

## THESIS / THÈSE

### MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

#### Etude de la macroautophagie dans des fibroblastes de patients atteints d'une maladie de surcharge lysosomale

Debuisson, Delphine

*Award date:*  
2010

*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.

# 1. Introduction

## 1.1. Les lysosomes

### 1.1.1. Caractéristiques générales

Identifiés en 1955 par le biochimiste belge Christian de Duve, les lysosomes constituent le principal compartiment de dégradation chez les eucaryotes. C'est un organe intracellulaire d'environ 0,5  $\mu\text{m}$  de diamètre, délimité par une membrane qui est normalement imperméable aux macromolécules biologiques. À l'intérieur se trouve une variété d'enzymes digestives appelées « hydrolases lysosomales » qui sont capables de digérer la plupart des macromolécules biologiques. Celles-ci peuvent être d'origine extracellulaire (via les voies d'endocytose et de phagocytose) ou d'origine intracellulaire (via l'autophagie). Pour fonctionner correctement, ces enzymes digestives requièrent un environnement acide (pH 4,5 – 5) qui est obtenu grâce à l'action des pompes V- $\text{H}^+$ -ATPases (*Vacuolar  $\text{H}^+$ -ATPase*) (**Fig.1.1**). Dès lors, si elles se retrouvent dans le cytoplasme suite à la perméabilisation de la membrane, leur capacité hydrolytique serait réduite car elles ne seraient pas à leur pH optimum. De plus, la face luminale des lysosomes est recouverte d'une couche d'oligosaccharides qui non seulement retient les hydrolases à l'intérieur mais aussi protège le lysosome d'une auto-digestion (de Duve and Wattiaux, 1966; Luzio et al., 2007; Saftig and Klumperman, 2009).

Toutefois, les lysosomes ne sont pas réduits à la seule fonction de dégradation proprement dite, ils interviennent aussi dans beaucoup de processus physiologiques comme par exemple, le maintien de l'intégrité de la membrane plasmique. En effet, ils sont capables de fusionner avec la membrane plasmique en réponse à une augmentation de la concentration cytosolique en  $\text{Ca}^{++}$ . Celle-ci provoque une exocytose des lysosomes qui permet un apport de membranes afin de réparer la membrane plasmique endommagée (Luzio et al., 2007).

En ce qui concerne leur morphologie, ils sont de forme et de taille variables. En effet, ils peuvent être sphériques ou avoir des formes irrégulières, cela en fonction de leur contenu, du type cellulaire ou de leur état physiologique. De plus, les lysosomes ont été identifiés en microscopie électronique à transmission comme des corps denses aux électrons (**Fig.1.2**). Leur opacité varie aussi en fonction de la nature de leur contenu et du type cellulaire. Les lysosomes sont souvent trouvés à proximité du noyau, près du centre organisateur des microtubules.

Deux classes de protéines sont essentielles pour le fonctionnement des lysosomes : les hydrolases solubles et les protéines membranaires intégrales (**Fig.1.1**).

À l'heure actuelle, on dénombre chez les mammifères, environ 50 à 60 hydrolases solubles dont des lipases, des glycosidases, des protéases, des sulfatases et des nucléases. Les produits de dégradation peuvent ensuite traverser la membrane lysosomale via des transporteurs pour aller dans le cytoplasme et alimenter la synthèse de nouvelles molécules.

Les protéines membranaires sont moins nombreuses, environ 25 sont connues à ce jour mais d'autres restent encore à identifier. Les glycoprotéines LAMP-1/2 « *lysosome-associated membrane protein 1/2* » et LIMP-1/2 « *lysosomal integral membrane protein 1/2* » représentent 50 % de la totalité des protéines membranaires des lysosomes. Les protéines LAMP-1 et LAMP-2 contiennent un grand domaine luminal fortement glycosylé, un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique C-terminale. Il existe trois isoformes de

LAMP-2 : LAMP-2A, B et C qui présentent des variations de la séquence en acides aminés au niveau de leur domaine transmembranaire et de leur queue cytoplasmique. Comme les protéines LAMPs, les protéines LIMP-1 et LIMP-2 présentent un grand domaine luminal. Cependant, elles possèdent, respectivement, 4 et 2 domaines transmembranaires au lieu d'un seul et, de ce fait, les extrémités N- et C-terminales des deux protéines sont situées dans le cytoplasme (Eskelinen et al., 2003). Toutes ces protéines renferment dans leur queue cytoplasmique C-terminale, un motif nécessaire pour leur adressage vers les lysosomes. Sur base de leur abondance et de leur haut degré de glycosylation, on a longtemps considéré que le principal rôle des protéines LAMPs et LIMPs était de protéger les membranes contre l'action des hydrolases lysosomales. À l'heure actuelle, il est de plus en plus évident que les protéines LAMP-2 et LIMPs remplissent d'autres fonctions, notamment la biogenèse des lysosomes, la maturation des phagolysosomes et l'importation des protéines à partir du cytosol (Saftig and Klumperman, 2009).

### **1.1.2. Transport des protéines lysosomales**

Les protéines lysosomales solubles sont synthétisées dans le cytoplasme et sont transloquées dans le réticulum endoplasmique rugueux (RER) où ont lieu les réactions de N-glycosylation. Elles passent ensuite à travers l'appareil de Golgi où les chaînes oligosaccharidiques subissent des remaniements. Enfin, elles sont envoyées dans le compartiment endo-lysosomal où, certaines protéines doivent encore subir des modifications posttraductionnelles (par exemple des clivages protéolytiques) pour être complètement actives. L'envoi des hydrolases vers le compartiment endo-lysosomal se fait principalement de manière directe mais peut suivre également une voie indirecte.

Dans le premier cas, les précurseurs des hydrolases lysosomales acquièrent un signal de reconnaissance, un mannose 6-phosphate (M6P) qui est reconnu par un des deux récepteurs au mannose 6-phosphate (les M6PR cation-dépendants et cation-indépendants) au niveau du réseau trans-Golgien (TGN). L'acquisition de l'étiquette M6P permet de distinguer les glycoprotéines destinées aux lysosomes, des glycoprotéines destinées à la sécrétion. Dans le TGN, des protéines adaptatrices, les protéines AP-1 « *adaptor protein* » et/ou GGA « *Golgi-associated- $\gamma$ -adaptin-related ADP-ribosylation-factor-binding proteins* » reconnaissent des motifs d'adressage aux lysosomes situés dans la queue cytoplasmique de ces récepteurs et recrutent des molécules de clathrine afin d'assurer le transport vésiculaire des M6PR et de leurs ligands vers les compartiments endosomaux (**Fig.1.3**) (Ghosh et al., 2003). L'environnement acide des endosomes permet la dissociation des enzymes de leurs récepteurs. Les hydrolases libérées dans la lumière des endosomes continuent leur progression vers les lysosomes tandis que les M6PR sont recyclés vers le TGN.

Dans la voie indirecte, les hydrolases lysosomales suivent la voie sécrétoire vers la membrane plasmique et après avoir été sécrétées, elles sont reprises par endocytose grâce aux M6PR cation-indépendants présents à la surface cellulaire (Saftig and Klumperman, 2009).

Par ailleurs, il existe plusieurs transports indépendants des récepteurs au mannose 6-phosphate. Par exemple, il a été montré que la sortiline, un récepteur membranaire de type I possédant dans son domaine cytoplasmique C-terminal plusieurs séquences potentielles d'adressage aux lysosomes, interagissait avec GGA2 et participait au transport de la prosaposine, de la  $G_{M2}AP$  (deux activateurs de l'hydrolyse des glycosphingolipides) et de la sphingomyélinase acide (Lefrancois et al., 2003; Ni et al., 2006). Enfin, le groupe de Saftig a récemment démontré que la protéine LIMP-2 était impliquée dans le transport de la bêta-glucocérébrosidase ( $\beta GC$ ) (Reczek et al., 2007).

Alors que plusieurs voies de transport ont été découvertes pour les protéines lysosomales solubles, peu de choses sont connues concernant le transport des protéines lysosomales membranaires (Saftig and Klumperman, 2009). On sait que LAMP-1, LAMP-2 et LIMP-I contiennent dans leur courte extrémité carboxy-terminale, un motif tyrosine permettant leur ciblage vers les lysosomes. Ce motif est de type G-Y-X-X- $\Phi$ , où X peut être n'importe quel acide aminé alors que  $\Phi$  correspond à Ile dans LAMP-1, à Phe, Leu ou Val dans les différentes formes de LAMP-2 et à M pour LIMP-I. LIMP-II quant à lui possède un motif dileucine de type LI (Eskelinen et al., 2003).

Après leur transit à travers l'appareil de Golgi, les protéines membranaires peuvent rejoindre les lysosomes par deux routes distinctes. La plupart des protéines membranaires lysosomales quittent le TGN par des vésicules recouvertes de clathrine et suivent probablement le même cheminement que les protéines solubles lysosomales sans passer par la surface cellulaire. Le site précis d'entrée dans la voie endocytaire (endosomes précoces, endosomes tardifs ou lysosomes) n'est pas clairement identifié. Cependant, étant donné qu'une fraction des protéines LAMPs et LIMP s se retrouve à la membrane plasmique, il est possible que des protéines lysosomales membranaires néosynthétisées suivent la voie de sécrétion constitutive avant de rejoindre les lysosomes par la voie de l'endocytose. Pendant plusieurs années, les protéines AP-1 ont été considérées comme les principales protéines adaptatrices responsables du transport du TGN vers les endo/lysosomes des protéines LAMPs et LIMP-1 après liaison des motifs G-Y-X-X- $\Phi$  avec la sous-unité  $\mu$ 1 des complexes AP-1. Ensuite, on a constaté que la délétion génétique de  $\mu$ 1 n'était pas accompagnée d'une diminution de l'efficacité de transport de glycoprotéines jusqu'aux lysosomes (Meyer et al., 2000). Au contraire, il est apparu que le complexe AP-3 contribuait au trafic intracellulaire des protéines LAMPs et LIMP s puisque dans les fibroblastes de patients atteints du syndrome de Hermansky-Pudlak où les niveaux de AP-3 sont réduits ou dans des fibroblastes de souris mutantes pour AP-3, LAMP-1 est en partie dérouté vers la surface cellulaire (Dell'Angelica et al., 1999; Le Borgne et al., 1998). Cependant, les deux complexes AP-1 et AP-3 ne semblent pas jouer un rôle essentiel dans l'adressage lysosomal des protéines LAMPs puisque des études plus récentes ont montré qu'une déficience simultanée de AP-1 et de AP-3 affectait peu ou pas l'abondance des protéines LAMP-1/2 dans les lysosomes (Janvier and Bonifacino, 2005; Reusch et al., 2002). En revanche, la déplétion de  $\mu$ 2 du complexe AP-2, situé exclusivement sur la membrane plasmique, conduit à une augmentation significative de l'expression de surface des protéines LAMP-1/2 et LIMP-1 et altère substantiellement la morphologie des lysosomes. Ces résultats suggèrent que la majorité des protéines LAMPs transiteraient par la membrane plasmique et seraient acheminées vers les lysosomes par un mécanisme dépendant des complexes AP-2 (Janvier and Bonifacino, 2005). On ne peut cependant pas exclure l'existence d'une voie directe entre le TGN et les lysosomes par un mécanisme indépendant des complexes AP et de la clathrine (Saftig and Klumperman, 2009).

### **1.1.3. Biogenèse des lysosomes**

Les macromolécules endocytées sont délivrées aux lysosomes séquentiellement en passant par les endosomes précoces et tardifs. Ces deux compartiments se distinguent par leur localisation et de leurs propriétés biochimiques (comme le pH, le contenu enzymatique, la densité,...). Les endosomes précoces (EE) sont considérés comme un centre de tri et de recyclage du matériel endocyté. Ils ont une morphologie tubulo-vésiculaire et ils sont localisés à la périphérie de la cellule. Les endosomes tardifs (LE), souvent appelés corps multivésiculaires, possèdent des vésicules internes et sont généralement plus proches du

noyau. Les lysosomes sont des compartiments sphériques de taille plus petite et de densité plus élevée que les endosomes tardifs (Luzio et al., 2007 ; Saftig and Klumperman, 2009). Comme tous les organites subcellulaires, les compartiments de la voie endocytaire possèdent des protéines marqueurs. Par exemple, la petite GTPase Rab5 est plus abondante dans les compartiments précoces tandis que les protéines Rab7, Rab9 et LAMPs caractérisent plutôt les compartiments tardifs. Notez qu'il est souvent difficile de distinguer les endosomes tardifs et les lysosomes, la principale différence étant l'absence de M6PR dans les lysosomes.

Le mécanisme de transfert du matériel endocyté aux lysosomes reste un sujet assez controversé. Différentes théories ont été proposées (**Fig.1.4**) (Luzio et al., 2007). Cela inclut le modèle de la maturation où les endosomes précoces sont formés par la fusion de vésicules provenant de la membrane plasmique. Ils sont ensuite convertis en endosomes tardifs puis en lysosomes après fusion avec des vésicules provenant du TGN et contenant des hydrolases acides. Une deuxième théorie est basée sur le transport vésiculaire où des vésicules transportent le cargo (ou matériel endocyté) d'un compartiment à l'autre.

Le concept de « *kiss and run* » constitue une troisième hypothèse, où un pore de fusion est formé de manière transitoire entre les endosomes tardifs et les lysosomes permettant le transfert de protéines et de lipides.

Enfin, une théorie se base sur le principe de fusion-fission qui est dérivé du « *kiss and run* » mais avec une fusion complète. Concrètement, l'endosome tardif fusionnerait complètement avec le lysosome pour former un organite hybride qui contiendrait une batterie complète d'hydrolases lysosomales ainsi que quelques récepteurs au mannose-6 phosphate provenant des endosomes tardifs. Ce serait dans les organites hybrides que se déroulerait la digestion des macromolécules. La reformation d'un lysosome à partir d'un organite hybride impliquerait le bourgeonnement de petites vésicules ainsi que la condensation de la lumière (Luzio et al., 2007).

#### **1.1.4. La V-H<sup>+</sup>-ATPase** (Revue dans (Forgac, 2007))

Le pH lysosomal est maintenu acide (pH 4,5-5) grâce aux pompes V-H<sup>+</sup>-ATPases insérées dans la membrane. Ce sont des pompes à protons ATP-dépendantes, responsables de l'acidification de plusieurs compartiments intracellulaires tels que les endosomes, les lysosomes, les vésicules dérivées de l'appareil de Golgi et les granules sécrétoires.

