sciacco, M., G. Fagiolari, C. Lamperti, S. Messina, P. Bazzi, L. Napoli, L. Chiveri, A. Prella, G. P. Comi, N. Bresolin, G. Scarlato & M. Moggio, (2001) Lack of apoptosis in mitochondrial encephalomyopathies. *Neurology* **56**: 1070-1074.
- Seglen, P. O. & P. B. Gordon, (1982) 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**: 1889-1892.
- Servidei, S., (2004) Mitochondrial encephalomyopathies: gene mutation. *Neuromuscul Disord* **14**: 107-116.

- Shao, R. G., T. Shimizu & Y. Pommier, (1997) 7-Hydroxystaurosporine (UCN-01) induces apoptosis in human colon carcinoma and leukemia cells independently of p53. *Exp Cell Res* **234**: 388-397.
- Shintani, T. & D. J. Klionsky, (2004) Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science* **306**: 990-995.
- Smirnova, E., L. Griparic, D. L. Shurland & A. M. van der Bliek, (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **12**: 2245-2256.
- Song, G., G. Ouyang & S. Bao, (2005) The activation of Akt/PKB signaling pathway and cell survival. *J Cell Mol Med* **9**: 59-71.
- Stefanelli, C., I. Stanic, F. Bonavita, F. Flamigni, C. Pignatti, C. Guarnieri & C. M. Caldarera, (1998) Inhibition of glucocorticoid-induced apoptosis with 5-aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside, a cell-permeable activator of AMP-activated protein kinase. *Biochem Biophys Res Commun* **243**: 821-826.
- Susin, S. A., E. Daugas, L. Ravagnan, K. Samejima, N. Zamzami, M. Loeffler, P. Costantini, K. F. Ferri, T. Irinopoulou, M. C. Prevost, G. Brothers, T. W. Mak, J. Penninger, W. C. Earnshaw & G. Kroemer, (2000) Two distinct pathways leading to nuclear apoptosis. *J Exp Med* **192**: 571-580.
- Takeuchi, H., Y. Kondo, K. Fujiwara, T. Kanzawa, H. Aoki, G. B. Mills & S. Kondo, (2005) Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Res* **65**: 3336-3346.
- Tasdemir, E., M. C. Maiuri, L. Galluzzi, I. Vitale, M. Djavaheri-Mergny, M. D'Amelio, A. Criollo, E. Morselli, C. Zhu, F. Harper, U. Nannmark, C. Samara, P. Pinton, J. M. Vicencio, R. Carnuccio, U. M. Moll, F. Madeo, P. Paterlini-Brechot, R. Rizzuto, G. Szabadkai, G. Pierron, K. Blomgren, N. Tavernarakis, P. Codogno, F. Cecconi & G. Kroemer, (2008) Regulation of autophagy by cytoplasmic p53. *Nat Cell Biol* **10**: 676-687.
- Tee, A. R. & C. G. Proud, (2001) Staurosporine inhibits phosphorylation of translational regulators linked to mTOR. *Cell Death Differ* **8**: 841-849.
- Uddin, S., A. R. Hussain, K. A. Al-Hussein, P. S. Manogaran, A. Wickrema, M. I. Gutierrez & K. G. Bhatia, (2005) Inhibition of phosphatidylinositol 3'-kinase/AKT signaling promotes apoptosis of primary effusion lymphoma cells. *Clin Cancer Res* **11**: 3102-3108.
- Umaki, Y., T. Mitsui, I. Endo, M. Akaike & T. Matsumoto, (2002) Apoptosis-related changes in skeletal muscles of patients with mitochondrial diseases. *Acta Neuropathol* **103**: 163-170.
- Vaseva, A. V. & U. M. Moll, (2008) The mitochondrial p53 pathway. *Biochim Biophys Acta*.
- Vergani, L., M. Floreani, A. Russell, M. Ceccon, E. Napoli, A. Cabrelle, L. Valente, F. Bragantini, B. Leger & F. Dabbeni-Sala, (2004) Antioxidant defences and homeostasis of reactive oxygen species in different human mitochondrial DNA-depleted cell lines. *Eur J Biochem* **271**: 3646-3656.
- Wallace, D. C., (1999) Mitochondrial diseases in man and mouse. *Science* **283**: 1482-1488.