Les V-H<sup>+</sup>-ATPases sont des complexes multimériques de grande taille, organisés en 2 domaines, V<sub>1</sub> et V<sub>0</sub> (**Fig.1.5**). Le domaine cytoplasmique V<sub>1</sub> (650 kDa) est composé de 8 sous-unités différentes (A, B, C, D, E, F, G et H). Les sous-unités A et B sont présentes en plusieurs copies et sont disposées alternativement de façon à former une structure hexamérique qui est responsable de la liaison et de l'hydrolyse de l'ATP. Le domaine transmembranaire V<sub>0</sub> (260 kDa) est constitué de 6 sous-unités différentes (*a*, *c*, *c'*, *c''*, *d* et *e*) et permet le passage des protons du cytoplasme vers la lumière vésiculaire ou vers l'espace extracellulaire. Les V-H<sup>+</sup>-ATPases fonctionnent comme des turbines où l'hydrolyse de l'ATP par le domaine V<sub>1</sub> libère l'énergie nécessaire à la translocation des H<sup>+</sup> à travers les membranes intracellulaires et plasmique via le domaine V<sub>0</sub>.

Comme pour le domaine V<sub>1</sub>, certaines des sous-unités du domaine V<sub>0</sub> se trouvent en plusieurs copies. Ainsi, les sous-unités *c* sont arrangées en anneau de protéolipides dont chacun possède un résidu acide glutamique (Glu ou E) localisé dans une hélice transmembranaire. Ces résidus subissent une protonation réversible durant le transport des protons.

Les domaines V<sub>1</sub> et V<sub>0</sub> sont reliés entre eux par un appendice central (formé par les sous-unités D et F) qui fonctionne comme un « rotor ». L'extrémité N-terminale de la sous-unité *a*

et des sous-unités C, E, G et H forment des appendices qui constituent la partie fixe, « le stator » (**Fig.1.5**).

La sous-unité *a* possède 2 héli-canaux pour l'entrée et la sortie des protons et un résidu Arginine (Arg ou R735). Elle joue un rôle crucial dans le passage des protons à travers la membrane. Les H<sup>+</sup> passent d'abord l'héli-canal du côté cytoplasmique de la sous-unité *a* et protonnent les résidus Glu des protéolipides. Ceux-ci restent protonnés, ce qui force la rotation de l'anneau protéolipidique dans la bicouche lipidique qui est facilitée par l'hydrolyse de l'ATP. Cela conduit à la rotation du rotor central formé par les sous-unités D et F du domaine V<sub>1</sub> qui sont connectées à la sous-unité *d* et à l'anneau protéolipidique du domaine V<sub>0</sub>. Durant la rotation, les protons sont déplacés d'une sous-unité protéolipidique à une autre jusqu'à atteindre le second héli-canal du côté luminal de la sous-unité *a*. L'interaction avec le résidu Arg de la sous-unité *a* cause la déprotonation du résidu Glu et donc le passage des H<sup>+</sup> à travers la lumière du compartiment (*Forgac, 2007*).

La bafilomycine, utilisé au cours de ce travail, inhibe les V-H<sup>+</sup>-ATPases en s'intercalant entre les sous-unités *c* du domaine V<sub>0</sub>, bloquant ainsi les mouvements du rotor par rapport à la sous-unité *a* et donc la translocation des protons (voir paragraphe 1.3.3.2).

## 1.2. Les maladies de surcharge lysosomale

### 1.2.1. Caractéristiques générales des maladies de surcharge lysosomale

(Revue dans *Futerman et van Meer, 2004*)

Les maladies de surcharge lysosomale (LSD « *lysosomal storage disorder* ») représentent un groupe d'environ 60 maladies génétiques autosomiques récessives causées par la déficience de protéines lysosomales solubles ou membranaires (**tableau 1.2**). Il en résulte une accumulation intralysosomale de matériel non dégradé. Ce sont des maladies qui ont une grande diversité, chaque pathologie considérée individuellement est rare mais prises dans leur ensemble, leur incidence est estimée de 1/5.000 à 1/9.000 naissances (*Walkley and Vanier, 2009*).

Il existe des formes infantiles, juvéniles et adultes pour la plupart des LSDs. En général, les formes infantiles présentent des atteintes au cerveau avec une neurodégénérescence. Ce sont les formes les plus sévères puisque les patients meurent dans les premières années de leur vie. Dans la forme adulte, les symptômes apparaissent plutôt au niveau des tissus périphériques et se développent moins vite. Ce sont donc des pathologies graves avec un spectre clinique hétérogène, comprenant des atteintes viscérales (hépatosplénomégalie), osseuses et neurologiques (démence, crises d'épilepsie,...) et une mortalité très élevée.

Dans la majorité des cas, la cause de la surcharge est un défaut de l'activité d'une seule enzyme lysosomale, lui-même consécutif à une altération du gène codant pour cette enzyme. Toute une série de mutations au niveau de ce gène peuvent être responsables d'une altération de la fonction de l'enzyme, y compris bien entendu les défauts qui entraînent l'absence de synthèse, l'instabilité et la dégradation de la protéine enzymatique.

Dans certains cas rares, l'activité d'une enzyme lysosomale (ou de plusieurs) est défectueuse non pas en raison d'un défaut touchant l'enzyme elle-même mais d'une protéine qui sert d'activateur de l'enzyme. C'est le cas du déficit en activateur GM2 qui est responsable d'une

variante de GM2-gangliosidose : la maladie de Tay-Sachs de type B1 où l'hexosaminidase A est présente mais inactive pour l'hydrolyse des gangliosides GM2, faute d'activateur GM2. D'autres maladies lysosomales sont dues à un déficit d'un transporteur qui normalement assure le passage des métabolites de l'intérieur vers l'extérieur du lysosome. C'est le cas par exemple, de la cystinose qui est due à un défaut de transport de la cystine hors des lysosomes. Enfin, dans d'autres rares cas, les LSDs peuvent être causées par le défaut d'une protéine de la membrane lysosomale (comme la maladie de Danon due à une déficience en LAMP-2) ou d'une protéine impliquée dans le trafic intracellulaire des lipides (comme la maladie de Niemann type C caractérisée par une accumulation de cholestérol et de sphingolipides dans les endosomes tardifs et qui est causée par un défaut de la protéine NPC1 ou NPC2 dont le rôle exact n'est pas encore élucidé) (Ballabio and Gieselmann, 2009 ; Futerman and van Meer, 2004 ; Raben et al., 2009).

Il existe 2 manières de classer ces maladies de surcharge lysosomale : soit en fonction de l'enzyme défectueuse soit en fonction de la nature du substrat accumulé. Elles sont le plus souvent classées selon le type de substrat qui s'accumule. D'un point de vue clinique, cette classification est très utile et bien acceptée. Dans la plupart des cas, le matériel primaire de stockage est identifié et permet l'appellation et la classification de la maladie : d'où les termes sphingolipidoses, gangliosidoses, mucopolysaccharidoses,... Cependant, il y a souvent plus qu'un composé qui s'accumule dans les lysosomes et cela complique la classification. Généralement, l'accumulation de produits secondaires ne peut pas être simplement expliquée par le défaut enzymatique. C'est important d'en tenir compte car ce sont des composés qui jouent un rôle dans la pathogenèse de la LSD (Ballabio and Gieselmann, 2009).

En ce qui concerne la génétique de ces maladies, les LSD sont normalement monogéniques (elles n'impliquent qu'un seul gène) mais pour la plupart, de nombreuses mutations ont été décrites dans le même gène chez différents patients. Il n'existe pas de corrélation entre le génotype et le phénotype de la maladie. De plus, l'analyse des mutations ne permet pas de prédire le cours ou la sévérité de la maladie (Futerman and van Meer, 2004). Celle-ci doit être reliée au type de substrat qui s'accumule, à son taux d'accumulation et aux types de tissus ou cellules dans lesquels il s'accumule. En effet, le défaut d'une seule enzyme peut mener à une accumulation de différents substrats. Par exemple, les GM1-gangliosidoses et les mucopolysaccharidoses B sont toutes les deux causées par des défauts de l'activité de la  $\beta$ -galactosidase, mais dans un cas c'est le ganglioside-GM1 et dans l'autre, c'est le kératan sulfate qui s'accumule respectivement.

Les mécanismes moléculaires conduisant à la maladie sont encore inconnus. Il est clair que c'est l'accumulation de substrats non métabolisés qui est la cause primaire de la maladie. Cependant, l'étendue des symptômes de ces maladies indique que beaucoup de voies biochimiques et cellulaires doivent être activées. Autrement dit, les premiers métabolites accumulés enclencheraient des réactions en cascade qui seraient responsables des dommages tissulaires observés dans ces maladies (Futerman and van Meer, 2004). Même si on ne connaît pas encore les mécanismes exacts, des pistes semblent émerger. Ainsi, l'accumulation des premiers métabolites activerait des voies de transduction, modulerait la concentration en calcium cytosolique libre, interférerait avec le trafic de lipides ainsi qu'avec l'autophagie (Ballabio and Gieselmann, 2009).

Dans le cadre de notre étude, nous avons travaillé sur des fibroblastes de patients atteints d'une forme de LSD : la mucopolysaccharidose de type IV, la mucopolysaccharidose de type IVB et la lipofuscinose céroïde neuronale de type 2. Nous allons donc les décrire plus en détails.

### **1.2.2. La mucopolipidose de type IV**

La mucopolipidose de type IV (MLIV) est une maladie caractérisée par des problèmes neurologiques et ophtalmologiques sévères, incluant une opacité de la cornée, une dégénérescence de la rétine et du strabisme (Bach, 2001). Il s'agit d'une affection très rare, principalement présente dans la population juive ashkénaze, au sein de laquelle la fréquence des hétérozygotes est de 1/100 et l'incidence de la maladie de 1 pour 40.000. Les premiers cas ont été diagnostiqués en 1974. Elle peut débuter dès la première année de vie ou plus tardivement, mais elle est habituellement d'évolution lente.

Cette maladie a été classée comme étant une mucopolipidose suite à des observations faites en microscopie électronique indiquant que les lysosomes étaient remplis de lipides (des phospholipides, des sphingolipides et des gangliosides) stockés sous forme d'inclusions lamellaires ainsi que des substances solubles (en particulier des glycoprotéines et des mucopolysaccharides) (Bach, 2001).

Contrairement à la plupart des maladies de surcharge lysosomale, les hydrolases acides ont une activité normale. La maladie est due à l'absence d'expression de la mucopolipine-1 (MCOLN1) qui est encodée par le gène *MCOLN1*, situé dans la région chromosomique 19p13.3-p13.2. Une vingtaine de mutations ont déjà été décrites, dont deux spécifiquement dans la population juive ashkénaze représentant 95 % des allèles : une mutation au niveau d'un site intronique accepteur d'épissage et une délétion partielle du gène. Parmi les autres mutations identifiées, on trouve des mutations « *missense* », des délétions et des insertions de nucléotides (Bach, 2001).

La mucopolipine-1 est un canal cationique non sélectif, membre de la superfamille des TRP « *transient receptor potential* », c'est pourquoi elle est aussi connue sous le nom de TRPML1. La mucopolipine-1 possède six domaines transmembranaires avec des domaines N- et C-terminaux cytosoliques, un motif dileucine permettant son ciblage vers les lysosomes et le pore est localisé entre les segments transmembranaires 5 et 6. Ce canal est non sélectif, son activité peut être modulée par des phosphorylations, un changement de pH et une augmentation de la concentration intracellulaire en  $Ca^{2+}$  (Vergarajauregui et al., 2008).

La fonction spécifique de ce canal n'a pas encore fermement établie. Certaines études suggèrent que c'est un canal à protons qui permet de réguler le pH intralysosomal (Miedel et al., 2008; Soyombo et al., 2006). TRPML1 empêcherait une suracidification dans les lysosomes en exportant l'excès de  $H^+$  en dehors des lysosomes. Dès lors, une déficience en TRPML1 serait responsable d'une diminution du pH intralysosomal entraînant une réduction de l'activité hydrolytique de certaines lipases en particulier. Toutefois, ce modèle dit « métabolique » ne fait pas l'unanimité (Miedel et al., 2008).

D'autres études décrivent la MCOLN1 comme étant un canal permettant le transport du calcium mais aussi d'autres cations tels que le  $Na^+$  et le  $K^+$ . Son ouverture serait modulée par des changements en  $Ca_i$  (LaPlante et al., 2004). Selon ce modèle, le canal mucopolipine-1 jouerait un rôle clé dans la maturation des lysosomes en provoquant la libération de  $Ca^{2+}$  à partir de la lumière des compartiments endo-lysosomaux, une étape indispensable pour la fusion des membranes. De fait, chez les patients atteints de MLIV, les auteurs ont constaté une diminution de la concentration en  $Ca^{2+}$  intracellulaire et de la fusion entre les endosomes tardifs et les lysosomes. Par conséquent, le gonflement anormal des endosomes tardifs, observé dans les cellules de ces patients, serait dû à l'accumulation de lipides et d'autres matériaux qui ne peuvent pas être correctement transférés vers les lysosomes (LaPlante et al., 2004). Enfin, des travaux récents suggèrent que TRPML1 fonctionnerait comme canal



perméable aux ions  $Fe^{2+}$  dans les endosomes tardifs et dans les lysosomes (Dong et al., 2008). Sur base de la comparaison des niveaux de  $Fe^{2+}$  dans le cytosol et dans les lysosomes de fibroblastes « contrôles » et de fibroblastes de patients atteints de la mucopolidose IV, ces auteurs avancent l'hypothèse selon laquelle TRPML1 participerait à la libération des ions  $Fe^{2+}$  de la lumière de ces organites vers le cytosol (Dong et al., 2008). Quoiqu'il en soit, le stockage intralysosomal pourrait résulter d'un déséquilibre ionique à travers la membrane des compartiments endocytaires (Miedel et al., 2008).

Le diagnostic de la maladie peut être évoqué sur base de la présence d'une autofluorescence due au matériel de stockage dans les cultures de fibroblastes des patients. La confirmation définitive est apportée par la mise en évidence des mutations responsables sur le gène MCOLN1. Il n'existe actuellement aucune thérapie spécifique pour cette maladie. Le traitement est principalement symptomatique, consistant notamment dans la prise en charge de l'atteinte visuelle et de certains problèmes neurologiques.

### **1.2.3. La mucopolysaccharidose de type IVB (ou maladie de Morquio B)**

La maladie de Morquio B ou mucopolysaccharidose de type IVB (MPS IVB) a été décrite par Luis Morquio en 1929. C'est une maladie rare (avec une prévalence de seulement 1/210.000) qui affecte aussi bien les hommes que les femmes. Dans 20 % des cas, les parents sont consanguins (Prat et al., 2008).

Il existe deux variantes non-alléliques (A et B) de la maladie de Morquio. La variante MPS IVA est due à une mutation dans le gène codant pour la galactosamine (N-acétyl)-6-sulfate sulfatase (ou GALNS) située sur le chromosome 16p24.3 tandis que la variante MPS IVB est causée par une mutation dans le gène qui code pour la  $\beta$ -galactosidase (*GBL1*) situé sur le chromosome 3p21-33. Malgré un défaut génétique différent, les patients atteints de ces deux maladies présentent des symptômes cliniques similaires.

La maladie de Morquio B est caractérisée par une dysplasie squelettique et une opacité de la cornée ainsi qu'une augmentation de l'excrétion de kératan sulfate dans les urines. Il n'y a pas d'atteintes du système nerveux central ni de diminution des facultés intellectuelles. Cela permet de la distinguer de la GM1-gangliosidose qui est une forme allélique de la MPS IVB, toutes les 2 étant causées par une déficience de la  $\beta$ -galactosidase.

En ce qui concerne les caractéristiques biochimiques, la  $\beta$ -galactosidase est synthétisée sous forme de précurseur dont le poids moléculaire est de 85 kDa. Ensuite cette forme précurseur est clivée pour donner une enzyme mature de 64 kDa en passant par une forme intermédiaire (Hoogeveen et al., 1984). La  $\beta$ -galactosidase fait partie d'un complexe dans lequel on trouve la cathepsine A, la neuraminidase et la GALNS. La cathepsine A, encore appelée protéine protectrice, a pour rôle de protéger la  $\beta$ -galactosidase et la neuraminidase d'une digestion lysosomale. De plus, elle serait essentielle à la maturation de la  $\beta$ -galactosidase (Callahan, 1999).

Dans les fibroblastes de patients atteints de GM1-gangliosidose, la forme mature de la  $\beta$ -galactosidase est absente. Cependant, la forme précurseur (85 kDa) est synthétisée mais ne s'accumule pas, cela suppose une dégradation précoce lors de la maturation de la forme précurseur. À l'opposé dans la maladie de Morquio B, la maturation de la  $\beta$ -galactosidase se passe normalement et la forme mature de l'enzyme est présente en quantité normale. Toutefois, seulement 50 % des formes matures (au lieu de 85%) s'associent à la cathepsine A et à la neuraminidase pour former des complexes. De plus, l'activité de la  $\beta$ -galactosidase se

trouve réduite, probablement parce que l'enzyme a moins d'affinité pour ses substrats (Hoogeveen et al., 1984). De fait, une étude a montré que dans les fibroblastes de patients atteints de MPS IVB, l'activité résiduelle de la  $\beta$ -galactosidase vis-à-vis de la méthylumbellyféryl- $\beta$ -galactopyranoside était de 1,3 à 7 % par rapport à la forme normale.

#### **1.2.4. La lipofuscinose céroïde neuronale de type 2**

Les lipofuscinoses céroïdes neuronales (NCL ou CLN) appelées aussi maladie de Batten sont les maladies neurodégénératives les plus retrouvées chez l'enfant. À l'heure actuelle, huit mutations dans différents gènes ont été identifiées, engendrant des maladies caractérisées par une pathologie similaire. Les CLN sont très hétérogènes, elles peuvent être distinguées selon des critères cliniques et selon l'âge de la survenue de la maladie : il y a les formes infantiles (*CLN1*), la forme infantile tardive (*CLN2*), la forme juvénile (*CLN3*), la forme adulte (*CLN4*) et deux variantes de la forme infantile tardive (*CLN5 et CLN6*) (Futerman and van Meer, 2004).

Le terme « lipofuscinose-céroïde » fait référence aux matériaux accumulés dans les lysosomes composés à la fois de céroïde et de lipofuscine, un lipopigment autofluorescent qui s'accumule normalement dans les cellules au cours du vieillissement, mais présent en excès dans les neurones des enfants atteints de CLN.

La forme infantile tardive de la lipofuscinose (LINCL « *classic-late-infantile form of neuronal ceroid lipofuscinosis* ») est généralement diagnostiquée entre 2 et 4 ans par des convulsions. La progression de la maladie est lente avec des symptômes cliniques qui incluent des attaques, une perte de la vue, un retard mental et de la démence avant que le patient ne meure vers l'âge de 5 à 7 ans (Sleat et al., 2004). Le gène défectueux dans cette maladie, est le gène *CLN2* que l'on trouve sur le chromosome 11. *CLN2* encode une sérine protéase, la tripeptidyl-peptidase I (TPP-I) qui est synthétisée sous forme de précurseur hautement glycosylé. Celui-ci est transporté vers les compartiments endo-lysosomaux où il s'autoactive à cause du pH acide (Lin et al., 2001). Il y a 54 mutations dans le gène *CLN2* associées à cette maladie, cependant 78 % des individus affectés portent l'une ou les deux mutations les plus communes (Arg208Stop et 3556G  $\rightarrow$ C).

D'un point de vue biochimique, le composé majeur qui s'accumule dans les lysosomes est la sous-unité c de l'ATP synthase mitochondriale. Elle représente 85 % du contenu en protéines qui s'accumulent dans le cerveau (Golabek and Kida, 2006). L'ATP synthase, aussi connue sous le nom de  $F_0F_1$ ATPase, est un complexe enzymatique ancré dans la membrane mitochondriale interne. Elle utilise le gradient électrochimique de protons, généré par la chaîne respiratoire, pour pomper les protons de l'espace intermembranaire vers la matrice et pour synthétiser de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. La  $F_0$ ATPase partage plusieurs similarités structurelles avec la  $V$ - $H^+$ -ATPase, décrite dans le paragraphe 1.1.4. La sous-unité c est extrêmement hydrophobe et difficile à dégrader, c'est pourquoi elle s'accumulerait dans les lysosomes lors de l'élimination des mitochondries devenues inefficaces par autophagie (Sleat et al., 2004).

L'étude des biopsies de peau ou autres tissus en microscopie électronique permet de mettre en évidence des corps curvilinéaires qui facilitent le diagnostic. Le diagnostic de certitude, lui, est basé sur l'identification de la déficience en TPP-I et la mise en évidence des mutations par analyse de l'ADN (Golabek and Kida, 2006).

### **1.2.5. Les différents traitements possibles des LSDs**

D'énormes progrès ont été réalisés dans le domaine des LSDs en élucidant les défauts génétiques, en développant des approches thérapeutiques, en améliorant les soins aux patients et en générant des modèles animaux.

Il existe tout d'abord l'enzymothérapie substitutive ou ERT (*enzyme replacement therapy*). Le but de ce traitement est d'apporter par des perfusions intraveineuses régulières (toutes les semaines ou tous les 15 jours) l'enzyme spécifique qui fait défaut dans l'une des maladies lysosomales. Cette enzyme est produite par génie génétique, purifiée et modifiée pour l'aider à atteindre les cellules de l'organisme qui ont le plus besoin de recycler le métabolite impliqué dans la maladie. Par exemple, pour le traitement de la maladie de Gaucher de type I qui est due à une déficience en  $\beta$ -glucocérébrosidase et qui est caractérisée par une splénomégalie, il existe une enzyme recombinante couplée au mannose qui, une fois administrée par voie intraveineuse, peut être capturée par les macrophages grâce aux récepteurs au mannose dont ils disposent. Cela empêche l'accumulation de glucosylcéramide dans leurs lysosomes et la rate reprend une taille normale (Grabowski, 2008).

Une autre stratégie consiste à inhiber la synthèse du substrat afin de réduire son accumulation dans les cellules (*substrate reduction therapy*). Dans le cas de la maladie de Gaucher, on essaie d'inhiber la céramide glucosyltransférase, l'enzyme qui catalyse la synthèse de glucosylcéramide, à l'aide de molécules pharmacologiquement actives (Grabowski, 2008). Il est également possible d'utiliser des molécules qui augmentent l'activité enzymatique résiduelle en facilitant le repliement ou le trafic intracellulaire des protéines (*chaperon-mediated therapy*). Par rapport à l'ERT, l'utilisation de ces molécules présente deux avantages : l'administration orale et la pénétration potentielle à travers la barrière hémato-encéphalique. C'est important pour le traitement de LSD associées à des atteintes du système nerveux central.

Dans le traitement de la maladie de Gaucher, la transplantation de moelle osseuse ou de cellules souches hématopoïétiques a donné des résultats encourageants. Cette approche consiste à prélever des cellules d'une personne non atteinte de LSDs et de les greffer à un patient atteint d'une LSD. Le but est de donner des cellules souches afin qu'il puisse produire l'enzyme déficiente. La thérapie génique peut aussi être envisagée à plus ou moins long terme mais les progrès en la matière ont pris du retard suite aux difficultés de délivrer et d'exprimer le gène codant pour l'enzyme déficiente, en particulier dans les cellules souches dérivées de la moelle osseuse. À cela s'ajoutent des problèmes de toxicité liés à la mutagenèse insertionnelle et à la transformation en cellule maligne suite à des événements de recombinaison (Grabowski, 2008).

Comme déjà évoqué précédemment, le lysosome est le compartiment terminal de plusieurs processus de dégradation dont l'autophagie (voir paragraphe 3.1.2), qui permet la dégradation des protéines de longue durée de vie et des organites endommagés.

L'importance physiologique du processus autophagique est apparue suite à des études réalisées sur des souris où l'autophagie était perturbée. Ces souris accumulaient des agrégats protéiques et présentaient de la neurodégénérescence. De plus, plusieurs maladies neurodégénératives comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson et d'Huntington sont caractérisées par une accumulation d'agrégats protéiques qui pourrait résulter d'une altération de l'autophagie (Ballabio and Gieselmann, 2009). Enfin, l'inhibition de l'autophagie a aussi été évoquée comme étant un mécanisme possible conduisant aux symptômes des maladies de surcharge lysosomale (Ballabio and Gieselmann, 2009).

## 1.3. La dégradation des protéines

En réponse à un jeûne, les cellules eucaryotes réagissent en stimulant la dégradation des protéines afin de libérer des acides aminés qui peuvent servir à la synthèse de protéines indispensables à la survie cellulaire ou à la production d'énergie via le cycle de Krebs. Il existe différentes voies protéolytiques activées durant une période de jeûne : le système ubiquitine-protéasome et l'autophagie (Finn and Dice, 2006).

### 1.3.1. Le système ubiquitine-protéasome

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est responsable de la dégradation de protéines ubiquitinylées du cytosol ou du noyau. Cette dégradation se déroule en deux grandes étapes et requiert de l'ATP (Finn and Dice, 2006).

Tout d'abord la protéine est « marquée » par la conjugaison de chaînes d'ubiquitine (Ub), une petite protéine ubiquiste et très conservée de 76 acides aminés. C'est une protéine constitutive dont l'expression augmente en cas de stress cellulaire.

L'ubiquitinylation de la protéine se fait par une cascade enzymatique faisant intervenir au moins 4 classes d'enzymes : une enzyme activatrice de l'ubiquitine (E1) ; une enzyme de conjugaison de l'ubiquitine au substrat (E2), une ligase protéine-ubiquitine (E3) et une ligase ubiquitine-ubiquitine, responsable de la formation de la chaîne polyubiquitinylée (E4) (**Fig.1.6**).

Les chaînes d'ubiquitine formées permettent ensuite la reconnaissance et la dégradation de la protéine cible par un complexe protéolytique de 2000 kDa, le protéasome 26S.

### 1.3.2. L'autophagie

Le terme « autophagie » provient du Grec et signifie « se manger soi-même ». Ce terme a été défini dans les cellules de mammifères, il y a plus de 50 ans et englobe un ensemble de mécanismes aboutissant à la dégradation de constituants cellulaires par le lysosome. L'autophagie est un processus bien conservé dans l'évolution qui a évolué avec la complexité des organismes. Il existe différents types d'autophagie : la microautophagie, la macroautophagie et l'autophagie médiée par les chaperones (CMA) (**Fig.1.7**) (Ravikumar et al., 2009).

La microautophagie a lieu directement au niveau du lysosome, qui « englutit » une partie du cytosol en invaginant sa propre membrane (Mizushima et al., 2008).

Un deuxième type d'autophagie est l'autophagie médiée par les chaperones (CMA) qui est caractérisée par une translocation directe de la protéine à dégrader dans la lumière du lysosome (Finn and Dice, 2006). Tous les substrats de la CMA doivent posséder un motif de ciblage spécifique (un pentapeptide apparenté à KFERQ) et seraient liés par un complexe comprenant une chaperone (Hsc70 pour « *heat shock protein of 70 kDa* ») et une co-chaperone. Le complexe substrat/chaperone/cochaperone se lierait à des protéines LAMP-2A qui serviraient de récepteurs. Une fois lié à la membrane lysosomale, le substrat serait déplié et internalisé dans la lumière du lysosome à travers un translocon formé par plusieurs molécules de LAMP-2A.

La CMA possède une certaine spécificité : seules les protéines solubles capables d'interagir avec la queue cytoplasmique de LAMP-2A peuvent être dégradées par la CMA. De plus, elle n'implique pas la formation de vésicules. Dans certains types cellulaires comme les

fibroblastes, elle serait responsable, d'environ 30 % de la dégradation des protéines en période de jeûne (Finn and Dice, 2006).

La macroautophagie constitue la troisième forme d'autophagie et c'est la forme la mieux caractérisée à ce jour. C'est pourquoi nous allons lui consacrer un chapitre plus important.

### **1.3.2.1. Mécanisme général de la macroautophagie**

Le mécanisme de base de la macroautophagie est la séquestration de matériaux cytoplasmiques (des portions de cytoplasme, des agrégats protéiques, des organites endommagés ou des pathogènes) dans une vésicule limitée par une double membrane, appelée autophagosome. Celui-ci fusionne ensuite avec un lysosome ou un endosome tardif pour donner naissance à des autophagolysosomes et des amphisomes, respectivement, afin que le matériel capturé soit dégradé par les hydrolases lysosomales (**Fig.1.7 et 1.8**).

La biogenèse d'un autophagosome (ou vacuole autophagique) peut être divisée, d'un point de vue morphologique, en 4 étapes (**Fig.1.9**) (van der Vaart et al., 2008) : 1) l'induction qui est marquée par le début de la séquestration du matériel par une membrane isolatrice encore appelée phagophore ; 2) l'étape d'expansion, qui est l'étape durant laquelle la membrane s'allonge jusqu'à emprisonner complètement le cargo ; ensuite 3) l'arrimage et la fusion, où la membrane externe de l'autophagosome se rapproche et fusionne avec la membrane du lysosome pour former un autophagolysosome et enfin 4) la dégradation où la membrane interne de l'autophagosome est lysée ainsi que son contenu. Les fonctions lysosomales sont donc indispensables à la maturation finale des autophagosomes et à la dégradation de leur contenu.