- Wallace, D. C., X. X. Zheng, M. T. Lott, J. M. Shoffner, J. A. Hodge, R. I. Kelley, C. M. Epstein & L. C. Hopkins, (1988) Familial mitochondrial encephalomyopathy (MERRF): genetic, pathophysiological, and biochemical characterization of a mitochondrial DNA disease. *Cell* **55**: 601-610.
- Wang, J. M., J. R. Chao, W. Chen, M. L. Kuo, J. J. Yen & H. F. Yang-Yen, (1999) The antiapoptotic gene mcl-1 is up-regulated by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt

- signaling pathway through a transcription factor complex containing CREB. *Mol Cell Biol* **19**: 6195-6206.
- Wang, Y., Y. Michikawa, C. Mallidis, Y. Bai, L. Woodhouse, K. E. Yarasheski, C. A. Miller, V. Askanas, W. K. Engel, S. Bhasin & G. Attardi, (2001) Muscle-specific mutations accumulate with aging in critical human mtDNA control sites for replication. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**: 4022-4027.
- Wellington, C. L., L. M. Ellerby, A. S. Hackam, R. L. Margolis, M. A. Trifiro, R. Singaraja, K. McCutcheon, G. S. Salvesen, S. S. Propp, M. Bromm, K. J. Rowland, T. Zhang, D. Rasper, S. Roy, N. Thornberry, L. Pinsky, A. Kakizuka, C. A. Ross, D. W. Nicholson, D. E. Bredesen & M. R. Hayden, (1998) Caspase cleavage of gene products associated with triplet expansion disorders generates truncated fragments containing the polyglutamine tract. *J Biol Chem* **273**: 9158-9167.
- Wilson, F. H., A. Hariri, A. Farhi, H. Zhao, K. F. Petersen, H. R. Toka, C. Nelson-Williams, K. M. Raja, M. Kashgarian, G. I. Shulman, S. J. Scheinman & R. P. Lifton, (2004) A cluster of metabolic defects caused by mutation in a mitochondrial tRNA. *Science* **306**: 1190-1194.
- Wu, Y. T., H. L. Tan, Q. Huang, Y. S. Kim, N. Pan, W. Y. Ong, Z. G. Liu, C. N. Ong & H. M. Shen, (2008) Autophagy plays a protective role during zVAD-induced necrotic cell death. *Autophagy* **4**: 457-466.
- Yamamoto, A., Y. Tagawa, T. Yoshimori, Y. Moriyama, R. Masaki & Y. Tashiro, (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.
- Yang, Q. & K. L. Guan, (2007) Expanding mTOR signaling. *Cell Res* **17**: 666-681.
- Yang, Y. P., Z. Q. Liang, B. Gao, Y. L. Jia & Z. H. Qin, (2008) Dynamic effects of autophagy on arsenic trioxide-induced death of human leukemia cell line HL60 cells. *Acta Pharmacol Sin* **29**: 123-134.
- Yang, Y. P., Z. Q. Liang, Z. L. Gu & Z. H. Qin, (2005) Molecular mechanism and regulation of autophagy. *Acta Pharmacol Sin* **26**: 1421-1434.
- Yao, R. & G. M. Cooper, (1995) Requirement for phosphatidylinositol-3 kinase in the prevention of apoptosis by nerve growth factor. *Science* **267**: 2003-2006.
- Yasukawa, T., T. Suzuki, N. Ishii, S. Ohta & K. Watanabe, (2001) Wobble modification defect in tRNA disturbs codon-anticodon interaction in a mitochondrial disease. *EMBO J* **20**: 4794-4802.
- Yorimitsu, T. & D. J. Klionsky, (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* **12 Suppl 2**: 1542-1552.
- Yousefi, S., R. Perozzo, I. Schmid, A. Ziemiecki, T. Schaffner, L. Scapozza, T. Brunner & H. U. Simon, (2006) Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis. *Nat Cell Biol* **8**: 1124-1132.
- Zamzami, N. & G. Kroemer, (2005) p53 in apoptosis control: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* **331**: 685-687.
- Zheng, J. Y., Y. C. Tsai, P. Kadimcherla, R. Zhang, J. Shi, G. A. Oyler & N. N. Boustany, (2008) The C-terminal transmembrane domain of Bcl-xL mediates changes in mitochondrial morphology. *Biophys J* **94**: 286-297.