L'autophagie est activée en réponse à des stimuli externes (comme le jeûne, l'irradiation aux UV, une invasion par des microorganismes) ou internes (comme un changement de volume de la cellule, les stress oxydatifs, l'accumulation de protéines mal repliées,... (Levine and Kroemer, 2008; Meijer and Codogno, 2004).

En ce qui concerne l'origine de la membrane isolatrice donnant naissance à un autophagosome, il reste beaucoup d'interrogations. On ne connaît ni l'organite duquel elle dérive ni comment ce compartiment est généré. Cependant, certains auteurs ont proposé que chez les mammifères, elle dériverait soit du réseau *trans* Golgien (Young et al., 2006) soit du réticulum endoplasmique (Kovacs et al., 2007).

### **1.3.2.2. Le rôle de la macroautophagie**

La macroautophagie joue un rôle important dans l'homéostasie cellulaire. En effet, un niveau basal d'autophagie est indispensable pour la dégradation des protéines de longue durée de vie ainsi que pour l'élimination d'organites ou molécules non désirables ou endommagé(e)s. Elle intervient aussi dans le remodelage durant le développement et la différenciation. De plus, elle a été décelée dans plusieurs maladies comme le cancer, certaines maladies neurodégénératives ainsi que les maladies infectieuses (Mizushima et al., 2008).

L'autophagie a été décrite comme un mécanisme de survie cellulaire. Cela a été démontré par plusieurs études montrant que l'inactivation de gènes essentiels de l'autophagie induisait la mort cellulaire et cela dans plusieurs types cellulaires et organismes. Ce concept de survie est assez ancien d'un point de vue évolutif, conservé de la levure jusqu'aux

mammifères et qui est bien caractérisé dans les conditions de privation de nutriments (Levine and Yuan, 2005). En effet, lorsque les nutriments viennent à manquer, les cellules eucaryotes répondent par une augmentation de la dégradation des protéines afin de générer des acides aminés libres qui peuvent être réutilisés pour la synthèse de nouvelles protéines. Cette fonction de recyclage des composés cellulaires est probablement liée à la capacité des cellules à survivre en absence de nutriments.

À côté de son rôle dans la survie cellulaire, l'autophagie peut également provoquer la mort cellulaire. En effet, si l'autophagie est mal régulée pour une raison quelconque, avec son potentiel autodestructeur, elle peut provoquer des dommages importants. Une stimulation massive pourrait détruire de larges portions de cytosol et/ou de nombreux organites (comme les mitochondries, les peroxysomes,...). À partir d'un certain seuil, cela pourrait provoquer des dégâts irréversibles et la mort de la cellule (Levine and Yuan, 2005).

### **1.3.2.3. Les mécanismes moléculaires**

Depuis plusieurs années, les connaissances sur les mécanismes moléculaires impliqués dans l'autophagie et dans sa régulation ne cessent de croître. De nombreux articles ont été publiés montrant son importance en physiologie et en physiopathologie (Ravikumar et al., 2009).

Suite à une série d'analyses génétiques chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, une trentaine de gènes ont pu être identifiés comme étant responsables de l'autophagie. Ils sont désignés par le sigle *atg* pour « *autophagy-related genes* ». Ces études ont permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires de l'autophagie (Meijer and Codogno, 2004). Parmi ces 31 gènes, une quinzaine de gènes encodent la machinerie de base essentielle à la formation des autophagosomes chez tous les eucaryotes. Ces gènes sont responsables des étapes d'induction, d'expansion et de fusion (**Fig.1.9**). Leurs produits ont des fonctions diverses : on y trouve 4 protéines membranaires (Atg 2, 9, 18 et 22), une protéine kinase (Atg1 ou ULK1 chez l'homme), une protéase (Atg4), une lipase (Atg15), un cofacteur associé à une kinase (Atg6 ou Bécline chez l'homme), deux protéines de fonction similaire à l'ubiquitine (Atg8 et 22) et trois enzymes, une activatrice de l'ubiquitine ou E1 (Atg7) et deux enzymes de conjugaison de l'ubiquitine au substrat ou E2 (Atg3 et 10).

Toutes ces protéines Atg peuvent être classées en 5 sous-groupes : le complexe (ULK1-Atg13- FIP200), le complexe phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase spécifique de l'autophagie, le système de conjugaison Atg12, le système de conjugaison Atg8 et le dernier sous-groupe comprend des protéines fonctionnellement inconnues mais dont on sait qu'elles participent à la formation des autophagosomes. Les protéines Atg s'associent séquentiellement à la structure pré-autophagosomale (PAS, ou phagophore chez les mammifères) et s'organisent selon un certain ordre chronologique (Nakatogawa et al., 2009). Ces complexes agissent en aval de la protéine TOR, une sérine-thréonine kinase dont l'activité régule négativement la macroautophagie.

#### **a) L'implication de mTOR dans la formation des autophagosomes**

Comme déjà évoqué précédemment, il existe un grand nombre de stimuli capables de moduler la réponse autophagique. La protéine kinase mTOR « *mammalian target of rapamycin* » est impliquée dans plusieurs fonctions cellulaires comme la synthèse des protéines, la croissance et la prolifération cellulaire mais aussi dans de nombreuses maladies humaines, comme les cancers (Wang and Proud, 2009). De plus, elle constitue un régulateur

clé de l'autophagie dans toutes les cellules eucaryotes mais on ne connaît toujours pas le mécanisme exact. Son inhibiteur, la rapamycine, mime une situation de jeûne et induit l'autophagie même lorsque l'environnement est riche en nutriments. Donc, lorsque l'environnement est riche en nutriments, la kinase Tor est activée et l'autophagie est inhibée. D'autres signaux sont capables de contrôler cette voie : l'insuline, les facteurs de croissance, les hormones, l'hypoxie, la fonction mitochondriale...(Wang and Proud, 2009).

La protéine mTOR peut former deux complexes protéiques distincts, le complexe TORC1 et TORC2. Le complexe TORC1 est sensible aux nutriments et à la rapamycine. Il est composé de mTOR, d'une protéine de régulation associée à mTOR (Raptor), de GβL (ou mLST8, un effecteur positif de mTOR) et de PRAS40 (un effecteur négatif de mTOR) (**Fig.1.12**). De son côté, le complexe TORC2 est insensible à la rapamycine. Il est composé de mTOR, d'une protéine associée à mTOR (Rictor) et de GβL ainsi que d'une protéine kinase activée par le stress (mSIN1) (Wang and Proud, 2009). C'est TORC1 qui est responsable du contrôle de la macroautophagie. Récemment, il a été montré que mTOR avait comme cibles directes, les protéines mammaliennes Atg13, ULK1 et ULK2 (ULK1/2 « *uncoordinated 51 like kinase 1/2* », les deux homologues mammaliens de la protéine Atg1) (Hosokawa et al., 2009).

#### **b) Le complexe ULK1-Atg13-FIP200**

Le complexe ULK1-Atg13-FIP200 (3000 kDa) joue un rôle essentiel dans les premières étapes de la formation des autophagosomes. Atg13 et FIP200 (homologue suggéré de la protéine Atg17 chez la levure) permettent le recrutement membranaire de ULK1 et retardent sa dégradation. De façon constitutive, Atg 13 active ULK1 qui phosphoryle FIP200 (Hosokawa et al., 2009).

Lorsque l'environnement est riche en nutriments, mTOR s'associe à ce complexe ULK1-Atg13-FIP200 et phosphoryle Atg13 ainsi que ULK1. La phosphorylation de ULK1 par mTOR inhiberait son activité de phosphorylation sur FIP200 et, par conséquent, la macroautophagie (**Fig.1.10**).

Par contre, lorsqu'on se trouve dans des conditions de jeûne, mTOR n'est plus associée au complexe et ne peut donc plus phosphoryler Atg13 et ULK1. ULK1 peut donc phosphoryler Atg13 et FIP200 et induire ainsi la macroautophagie (**Fig.1.10**). L'exclusion de mTOR du complexe ULK1-Atg13-FIP200 serait due à un changement de localisation intracellulaire de ULK1 plutôt qu'à un changement de conformation induit par une phosphorylation (Hosokawa et al., 2009; Jung et al., 2009).

#### **c) Le complexe phosphatidylinositol 3-kinase de classe III (PI3K III)**

Un deuxième sous-groupe des protéines Atg forme un complexe avec la PI3K III. La formation du phagophore requiert l'activité de la PI3K de classe III qui phosphoryle un phosphatidylinositol pour produire un phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P). L'activation de cette kinase (ou hVsp34) dépend de la formation d'un complexe multiprotéique composé outre hVps 24, de Bécline-1, d'UVRAG (« *UV irradiation resistance-associated tumour suppressor gene* »), de BIF-1 (Bax-interacting factor 1), de Ambra 1 (*Activating molecule in Beclin 1-regulated autophagy*), de Atg14 (ou Barkor) et d'une protéine myristoylée p150 (Wei et al., 2008). P150 sert à ancrer le complexe PI3K III aux membranes et constitue la sous-unité régulatrice de la kinase hVps34. A ce niveau, la macroautophagie peut également être régulée par la Bécline-1, positivement ou négativement selon qu'elle interagit avec UVRAG, Atg14, Ambra 1 ou avec Bcl2 (Meijer and Codogno, 2004).

#### **d) Les deux systèmes de conjugaison** (van der Vaart et al., 2008)

Parmi les sous-groupes que forment les protéines Atg, il existe deux systèmes de conjugaison impliqués dans l'expansion des autophagosomes.

Le premier est composé par les protéines mammaliennes Atg5 et Atg12 qui prennent part à deux réactions de conjugaison comme celles impliquant l'ubiquitine. Atg12 est d'abord conjuguée à Atg5 et cela grâce aux protéines Atg7 et Atg10 (qui sont des enzymes de type E1 et E2, respectivement). Le conjugué Atg5-Atg12 s'associe ensuite à Atg16. Ce nouveau complexe s'homodimérise pour former un énorme complexe multimérique de 800 KDa.

Le second système de conjugaison implique Atg8 (dont un homologue mammalien est LC3) et une phosphatidyléthanolamine (PE). LC3 est synthétisée sous forme d'un précurseur dont la séquence située en position C-terminale est clivée par une cystéine protéase, Atg4, donnant naissance à la forme cytosolique (LC3-I) possédant un résidu glycine terminal. Cette partie C-terminale est ensuite activée par Atg7 et transférée sur Atg3. Atg3 activée peut alors se lier au PE et la forme LC3-II est ainsi produite.

Dans les cellules de mammifères, LC3 est présent sur les surfaces interne et externe de la membrane d'isolement tandis que le complexe Atg5-Atg12-Atg16 est présent uniquement sur la surface externe. Une fois que les autophagosomes sont complètement formés, toutes les protéines Atg liées sur la surface externe sont libérées dans le cytoplasme. Par exemple, les protéines LC3 sont dissociées de la surface externe des membranes des autophagosomes grâce à l'action de la protéase Atg4. Par contre, les protéines LC3 présentes sur la surface interne des autophagosomes sont dégradées dans les autophagolysosomes. Etant donné que LC3 est présent du début à la fin du processus autophagique, il est souvent utilisé comme marqueur spécifique des autophagosomes (Kabeya et al., 2000).

#### **e) La maturation et la fusion des autophagosomes** (Ravikumar et al., 2009)

Les autophagosomes se formeraient au hasard dans le cytoplasme. Ils sont ensuite véhiculés le long des microtubules vers les lysosomes qui sont concentrés au niveau du centre organisateur des microtubules (MTOC). En route vers le MTOC, les autophagosomes pourraient aussi fusionner avec les endosomes pour former les amphisomes. Selon certains auteurs, la formation des amphisomes serait un pré-requis pour la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Razi et al., 2009).

#### **1.3.2.4. La régulation de la macroautophagie**

Un grand nombre de stimuli peuvent moduler la réponse autophagique. Il n'est donc pas étonnant de trouver plusieurs mécanismes de régulation de la macroautophagie mais nous n'allons décrire que les plus connus.

##### **a) Les voies dépendantes de mTOR**

###### **▪ La voie de signalisation TSC1/TSC2**

Le complexe mTORC1 peut être activé ou inhibé par différentes voies impliquant les complexes TSC1 et TSC2. Les gènes *TSC1* «*tuberous sclerosis complex*» et *TSC2* sont responsables d'une maladie connue sous le nom de sclérose tubéreuse (TSC) qui est caractérisée par des tumeurs bénignes au niveau du cerveau et d'autres organes. Ces gènes codent pour des complexes protéiques qui jouent un rôle non seulement dans la suppression



de tumeurs mais aussi dans la régulation de la macroautophagie (Kwiatkowski and Manning, 2005).

La sous-unité TSC2 sert de protéine activatrice de GTPase (GAP) pour les petites GTPases Rheb (Ras homology enriched in brain) qui interagissent avec mTORC1. Comme toutes les GTPases, les protéines Rheb existent sous forme inactive (GDP) ou active (GTP) et font la navette entre le cytosol et des membranes. Seule la forme GTP est capable d'interagir et d'activer mTOR. En activant l'hydrolyse du GTP fixé sur Rheb, les protéines TSC2 bloquent son effet activateur de mTOR. L'activité de TSC2 est régulée par phosphorylation, grâce suite à l'action de plusieurs kinases, dont Akt, AMPK, GSK3, ERK1/2 et RSK1. Ces phosphorylations peuvent avoir un effet positif ou négatif sur l'activité de TSC2 selon les sites de phosphorylation utilisés par les kinases.

Il est connu que la liaison de ligands (facteurs de croissance, insuline) sur leurs récepteurs de type tyrosine kinases induit des événements de phosphorylation intracellulaire qui mènent au recrutement à la membrane plasmique de la PI3 kinase de classe I. Cette PI3K I phosphoryle des phosphoinositides membranaires en position 3' pour générer du PI(3)P, du PI(3,5)P2 et du PI(3,4,5)P3. Ceux-ci vont recruter la sérine/thréonine kinase Akt (PKB) à la membrane (**Fig.1.11**). Ensuite, Akt va être à son tour phosphorylée soit par le complexe mTOR-riCTOR (mTORC2) soit par la PDK1 (« *phosphoinositide-dependent kinase 1* »). Une fois activée, elle va elle-même phosphoryler d'autres cibles telles qu'un membre de la famille Bcl2, BAD, les sérine/thréonine kinases GSK3 $\alpha$  et  $\beta$ , et la protéine TSC2. La phosphorylation de TSC2 par Akt sur les sérines 939, 981, 1130 et 1132 et sur la thréonine 1462 inhibe sa capacité à jouer son rôle de protéine activatrice des GTPases Rheb. Il en résulte une augmentation du taux des protéines Rheb capables d'activer mTORC1 et donc l'inhibition de la macroautophagie. Inversement, en l'absence de facteurs de croissance, TSC2 maintient Rheb sous forme inactive, le complexe mTOR est inactivé et l'autophagie est activée (Kwiatkowski and Manning, 2005).

L'AMPK « *AMP activated protein kinase* » est un complexe hétérotrimérique constitué des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$ . En cas de stress énergétique, c'est à dire lorsque le ratio AMP/ATP augmente, la liaison de l'AMP sur la sous-unité  $\gamma$  de l'AMPK entraîne un changement de conformation de cette sous-unité  $\gamma$  et l'exposition du site actif de l'enzyme situé sur la sous-unité  $\alpha$ . Ensuite, l'AMPK est phosphorylée et activée par la sérine-thréonine kinase LKB1 (**Fig.1.11**). Une fois activée, l'AMPK phosphoryle TSC2 sur les résidus sérine 1270 et 1388 et cette phosphorylation, à l'opposé de la phosphorylation médiée par Akt, va permettre aux complexes TSC1/2 de jouer leur rôle d'activateur sur les protéines Rheb. Autrement dit, en conditions de stress, Rheb est incapable d'activer mTOR et l'autophagie est induite (Kwiatkowski and Manning, 2005).

- *Les acides aminés*

Les acides aminés bloquent la macroautophagie en activant mTOR par un mécanisme encore inconnu. Selon des études récentes, ce mécanisme impliquerait les protéines Rag GTPases (Kim et al., 2008). Les Rag GTPases forment une famille de 4 petites protéines capables de lier le GTP (Rag A/B/C/D) et de former des hétérodimères. Elles activeraient la voie TORC1 en fonction de la disponibilité en acides aminés (**Fig.1.12**). En effet, lorsque les protéines RagA ou RagB sont maintenues sous leur forme GTP par mutation, elles se trouvent fortement liées à mTORC1 créant une résistance à l'activation de la voie mTORC1 suite à une carence en acides aminés (Sancak et al., 2008). Les protéines Rag ne stimuleraient pas

directement l'activité kinase de mTORC1, mais elles interviendraient dans sa localisation intracellulaire en interagissant directement avec Raptor (Sancak et al., 2008).

Rag et TSC1/2 agiraient de façon indépendante et parallèle pour réguler l'activité de mTORC1.

## **b) Les voies indépendantes de mTOR**

### ▪ *La voie JNK : connexion avec Bécline-1 et Bcl2*

Bécline-1 joue un rôle régulateur sur la macroautophagie notamment en interagissant avec Bcl2. Elle fait partie du complexe de la PI3K III (voir paragraphe 1.3.3) dans lequel on trouve aussi UVRAG, Ambra 1, Bif 1 et des membres de la famille Bcl-2 (Bcl2 et Bcl-XL). Plusieurs études ont suggéré que la dissociation de Bcl-2 et de Bécline-1 pouvait être un mécanisme important dans l'activation de la macroautophagie. En condition normale, Bcl2 s'associe à bécline 1 et bloque l'autophagie. En revanche, en période de jeûne, la Jun kinase, JNK « *C-jun N-terminal protein kinase* », phosphorylerait Bcl-2 et diminuerait ainsi son association avec Bécline-1. Il en résulterait une augmentation de la macroautophagie (Wei et al., 2008).

### ▪ *Inositol monophosphatase*

L'inositol monophosphatase catalyse l'hydrolyse de l'inositol monophosphate en inositol libre. En inhibant cette phosphatase, le lithium provoque une déplétion de l'inositol libre et, par conséquent, une diminution de myoinositol-1,4,5 triphosphate (IP3). Celle-ci active la macroautophagie par un mécanisme encore inconnu mais indépendant de mTOR (Sarkar et al., 2005).

## **1.3.3. Les inhibiteurs de la macroautophagie**

### **1.3.3.1. La 3-méthyladénine**

La 3-méthyladénine (3-MA) ou 6-amino-3 méthylpurine est une molécule capable d'inhiber la macroautophagie. Cependant, elle n'a pas d'effet sur la dégradation des protéines capturées par endocytose ni sur la synthèse des protéines (Seglen and Gordon, 1982). En fait, elle empêcherait la formation des autophagosomes en inhibant spécifiquement la PI3K III (Petiot et al., 2000). Il existe d'autres inhibiteurs de la PI3K capables d'interférer avec la formation des autophagosomes : la wortmanine et LY29002. Contrairement à ces derniers, la 3-méthyladénine ne provoquerait pas un gonflement des endosomes tardifs et des lysosomes (Hirosako et al., 2004).

### **1.3.3.2. La bafilomycine**

La bafilomycine A<sub>1</sub> est un inhibiteur hautement spécifique de la V-H<sup>+</sup>-ATPase. Il inhibe rapidement l'acidification d'organites tels que les lysosomes et les endosomes. Indépendamment de leur rôle dans l'acidification de certains organites, il a été montré que les domaines V<sub>0</sub> de ces pompes à protons seraient directement impliqués dans des processus de fusion membranaire (Peters et al., 2001). Cette idée a émergé suite à des études faites sur des levures, où selon le modèle du « pore de fusion », une communication (un pore) s'établit entre deux membranes opposées, à l'endroit où la fusion doit avoir lieu. Ces pores protéiques

seraient composés de six sous-unités protéolipidiques du domaine  $V_0$  qui forment un « cylindre ». Les cylindres des deux membranes opposées s'attacheraient ensuite en *trans* afin de former un canal traversant les 2 membranes. L'hydrophobicité de l'anneau protéolipidique constituant la paroi de ce canal apparaît favorable à une éventuelle expansion radiaire du pore par interposition de lipides membranaires (Forgac, 2007).

Par conséquent, la bafilomycine inhiberait la macroautophagie non seulement en augmentant le pH intralysosomal mais aussi en bloquant la fusion des autophagosomes avec les lysosomes, provoquant l'accumulation d'autophagosomes (Yamamoto et al., 1998). Selon des spécialistes de l'autophagie, la concentration et le temps de traitement en bafilomycine sont des facteurs clés. L'augmentation du pH serait un effet immédiat lors du traitement tandis que l'interférence avec la fusion des autophagosomes et des lysosomes se passerait plus tard (après 6-12 h de traitement) (Klionsky et al., 2008b).

### **1.3.3.3 Les siRNA**

Etant donné que les agents pharmacologiques ont souvent des effets secondaires, il est toujours plus préférable de recourir à l'utilisation de siRNA (dirigés contre une série de gènes *atg*) ou d'animaux knock-out pour les protéines Atg (par exemple Atg5 ou Atg12) afin de bloquer plus spécifiquement la formation des autophagosomes.

## 1.4. Objectifs du mémoire

L'importance de l'autophagie a gagné en intérêt depuis la découverte d'une accumulation d'autophagosomes dans le cerveau de patients souffrant de plusieurs troubles neurologiques comme la maladie d'Alzheimer, de Parkinson, de Huntington. Depuis plusieurs années, l'implication de l'autophagie dans les maladies de surcharge lysosomale est également apparue dans la littérature (Raben et al., 2009). La première preuve fut apportée par la maladie de Danon qui est causée par une mutation dans le gène codant pour la protéine lysosomale LAMP-2. Cette déficience de LAMP-2 est accompagnée d'une accumulation de vacuoles autophagiques dans les muscles des patients (Nishino, 2006) ainsi que dans les souris KO pour LAMP-2 (Eskelinen et al., 2002). Il existe d'autres LSDs pour lesquelles une accumulation d'autophagosomes a été démontrée : le déficit multiple en sulfatases (MSD), la mucopolysaccharidose IIIA (MPSIIIA) (Settembre et al., 2008), la gangliosidose de type GM1 (Takamura et al., 2008), la maladie de Niemann-Pick de type C (NPC) (Ko et al., 2005), la maladie de Pompe (PD) (Fukuda et al., 2006), les lipofuscinoses céréoïdes neuronales (Koike et al., 2005) et la mucopolipidose de type IV (MLIV) (Vergarajauregui et al., 2008).

L'accumulation de vacuoles autophagiques pourrait expliquer la pathogenèse des maladies de surcharge lysosomale. En effet, il a été proposé que l'accumulation des autophagosomes pourrait résulter d'un défaut de fusion entre les autophagosomes et les lysosomes suite au stockage de matériel dans la lumière des lysosomes. Cela ralentirait la dégradation des agrégats protéiques polyubiquitinylés et des mitochondries non fonctionnelles. Ces substrats de l'autophagie s'accumuleraient dans la cellule et *in fine* pourrait provoquer la mort cellulaire (Ballabio and Gieselmann, 2009).

L'objectif de ce mémoire était de déterminer s'il y avait une activation de l'autophagie basale dans deux autres maladies de surcharge lysosomale : la mucopolysaccharidose de type IVB (MPS IVB) et la lipofuscinoses céréoïde neuronale de type 2 (CLN2). Pour cela, nous avons travaillé sur des fibroblastes de patients atteints de MPS IVB ou CLN2 comparés à des fibroblastes provenant d'adultes asymptomatiques. Comme contrôles positifs, nous avons utilisé des fibroblastes d'un patient atteint de mucopolipidose IV dans lesquels une augmentation de l'autophagie basale a été démontrée. Les techniques utilisées au cours de ce travail incluent l'analyse de la distribution ou de l'abondance de la protéine LC3B-II en immunofluorescence et en Western blot ainsi que de la microscopie électronique à transmission.

Vu que l'activation de l'autophagie pourrait être due soit à une stimulation de la synthèse des autophagosomes, soit à un problème de fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (Ballabio and Gieselmann, 2009; Settembre et al., 2008), il est important d'analyser le flux autophagique. Le flux autophagique réfère au processus complet de l'autophagie, depuis la formation des autophagosomes jusqu'à l'arrivée aux lysosomes suivi de sa dégradation et son recyclage. Pour estimer son importance, nous avons également mesuré la dégradation des protéines de longue durée de vie qui représentent des substrats privilégiés de la macroautophagie.



## 2. Matériel et Méthodes

### 2.1. Culture cellulaire

#### 2.1.1. Les lignées cellulaires

Durant ce travail, nous avons cultivé 5 lignées cellulaires non immortalisées. Ce sont des fibroblastes de peau provenant d'enfants atteints de la mucopolysaccharidose IV (ML4, WG0909, Cellbank, Montreal, Canada), de la mucopolysaccharidose IVB (MPS IVB, GM01602, Coriell Cell Repositories, New Jersey, USA) et de la lipofuscinose céréoïde neuronal de type 2 (CLN2, GM16486, Coriell Cell Repositories).

Nous avons utilisé comme cellules contrôles, des fibroblastes de peau provenant des pères respectifs de chaque enfant atteint. Nous les avons nommés ML CTL (WG0987, Cellbank), et MPS CTL (GM02456, Coriell Cell Repositories). Les pères sont hétérozygotes et donc cliniquement sains. Pour les cellules CLN2 -/-, les cellules du père n'étaient pas disponibles, nous avons donc utilisé les MPS CTL comme contrôles.

#### 2.1.2. Conditions de culture et de repiquage des cellules

Les lignées cellulaires étaient ensemencées dans des boîtes de polystyrène de 75 cm<sup>2</sup> (Greiner Bio-one) en présence de 20 ml de milieu E-MEM (Minimum Essential Media-Eagle, Lonza) contenant 2 mM de L-glutamax (ThermoFisher Scientific), 10% de sérum de veau fœtal (FCS) (Sigma), 100 mM d'acides aminés non-essentiels (NEAA) (Lonza) et de 100 mM de pyruvate de sodium (Lonza). Les cellules étaient maintenues dans un incubateur à 37°C et dans une atmosphère humide contenant 5 % CO<sub>2</sub>.

Le plus souvent, les cellules étaient repiquées deux fois par semaine et cela en fonction de leur état de confluence. Pour commencer, les milieux de culture étaient enlevés et les cellules étaient lavées avec 10 ml de HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Lonza) puis avec 3 ml de trypsine/ EDTA (Lonza). Ensuite, les cellules étaient trypsinisées à l'aide de 1 ml de trypsine/ EDTA pendant 2 min à 37°C. L'action enzymatique de la trypsine était stoppée par l'ajout de 10 ml de milieu complet. Après une centrifugation de 5 min à 1000 rpm, le surnageant était éliminé et le culot était resuspendu dans 10 ml de milieu complet. Au final, la suspension cellulaire était répartie dans des nouvelles boîtes de 75 cm<sup>2</sup> (Greiner Bio-one) dans un volume de 20 ml. Elles étaient diluées 2 ou 3 fois dans le but de maintenir les cellules « saines » et « malades » à une densité comparable et ce, jusqu'à atteindre un passage de maximum 40.

Les cellules étaient régulièrement observées et photographiées grâce un microscope à contraste de phase, possédant une caméra (Leica DFC290, URBC).

#### 2.1.3. Conditions de jeûne des cellules et Traitement avec la bafilomycine

Avant d'être mises à jeun, les cellules étaient d'abord rincées trois fois avec de l'HBSS puis seulement incubées durant 6 h à 37°C dans un milieu E-MEM dépourvu de sérum, de NEAA, de pyruvate de sodium mais contenant 2 mM de L-glutamax. Dans certains cas, les cellules étaient incubées dans du tampon EBSS (Lonza) à 37°C.

En ce qui concerne les traitements avec la bafilomycine A1, les cellules étaient incubées 6 h dans un milieu complet contenant la bafilomycine (Sigma-Aldrich) à une concentration finale allant de 10 à 25 nM, comme indiqué dans la légende des figures.

## **2.2. Préparation des lysats totaux**

Les lysats cellulaires totaux étaient obtenus à partir de cellules provenant d'une même boîte de 75 cm<sup>2</sup> et cultivées dans des pétris de 10 cm de diamètre (Greiner Bio-one). Après traitement, les milieux de culture étaient éliminés et les tapis cellulaires étaient rincés trois fois avec du PBS (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1 mM, NaCl 154 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 3 mM, pH 7,4) non stérile. Les cellules étaient, ensuite, placées sur de la glace et 500 µl de tampon de lyse RIPA (Tris-HCl 50 mM pH 7,4, NaCl 150 mM, Triton X-100 1 %, SDS 0,1 %, DOC1 %) glacé contenant des inhibiteurs de protéases (« Complete », Roche Applied Science) étaient ajoutés. Après 10 min d'incubation, les cellules étaient raclées à l'aide d'un « cell scraper » et les lysats cellulaires étaient récoltés à froid dans des tubes Eppendorf. Ceux-ci étaient soumis à 10 min de rotation sur roue avant d'être centrifugés pendant 15 min à 13 000 rpm et à 4°C. Enfin, les surnageants étaient récupérés et conservés à - 20 °C. Un dosage de protéines était ensuite effectué sur ces différents échantillons en utilisant la technique du BCA.

## **2.3. Dosage des protéines par la technique du BCA (acide bicinchoninique)**

### ***2.3.1. Principe***

Les différents dosages protéiques réalisés dans le cadre de ce travail étaient effectués selon la technique du BCA (Smith et al., 1985). C'est une méthode colorimétrique de dosage des protéines qui implique comme réactifs, l'acide bicinchoninique (BCA) et des ions cuivriques (Cu<sup>++</sup>). Les ions cuivreux (Cu<sup>+</sup>) générés par réduction des protéines en milieu alcalin forment avec le BCA, un complexe stable et intensément coloré qui absorbe la lumière à 562 nm.

### ***2.3.2. Méthode***

D'un point de vue pratique, 40 µl de lysat étaient mélangés à 800 µl de réactif A + B (Pierce, Thermofisher Scientific) toutes les 30 secondes. Après 30 min d'incubation dans un bain-marie à 37°C, l'absorbance des échantillons était lue au moyen d'un spectrophotomètre (Perkin-Elmer) à une longueur d'onde de 562 nm. Pour calculer la concentration en protéines, l'absorbance des échantillons était comparée à l'absorbance des standards de BSA de concentrations connues.

## **2.4. Western blotting**

### ***2.4.1. Principe***

Le Western Blot suivi d'une révélation par chémoluminescence est une technique semi-quantitative permettant de mettre en évidence l'abondance des protéines d'intérêt au sein

d'un échantillon donné. Elle se déroule en 4 étapes : 1) la séparation des protéines sur un gel de polyacrylamide en présence de SDS « *Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis* », 2) le transfert des protéines sur une membrane PVDF « *PolyVinylidene Fluoride* », 3) incubation de la membrane avec les anticorps primaire puis secondaires et 4) la révélation.

#### **2.4.2. L'électrophorèse**

La préparation d'un gel de polyacrylamide se fait en deux étapes. Dans un premier temps, le gel de séparation contenant de 8 à 15 % d'acrylamide/bisacrylamide est coulé entre une plaque de verre et une plaque de silice. Le pourcentage du gel est choisi en fonction du poids moléculaire de la protéine d'intérêt : plus la protéine a un poids moléculaire élevé, plus le pourcentage du gel doit être faible. Dans notre étude, nous avons réalisé des gels d'acrylamide/bisacrylamide de 15 % en présence de SDS 1 %. La polymérisation des gels d'acrylamide est initiée par 1 % de persulfate d'ammonium (APS) et catalysée par 0,08 % de tétraméthyléthylènediamine (TEMED). Ensuite, le gel de concentration est coulé et un peigne est utilisé pour la formation des puits.

Les protéines (10 ou 15 µg selon les cas) étaient solubilisées dans du tampon de Laemmli (Tris-HCl 62,5 mM pH 6,8, glycérol 10 %, SDS 2 %, β-mercaptoéthanol (β-ME) 1 % et bleu bromophénol 0,01 %). Le SDS et le β-mercaptoéthanol permettent de dénaturer les protéines, soit en additionnant des charges négatives (SDS) soit en réduisant les ponts disulfures (β-ME). Ensuite, elles étaient chauffées à 95°C pendant 5 min avant d'être déposées sur les gels. Afin de pouvoir déterminer le poids moléculaire des bandes observées, nous avons utilisé un étalon de poids moléculaire (Kaleidoscope, Bio-Rad).

L'application d'un courant électrique (20 mA puis 30 mA/gel) permet la migration des protéines en présence d'un tampon d'électrophorèse (glycine 192 mM, Tris 25 mM et de SDS 0,1 %). La migration se fait de manière inversement proportionnelle à leur poids moléculaire.

#### **2.4.3. Le transfert sur une membrane de PVDF**

Après leur migration, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF-P (GE Healthcare) hydratée avec du méthanol 100 % et rincée avec de l'H<sub>2</sub>O avant d'être imprégnée dans le tampon de transfert (Tris 25 mM, glycine 192 mM et méthanol 20 %). Cette étape de transfert a pour but de faire sortir les protéines du gel qui, sous l'effet d'un courant électrique (ici, 1 h à 400 mA) vont venir s'adsorber sur la surface de la membrane. Nous avons utilisé une méthode de transfert « semi-sec » qui consiste à prendre en « sandwich » le gel et la membrane entre des papiers absorbants imbibés du tampon de transfert.

#### **2.4.4. Incubation avec les anticorps**

Avant d'être incubée en présence de différents anticorps, la membrane a été saturée, toute la nuit à 4°C ou 1 h à température ambiante, sous agitateur dans une solution de PBS/Tween-20 contenant 2 % d'agent bloquant (ECL Advance Blocking Agent, GE Healthcare). Cette étape permet de bloquer les sites de liaison aspécifique et de diminuer le bruit de fond. Ensuite, la membrane était incubée pendant 2 h à température ambiante en présence de l'anticorps primaire (monoclonal de souris anti-LC3B, Nano-tools) dilué 1000 fois dans du PBS/Tween-20 contenant l'agent bloquant. Les anticorps non hybridés étaient éliminés par une série de lavages dans du PBS/Tween-20. La membrane était alors incubée 1



h à température ambiante avec l'anticorps secondaire (anti-IgG de chèvre couplé à HRP « Horse Radish Peroxydase », Dakocytomation) dilué 2000 fois dans les mêmes conditions. Enfin, la membrane était rincée avant d'être couverte de la solution de révélation contenant le substrat de raifort (Kit Perkin Elmer).

#### **2.4.5. Révélation**

La révélation était réalisée en chambre noire où la membrane était exposée sur des films d'autoradiographie (Amersham Hyperfilm ECL, GE Healthcare) quelques minutes maximales. Le film était ensuite développé grâce à une machine de révélation.

## **2.5. Immunofluorescence**

### **2.5.1. Marquage de LC3**

D'un point de vue pratique, les fibroblastes étaientensemencés dans des plaques de 12 puits sur des lamelles en verre stérilisées à l'alcool 70 %. Lorsque les cellules étaient sous-confluentes, elles étaient rincées délicatement trois fois avec du d-PBS (Dulbecco's modified Phosphate Buffered Saline, NaCl 137 mM, KCl 2.7 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM, K<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 mM, CaCl<sub>2</sub> 1 mM et MgCl<sub>2</sub> 0.5 mM, pH 7,4), avant d'être fixées et perméabilisées par immersion pendant 10 min à - 20°C dans une solution de méthanol/acétone (1 : 1, v/v). Après avoir enlevé la solution fixatrice, trois lavages avec du d-PBS étaient effectués. Les cellules étaient ensuite incubées pendant 2 h à température ambiante et dans des conditions humides avec l'anticorps primaire (**tableau 2.6**) dilué dans du d-PBS contenant 0,1 % de saponine et 0,1 % de BSA (w/v). L'excès d'anticorps était éliminé par trois rinçages avec du d-PBS. Ensuite, l'incubation durant 1 h avec l'anticorps secondaire dilué dans le même tampon était réalisée, à l'abri de la lumière. Les derniers rinçages avec du d-PBS étaient effectués et les lamelles en verre étaient finalement montées sur des lames porte-objet avec du Mowiol 4-88 (Calbiochem) préchauffé à 53°C. Celles-ci étaient stockées en chambre froide à 4°C à l'abri de la lumière jusqu'à leur observation à l'aide d'un microscope à fluorescence Olympus Provis Ax70 équipé d'une caméra (LabCeTi). Lors d'une expérience, nous avons visualisé les noyaux, les cellules étaient placées pendant 30 min en présence de TO-PRO-3 dilué 80 fois dans de la RNase A (2 mg/ml de PBS) (Molecular Probes, Invitrogen), toujours à l'abri de la lumière. Ces lamelles étaient observées au microscope confocal TCD (Leica) utilisant un photomultiplicateur constant.

### **2.5.2. Marquage de LAMP-1 et de COX-1**

COX-1 « *cytochrome c oxidase* » est une enzyme de la chaîne respiratoire mitochondriale. Elle est située dans la membrane interne. Nous avons utilisé cette enzyme comme marqueur des mitochondries. Les cellules étaient d'abord rincées délicatement trois fois avec du d-PBS avant d'être fixées et perméabilisées avec du méthanol 100 % pendant 5 min, suivie de l'acétone 80 % pendant 2 min, le tout à - 20°C. Après avoir enlevé la solution fixatrice, trois lavages avec du d-PBS étaient effectués suivi d'une étape de saturation où les lamelles étaient incubées pendant 20 min les lamelles dans une solution de d-PBS/BSA 2 %. Le reste de l'expérience est identique à celle du paragraphe 2.6.2 excepté que les anticorps primaire et secondaire étaient dilués dans une solution de d-PBS/BSA 2 % (**tableau 2.6**) et qu'aucun marquage au TO-PRO3 n'a été réalisé. Les cellules ont été observées en microscopie confocal.

## 2.6. La microscopie électronique à transmission (MET)

### 2.6.1. Principe

L'observation en MET nécessite plusieurs étapes successives : fixation, inclusion, contraste.

Tout d'abord, la fixation a pour but de conserver des structures, elle se fait habituellement dans de la glutaraldéhyde tamponnée et est suivie d'une post-fixation avec de l'acide osmique ( $\text{OsO}_4$ ). La glutaraldéhyde ( $\text{COH}(\text{CH}_2)_3\text{COH}$ ) est un dialdéhyde qui interagit rapidement avec les protéines. Il stabilise les structures en créant des ponts artificiels entre les protéines et des groupements amines libres. Certaines substances telles que le glycogène ou la matrice extracellulaire sont ainsi préservées. Néanmoins, la glutaraldéhyde seule reste insuffisante et il est nécessaire de réaliser une seconde fixation au tétraoxyde d'osmium pour éviter l'extraction de certains composants lors de la déshydratation (en particulier les lipides). Le tétraoxyde d'osmium, lui est indispensable à la visualisation des constituants membranaires de la cellule (ex : membranes et crêtes mitochondriales, membranes du réticulum endoplasmique et de l'enveloppe nucléaire).

Ensuite, vient l'étape d'inclusion, elle permet la réalisation de coupes fines et régulières. Pour cela, on emploie des résines synthétiques hydrophobes (ex : époxy) qui après polymérisation deviennent rigides. Les cellules doivent d'abord subir une déshydratation (par immersion dans des bains d'alcool de degré croissant).

Des coupes ultrafines des blocs sont réalisées grâce à un ultramicrotome et sont recueillies sur des grilles de cuivre pour être contrastées. Le contraste des coupes s'effectue habituellement avec de l'acétate d'uranyle (contrastant les nucléoprotéines : noyau, nucléole, ribosomes) et des sels de plomb comme le citrate de plomb (contrastant les membranes).

### 2.6.2. Méthode

Les cellules étaientensemencées et cultivées dans des pétris de 35 mm de diamètre contenant du milieu complet. Pour la préparation des cellules en vue d'une observation en MET, nous avons suivi les conseils de Geneviève Porcheron-Berthet (Centre Médical Universitaire, Département de Physiologie Cellulaire et Métabolisme, Genève).

Tout d'abord, les cellules étaient rincées trois fois dans du PBS ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$  1 mM, NaCl 154 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  3 mM, pH 7,4) et fixées pendant 30 min à température ambiante dans 2,5 % de glutaraldéhyde (Ladd, Williston, USA) dilué dans du tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,4. Ensuite, elles subissaient trois lavages de 5 min dans du cacodylate 0,2 M pH 7,4, avant d'être post-fixées pendant 20 min dans 1 % de tétraoxyde d'osmium dilué dans du tampon cacodylate de sodium 0,1 M pH 7,4.

Après cette étape de post-fixation, les cellules étaient mises en présence de 0,2 % d'acide tannique dilué dans 0,05 M du tampon cacodylate pH 7,4, rincées deux fois avec 1 % de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  préparé dans le même tampon et incubées pendant 10 min à l'abri de la lumière dans 0,5 % d'acétate d'uranyle préparé dans du tampon Kellenberger pH 6 (20 % de tampon Véronal-acétate, 28 % d' HCl 0,1N et 0,1% de  $\text{NaN}_3$ ) (Montesano and Orci, 1988).

Les cellules étaient ensuite progressivement déshydratées dans des bains d'alcool de plus en plus concentrés (70, 90, 100 % d'éthanol) et enrobées dans un mélange résine (LX112/éthanol (1 : 1). Après 30 min, ce mélange était changé par de la résine pure pendant une période de 30 min. Celle-ci était une dernière fois changée avant l'étape de polymérisation de la résine. Pour cela, les pétris étaient incubés successivement à 37°C pendant 24 h, une journée à 45°C et deux journées à 60°C.

Après polymérisation de la résine, des sections ultrafines (40 nm) étaient réalisées à l'aide d'un couteau en diamant monté sur un ultramicrotome (NOVA, LKB, Bromma, Suède). Ces coupes étaient placées sur des grilles de cuivre avant d'être contrastées avec 5 % d'acétate d'uranyle pendant 20 min toujours à l'abri de la lumière et avec du citrate de plomb pendant 10 min. L'observation des grilles s'est faite au moyen d'un microscope électronique à transmission (Tecnai, FEI, Hillsboro, USA).

## **2.7. La dégradation des protéines de longue durée de vie**

### **2.7.1. Principe**

Mesurer la dégradation des protéines constitue une méthode quantitative pour mesurer le flux autophagique. La stratégie consiste à marquer les cellules par une incorporation d'un acide aminé radioactif (ex : la valine- $C^{14}$ , ...). Ce marquage doit se faire pendant une période suffisamment longue (une nuit ou 24 h) afin que toutes les protéines soient marquées, y compris les protéines avec un faible « turn-over ».

Ensuite, les cellules sont lavées et incubées dans du milieu E-MEM non radioactif contenant un excès de valine froide pour éviter que les valines radioactives ne soient incorporées dans de nouvelles protéines. Cette période de chasse se fait en deux étapes : une courte période où les cellules recyclent leurs protéines à courte durée de vie, suivie d'une plus longue période de chasse où les protéines à longue durée de vie sont dégradées.

### **2.7.2. Méthode**

Les cellules étaient ensemencées dans des pétris de 60 mm de diamètre. Lorsqu'elles étaient dans la phase exponentielle de leur croissance, elles étaient rincées 3 fois avec de l'HBSS stérile et incubées dans un milieu de marquage (milieu appauvri en valine ou en méthionine (**tableau 2.8**) contenant 0,2  $\mu\text{Ci/ml}$  de valine- $C^{14}$  et 2  $\mu\text{Ci/ml}$  de Trans $S^{35}$ -Label (extrait cellulaire de *E. Coli* contenant  $\geq 70\%$  de L-Méthionine et  $\leq 15\%$  de L-Cystéine (MP Biomedicals) pendant 16 h ou une nuit (Chan et al., 2007). Le lendemain, les cellules subissaient trois lavages avec de l'HBSS stérile, suivi d'une première période de chasse de 4 h permettant la dégradation des protéines à courte durée de vie et d'une seconde période allant de 4 à 24 h permettant la dégradation des protéines de longue durée de vie. Durant ces périodes, les cellules se trouvaient dans 3 ml de milieu E-MEM complet (voir paragraphe 2.1.2) supplémenté en valine (2 mM, Sigma).

Après la longue période de chasse, les milieux étaient récupérés et les cellules étaient lysées pendant 10 min dans 250  $\mu\text{l}$  de PBS glacé contenant 1 % de Triton X-100. Les protéines contenues dans 500  $\mu\text{l}$  de milieu et dans la totalité des lysats cellulaires étaient précipitées en ajoutant respectivement 500  $\mu\text{l}$  et 250  $\mu\text{l}$  d'acide trichloracétique (TCA) 20 %, pendant environ 15 min sur de la glace suivie d'une centrifugation de 2 min à 12.000 rpm. Au cours de cette centrifugation, seules les protéines non dégradées sédimentent alors que les protéines dégradées restent en solution. Les surnageants étaient ensuite décantés et les culots étaient remis en suspension dans 100  $\mu\text{l}$  d'urée 9 M (Chan et al., 2007).

Les surnageants des milieux et des cellules représentent la partie soluble qui contient des protéines partiellement ou complètement dégradées. Par contre, les culots des milieux et des cellules représentent la partie non-soluble qui contient les protéines non dégradées. La radioactivité était mesurée sur 100  $\mu\text{l}$  de surnageant et sur les culots resuspendus, à l'aide d'une solution de scintillation (Ultima gold, Perkin Elmer) et du d'un compteur (Beckman

L56500). Afin de déterminer le pourcentage de dégradation des protéines de longue durée de vie pour chaque condition, nous avons d'abord calculé la somme de la radioactivité des surnageants du milieu et des cellules et la somme de radioactivité des culots du milieu et des cellules. Ensuite, nous avons fait le rapport entre les deux, comme décrit dans la littérature (Pattingre et al., 2005).

Calcul du pourcentage de dégradation :

$$\frac{(* \text{ TCA soluble dans le milieu} + * \text{ TCA soluble dans les cellules})}{(* \text{ TCA insoluble dans le milieu} + * \text{ TCA insoluble dans les cellules})} \times 100$$

où \* = radioactivité

### 3. Résultats

Rappelons que le but de notre étude est de déterminer s'il y a une activation de l'autophagie dans des fibroblastes de patients souffrant de mucopolysaccharidose IVB (MPS IVB) ou de lipofuscinose céréoïde neuronale de type 2 (CLN2<sup>-/-</sup>) par rapport à des fibroblastes contrôles provenant d'adultes sains. Une lignée cellulaire dérivée de la peau d'un patient atteint de mucopolysaccharidose IV (ML4) nous sert de contrôle. En effet, il a été démontré que ces cellules présentaient une accumulation de vacuoles autophagiques dans le cytoplasme à l'état basal (Vergarajauregui et al., 2008).

Dans un premier temps, nous avons analysé les caractéristiques morphologiques de ces cellules en utilisant des techniques de microscopie à contraste de phase, de microscopie à fluorescence et de microscopie électronique à transmission. Ensuite, nous nous sommes intéressés à l'autophagie proprement dite, en détectant une protéine marqueur des autophagosomes, LC3B, tant en immunofluorescence qu'en Western blotting. Dans une troisième partie, nous avons réalisé des expériences de cinétiques de dégradation des protéines de longue durée de vie, afin d'étudier le flux autophagique.

#### 3.1. Caractérisation des lignées cellulaires

##### 3.1.1. Observation en microscopie à contraste de phase

Toutes les cellules avec lesquelles nous avons travaillé : les ML CTL, ML4, MPS CTL, MPS IVB et CLN2<sup>-/-</sup> ont une morphologie fusiforme avec un noyau ovale contenant un ou plusieurs nucléoles (**Fig.3.1**). Ce sont des fibroblastes primaires de peau qui, dès lors ont une capacité de division limitée (maximum 50 passages). De plus, lorsqu'elles sont mises en culture, elles poussent jusqu'à former une monocouche, ensuite leur croissance est stoppée, c'est ce que l'on appelle l'inhibition de contact.

À première vue, il ne semble pas y avoir de différences morphologiques entre les cellules des patients atteints d'une LSD par rapport aux cellules contrôles. Toutefois, lorsque nous comparons les cellules de patients souffrant de mucopolysaccharidose IV (ML4) par rapport aux cellules contrôles (ML CTL), nous pouvons remarquer, mais, seulement à plus fort grossissement, des structures vacuolaires dilatées qui apparaissent réfringentes au microscope à contraste de phase (**Fig.3.1**). Ces vacuoles claires pourraient contenir des lipides et des mucopolysaccharides (Bach, 2001).

##### 3.1.2. Observation en microscopie à fluorescence

Une des caractéristiques de toutes les maladies de surcharge lysosomale est la formation et l'accumulation de vacuoles de stockage lysosomales contenant le matériel non dégradé. Cela provoque une augmentation de la taille et du nombre des lysosomes (Meikle et al., 1997). Afin de comparer la morphologie des lysosomes dans les cellules souffrant d'une surcharge lysosomale et dans les cellules contrôles, nous avons réalisé un immunomarquage des protéines LAMP-1. LAMP-1 est une protéine membranaire située sur la membrane limitante des endosomes tardifs et des lysosomes (Eskelinen et al., 2003). Les photos prises en microscopie à épifluorescence montrent un marquage d'aspect vacuolaire principalement dans la région périnucléaire (**Fig.3.2**). Ce résultat était attendu puisque les endosomes tardifs et les lysosomes se trouvent principalement près du centre d'organisation des microtubules,

lui-même près du noyau. En nous focalisant sur des organites isolés, nous avons essayé de déceler une différence de taille des endo/lysosomes entre les cellules atteintes d'une surcharge lysosomale et les cellules contrôles. Cela n'a pas l'air d'être le cas mais il est possible que la résolution du microscope ne soit pas suffisante pour voir de faibles différences de taille. Il faudrait observer les cellules au microscope électronique.

### **3.1.3. Observation en microscopie électronique à transmission**

Nous avons eu recours à la microscopie électronique à transmission afin d'observer s'il y avait ou non une induction de l'autophagie dans les cellules atteintes de surcharge lysosomale comparées aux cellules contrôles. Dès le départ, nous savions que cela nécessitait l'observation d'un grand nombre de cellules ainsi que des études stéréologiques afin de quantifier les autophagosomes détectés dans les cellules (Klionsky et al., 2008a). La tâche est d'autant plus ardue qu'il n'est pas toujours évident de visualiser la double membrane des vacuoles autophagiques qui est une caractéristique essentielle des autophagosomes.

L'observation des fibroblastes en microscopie électronique s'est révélée être encore plus difficile que prévu. C'est seulement après plusieurs tentatives infructueuses que nous avons réussi à observer les ML CTL, les MPS CTL et les MPS IVB avec une ultrastructure bien préservée. Malheureusement, vu les nombreux problèmes techniques rencontrés depuis le mois de juin par le Service Interfacultaire de Microscopie Electronique, nous n'avons pas pu examiner les cellules CLN2<sup>-/-</sup> et les ML 4. Sur les photos que nous avons prises des ML CTL, des MPS CTL et des MPS IVB, nous pouvons détecter des mitochondries avec des crêtes mitochondriales intactes, des citernes de réticulum endoplasmique décorées de ribosomes denses aux électrons, des autophagosomes,... (**Fig.3.3**). Par contre, nous ne remarquons pas d'accumulation de vacuoles autophagiques, comme cela a été observé sur les ML4 par l'équipe de Puertollano (Vergarajaregui et al., 2008).

Vu les difficultés rencontrées avec la microscopie électronique à transmission, nous avons fait appel à d'autres techniques : l'immunofluorescence et le Western Blotting pour détecter une éventuelle accumulation des autophagosomes dans les fibroblastes des patients atteints d'une LSD. Pour cela, nous avons utilisé des anticorps anti-LC3B.

## **3.2. Abondance des autophagosomes déterminée grâce à un anticorps anti-LC3B**

La protéine LC3B (*microtubule-associated protein light chain 3*) est présente dans les cellules sous deux formes : l'une est cytosolique, LC3-I, avec un poids moléculaire d'environ 16 kDa et la deuxième forme, LC3-II, est associée à la membrane de l'autophagosome et a un poids moléculaire de 14 kDa (Mizushima and Yoshimori, 2007). Suite à une induction de l'autophagie, la forme soluble LC3-I est clivée et l'attachement d'un phospholipide, le phosphatidyléthanolamine (PE), permet l'insertion de LC3-II à la membrane des autophagosomes en formation (Kabeya et al., 2000). Cette forme lipidée reste associée à la membrane jusqu'à la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes.

Il est à noter que dans les cellules de mammifères, LC3 est exprimée sous 3 isoformes : LC3A, LC3B et LC3C, de distribution tissulaire différente. Seule, l'augmentation de LC3B-II est corrélée avec l'induction de l'autophagie. Il est donc important de choisir un

anticorps dirigé contre LC3B et pas contre LC3A pour les expériences d'immunofluorescence et de Western blotting.

### **3.2.1. Détection de LC3B par microscopie à fluorescence**

Lorsqu'on réalise une immunofluorescence de LC3B à l'état basal, le marquage est généralement diffus car LC3B-I est soluble et distribué partout dans le cytoplasme. Par contre, lorsque l'autophagie est stimulée, de gros points fluorescents apparaissent correspondant à des protéines LC3B associées aux membranes (Vergarajauregui et al., 2008).

Dans nos expériences, en condition basale, les cellules ML CTL montrent surtout un marquage diffus à travers le cytoplasme. Toutefois, dans certaines cellules, on peut observer en outre, quelques gros points fluorescents. Pour savoir si ce marquage était spécifique de LC3B, nous avons réalisé deux contrôles : la privation de sérum et un traitement à la bafilomycine A1. Il est bien connu que la privation de sérum induit l'autophagie tandis que la bafilomycine provoque l'accumulation d'autophagosomes en bloquant la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes (Levine and Kroemer, 2008; Yamamoto et al., 1998). Dans ces deux conditions, on doit observer une réduction du marquage diffus et une augmentation du nombre de vésicules fluorescentes. Comme attendu, après une période de jeûne de 6 h ou après un traitement de 4 h avec 100 nM de bafilomycine A1, les points fluorescents deviennent plus nombreux et plus gros.

Après avoir réalisé ces contrôles, nous avons examiné plus attentivement le marquage obtenu à l'état basal dans les autres lignées cellulaires, puisque le but de notre étude est de comparer l'autophagie basale dans des cellules atteintes d'une surcharge lysosomale par rapport à des cellules contrôles. En accord avec les résultats obtenus dans la littérature (Vergarajauregui et al., 2008), il apparaît clairement que le marquage punctiforme, qui témoigne d'une autophagie plus active, est plus prononcé dans les cellules ML4 que dans les cellules ML CTL (**Fig.3.4**). Par contre, dans les cellules MPS IVB et CLN2<sup>-/-</sup>, il ne semble pas y avoir de différence d'intensité de fluorescence associée à LC3B comparé aux cellules contrôles. Il n'y aurait donc pas d'induction de l'autophagie dans ces cellules à l'état basal. Cette observation a été confirmée dans une autre expérience d'immunofluorescence, réalisée avec un autre anticorps anti-LC3B et en utilisant la microscopie à fluorescence confocale (**Fig.3.5**). Notez que dans toutes les lignées cellulaires, le marquage punctiforme augmente en condition de jeûne ou après un traitement avec la bafilomycine.

### **3.2.2. Détection de LC3B-II par Western Blotting**

#### **3.2.2.1. Validation**

Les formes LC3B-I et LC3B-II peuvent être distinguées sur base de leur migration sur un gel SDS-PAGE suivi d'un immunoblotting. Suite à l'addition d'une phosphatidyléthanolamine, la forme LC3B-II a un poids moléculaire plus élevé que LC3B-I. Cependant, LC3B-II migre plus rapidement sur gel, à cause de son hydrophobicité plus élevée (Mizushima and Yoshimori, 2007).

Au début de notre étude, nous avons testé l'anticorps polyclonal de lapin, utilisé dans l'article de Vergarajauregui et al. (2008). Comme attendu, le premier Western blot, obtenu à partir de lysats totaux de cellules CLN2<sup>-/-</sup>, montrait deux bandes à ~14-16 kDa, correspondant respectivement à LC3B-II et LC3B-I (**Fig.3.6A**). Cependant, l'anticorps détectait aussi des

bandes de poids moléculaire plus élevé. C'est d'ailleurs une autre raison pour laquelle nous avons fait des expériences complémentaires pour valider la détection de LC3B en immunofluorescence (Voir Fig.3.2). Nous avons donc testé un autre anticorps, cette fois un anticorps monoclonal de souris anti-LC3B (nanoTools) conseillé par G. Rommelaere (URBC). Contrairement au premier anticorps, celui-ci ne détecte que les deux bandes aux alentours de 15-20 kDa caractéristiques des protéines LC3B-I et LC3B-II (**Fig.3.6B**). Nous avons donc décidé d'utiliser cet anticorps monoclonal de souris pour les expériences suivantes.

Comme pour l'expérience d'immunofluorescence, les cellules ont subi différents traitements. Dans les cellules incubées dans du milieu complet, la forme LC3B-I est clairement apparente tandis que la bande LC3B-II est peu visible. Après 6 h de jeûne dans un milieu sans sérum, nous observons une diminution de la bande LC3B-I et à l'inverse, une augmentation de l'abondance de LC3B-II. Cependant, lorsque ces cellules sont privées de sérum et ré-incubées ensuite dans un milieu complet, la prédominance de la forme LC3B-I est complètement restaurée (**Fig.3.6B**). Cela peut s'expliquer par une fusion entre les autophagosomes formés durant la période de jeûne et les lysosomes, fusion au cours de laquelle une partie de la forme LC3B-II est dégradée dans les autophagolysosomes. Enfin, comme attendu, nous observons bien une accumulation de la forme LC3B-II dans les cellules traitées avec la bafilomycine. Elle résulte de l'inhibition de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes et donc, de l'inhibition de la dégradation de LC3B-II associée à la membrane des autophagosomes.

Encouragée par ces résultats, nous avons voulu analyser l'abondance de LC3B-II dans nos cinq lignées cellulaires.

### **3.2.2.2. L'abondance de LC3B-II en conditions basale, à jeun ou après traitement avec la bafilomycine A1**

Lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu riche en nutriments, c'est la forme LC3B-I qui prédomine dans la plupart des lignées cellulaires, à l'exception des MPS CTL et MPS IVB où apparemment c'est la forme LC3B-II qui est la bande majoritaire (**Fig.3.7**). Cependant, la qualité de ce gel n'est pas très bonne. Comme attendu, une période de jeûne de 6 h induit une nette augmentation de l'abondance de la forme LC3B-II dans les cellules ML CTL, ML4, MPS CTL et MPS IVB mais curieusement pas dans les CLN2<sup>-/-</sup>. Cela est peut-être lié au fait que nous avons chargé moins de protéines, comme en témoigne le contrôle de charge, réalisé avec un anticorps anti- $\alpha$ -tubuline (**Fig.3.7**).

Nous avons recommencé cette expérience en tenant compte de deux paramètres. D'une part, nous avons essayé de garder un nombre de passage identique (ou presque) entre les cellules atteintes d'une surcharge lysosomale et les cellules contrôles. D'autre part, contrairement à la première expérience, nous avons changé le milieu de culture des cellules en condition basale en même temps que celui des cellules mises à jeun.

Dans cette expérience, la forme LC3B-II est bien visible en condition basale dans toutes les lignées cellulaires (**Fig.3.8**). De plus, comme attendu, elles répondent toutes à une période de jeûne et à un traitement de 6 h à la bafilomycine par une hausse de LC3B-II. Nous avons ensuite calculé l'abondance de LC3B-II en faisant le rapport entre l'intensité des bandes correspondantes à LC3B-II et à l' $\alpha$ -tubuline, comme il est conseillé dans la littérature. Certains auteurs proposent une autre manière de calculer l'abondance de LC3B-II : ((LC3B-I + LC3B-II)/LC3B-II) mais la première méthode reste la plus souvent utilisée.



Le rapport LC3B-II/ $\alpha$ -tubuline a été déterminé pour chaque condition et pour chaque lignée cellulaire. La quantification indique que dans les cellules ML CTL placées dans un milieu appauvri en nutriments, l'intensité normalisée de la bande LC3B-II est 4,6 fois augmentée par rapport à la bande LC3B-II de ces mêmes cellules en condition basale. Dans les autres lignées cellulaires, l'augmentation de LC3B-II est de 2,8 fois dans les ML4, de 6,3 fois dans les MPS IVB et de 3,5 dans les CLN2<sup>-/-</sup>. Ces chiffres sont toutefois à prendre avec précaution parce que, dans le premier gel, l'augmentation dans les MPS CTL est de 2,9 fois alors que dans le deuxième gel, avec les mêmes échantillons, nous avons obtenu une augmentation de 6,5 fois. Cela est peut-être lié à une saturation des films d'autoradiographie. Les bandes LC3B-II après 6 h de traitement avec 10 nM de bafilomycine sont encore plus intenses. Dans les ML CTL, l'intensité normalisée de la bande LC3B-II est 13,5 fois plus élevée par rapport à la condition basale. L'augmentation est de 5,2 fois dans les ML4, de 4,1 (ou 8,0) dans les MPS CTL, de 11,8 fois dans les MPS IVB et de 5,4 fois dans les CLN2<sup>-/-</sup>.

Les résultats de ces deux expériences reflètent l'augmentation du nombre d'autophagosomes lorsque l'autophagie est stimulée par un jeûne ou lorsqu'elle est inhibée par la bafilomycine A1. Cette augmentation se produit aussi bien dans les fibroblastes des patients atteints d'une surcharge lysosomale que dans les fibroblastes contrôles.

De plus, il semblerait qu'en condition basale, il y ait une augmentation d'environ 3 fois de LC3B-II dans les ML4 par rapport ML CTL ainsi qu'une légère augmentation dans les CLN2<sup>-/-</sup> comparées aux MPS CTL. Par contre, dans les MPS IVB, il y aurait une diminution par rapport aux MPS CTL. Pour y voir plus clair, nous avons déposé d'autres échantillons provenant de cellules traitées dans les conditions basales uniquement.

### **3.2.2.3. Abondance de LC3B-II en condition basale**

Nous pouvons constater une augmentation de LC3B-II dans les ML4 par rapport aux ML CTL après 6 h d'incubation en présence de milieu complet (**Fig.3.9A**). La quantification de l'intensité des bandes correspondant à LC3B-II et à l' $\alpha$ -tubuline a révélé une augmentation de l'abondance normalisée de LC3B-II de 8,6 fois dans les ML4 comparée aux cellules contrôles et une diminution d'un facteur 2 dans les MPS IVB ainsi que dans les CLN2<sup>-/-</sup> comparée aux MPS CTL.

L'expérience a été répétée sur d'autres échantillons provenant de cellules cultivées cette fois pendant 24 h dans un milieu complet. Dans ces conditions, l'augmentation de LC3B-II dans les ML4 par rapport aux ML CTL s'est confirmé. De plus, nous observons clairement une diminution de LC3B-II dans les MPS IVB et dans les CLN2<sup>-/-</sup> par rapport aux MPS CTL (**Fig.3.9B**). Toutefois, il faut bien admettre que la forme LC3B-II est particulièrement abondante dans les MPS CTL.

Ces résultats montrent une augmentation systématique de LC3B-II dans les cellules ML4 par rapport aux cellules contrôles et suggèrent, en accord avec la littérature (Vergarajauregui et al., 2008), une augmentation du nombre d'autophagosomes en condition basale. Par contre, dans les MPS IVB et les CLN2<sup>-/-</sup>, nous observons plutôt une diminution de LC3B-II, ce qui suggère que l'accumulation des autophagosomes ne se produit pas dans ces cellules provenant de patients atteints de MPS IVB ou de CLN2<sup>-/-</sup>.

#### **3.2.2.4. Cinétique d'accumulation de la protéine LC3B-II au cours du temps en condition basale**

Lors de la dernière étape du processus autophagique i.e., la fusion des autophagosomes avec les lysosomes, nous savons que la protéine LC3B-II est dégradée ou dissociée de la membrane des autophagosomes (Kabeya et al., 2000). C'est pourquoi, il est dangereux d'évaluer l'autophagie en se basant uniquement sur la quantité de LC3B-II dans les lysats cellulaires, à un moment donné. Nous avons donc réalisé une cinétique de l'autophagie basale au cours du temps dans les cellules atteintes d'une surcharge lysosomale et dans les cellules contrôles. Les cellules ont été lysées après être restées pendant 6-18-28 ou 49 h dans un milieu complet. Signalons que nous avons dû recommencer les Western blots plusieurs fois car, pour une raison encore inconnue, la bande LC3B-II n'apparaissait plus ou la séparation des protéines n'était pas satisfaisante. Nous pensons que ces difficultés sont liées à la taille et à la nature hydrophobe de la protéine et/ou au volume de tampon de lyse présent dans nos échantillons. Pour résoudre ce problème, nous avons essayé de concentrer les protéines en lysant les cellules dans un plus petit volume et en déposant sur les gels seulement 10 µg de protéines. Finalement, nous avons à nouveau obtenu des Western blots de bonne qualité mais la proportion de la forme LC3B-I par rapport à LC3B-II s'est révélée être beaucoup plus élevée que lors des premières manipulations (**Fig.3.10A**).

Les Western blots montrent une augmentation de l'intensité de la bande LC3B-II au cours du temps dans les ML CTL, les ML4, les MPS CTL et les CLN2<sup>-/-</sup>. Dans les MPS IVB, il y a une augmentation après 18 h de l'abondance de LC3B-II suivie d'une diminution pour les temps 28 et 49 h. Cette expérience doit être refaite afin de voir si ces observations se confirment.

Sur base des quantifications, nous pouvons d'abord dire qu'il y a plus de LC3B-II dans les ML4 que dans les ML CTL, sauf pour le temps 18 h. Deuxièmement, il y a un peu moins de LC3B-II dans les MPS IVB que dans les MPS CTL après 6 et 18 h d'incubation et forcément après 28 et 49 h d'incubation. Enfin, quelque soit le temps d'incubation dans un milieu complet, il y a bien une augmentation de LC3B-II dans les cellules CLN2<sup>-/-</sup> en fonction du temps mais elle semble plus progressive que dans les MPS CTL (**Fig.3.10B**).

Vu l'absence d'accumulation de LC3B-II dans les MPS IVB après les temps les plus longs, cette expérience vaudrait la peine d'être refaite. Sur base de ces résultats préliminaires, il semble que l'autophagie basale soit plus élevée dans les ML4 alors qu'elle est plus faible dans les MPS IVB et dans les CLN2<sup>-/-</sup>.

### **3.3. Le flux autophagique déterminé par la dégradation des protéines de longue durée de vie**

Etudier l'autophagie n'est pas simplement mesurer une augmentation de l'association membranaire de LC3B ou du nombre d'autophagosomes. En effet, l'autophagie est un processus dynamique et continu, on parle d'ailleurs de flux autophagique. Cela réfère au processus complet de l'autophagie depuis la formation des autophagosomes jusqu'à l'arrivée du cargo dans les autophagolysosomes et sa dégradation (Klionsky et al., 2008a).

Il est donc essentiel de distinguer d'une part, l'accumulation des autophagosomes ou de LC3B-II à un temps donné et d'autre part, le flux autophagique. Celui-ci peut être étudié en mesurant la dégradation des protéines de longue durée de vie (Klionsky et al., 2008a).

### **3.3.1. L'état basal**

Au cours de la première expérience, les cellules ont été marquées pendant 24 h avec de la valine radioactive, suivi d'une courte puis d'une longue périodes de chasse. Lors de cette dernière période, les cellules ont été incubées en présence ou non de 3-méthyladénine (3-MA). Rappelons que la 3-MA est un inhibiteur de la macroautophagie qui agit au niveau du complexe de la PI3K III. L'utilisation de la 3-MA permet de distinguer le pourcentage de protéines dégradées par la macroautophagie par rapport aux protéines dégradées par d'autres systèmes protéolytiques (le protéasome, la microautophagie, l'autophagie médiée par les chaperones et la dégradation lysosomale après endocytose) (Fuertes et al., 2003).

Le but de cette expérience était tout d'abord, de déterminer le pourcentage de protéines de longue durée de vie dégradées par macroautophagie au sein des différentes lignées cellulaires, cultivées dans des conditions basales. Un deuxième objectif était de tracer une cinétique dans le temps du flux autophagique pour chaque lignée cellulaire et de souligner, s'il y en a, les différences entre les cellules atteintes d'une surcharge lysosomale et les cellules contrôles.

Pour chaque lignée cellulaire, le pourcentage de dégradation des protéines de longue durée de vie a été calculé comme décrit dans le chapitre « Matériels & Méthodes » (voir paragraphe 2.8). Comme attendu, nous pouvons remarquer une augmentation de la dégradation des protéines au cours du temps dans toutes les lignées cellulaires cultivées en condition basale. Cependant, seulement un faible pourcentage est dû à la macroautophagie puisque l'effet de la 3-MA est très peu marqué après 24 h dans les ML CTL, les ML4, les MPS CTL et les MPS IVB. Par contre, dans les CLN2<sup>-/-</sup>, l'effet de la 3-MA est déjà marqué après 6 h et plus encore après 18 h d'incubation. Dans les MPS CTL, curieusement, nous constatons qu'il n'y a pas d'autophagie après 24 h d'incubation (**Fig.3.11**).

Afin de connaître le pourcentage des protéines dégradées par la macroautophagie, nous avons fait la différence entre le pourcentage des protéines dégradées sans la 3-MA et avec la 3-MA, comme recommandé dans la littérature (Chan et al., 2007; Pattingre et al., 2005) (**Fig.3.11**). Après 6 h, et quelque soit la lignée cellulaire, il ne semble pas y avoir de protéines dégradées par macroautophagie, sauf dans les CLN2<sup>-/-</sup> où l'on obtient 1 % de dégradation. Dans les cellules ML4, nous obtenons 2,0 et 7,7 % après 16 h et 24 h, respectivement tandis que dans les ML CTL, nous obtenons 1,5 et 4,0 % après les mêmes temps. Le flux autophagique serait donc légèrement augmenté dans les ML4 par rapport aux cellules contrôles après 16 et 24 h d'incubation. À 16 h, le pourcentage de dégradation par macroautophagie est de 2,6 % dans les MPS CTL et de 2,3 % dans les MPS IVB mais après 24 h, il est de 0 % dans les MPS CTL et de 4,4 % dans les MPS IVB.

Pour les CLN2<sup>-/-</sup>, quelque soit le temps d'incubation, il y a une nette augmentation de la macroautophagie par rapport aux MPS CTL et aux ML CTL. En effet, le pourcentage de dégradation par macroautophagie est de 1,0, 4,4 et 7,0 %, respectivement après 6, 16 et 24 h d'incubation en présence de milieu complet.

Nous avons fait le même genre d'expérience avec des cellules soumises à une période de jeûne, de façon à valider notre procédure.

### **3.3.2. L'état de jeûne**

Lors de cette expérience, les cellules ont été mises à jeun dans de l'EBSS pendant des temps croissants (0, 2, 4, et 6 h). Comme dans l'expérience précédente, nous observons une augmentation de la dégradation des protéines de longue durée de vie au cours du temps et

dans toutes les lignées cellulaires (**Fig.3.12**). Le jeûne induit bien une induction de l'autophagie puisque nous constatons un effet plus marqué de la 3-méthyladénine dans toutes les lignées cellulaires. Ainsi, après 2 h d'incubation dans de l'EBSS, nous obtenons entre 2 et 3 % de dégradation, ce qui est conforme aux 4 % publiés dans l'article de Chan et al. (2007). De plus, après 6 h de jeûne dans l'EBSS, le pourcentage de dégradation varie entre 7,7 et 10,1 % dans les différentes lignées cellulaires alors qu'en condition basale, dans le milieu complet, nous avons eu maximum 1 % de dégradation et uniquement dans les CLN2<sup>-/-</sup>. Rappelons que pour qu'il y ait dégradation des protéines de longue durée de vie, il faut qu'il y ait une fusion entre les autophagosomes et les lysosomes. Or ici, elle ne semble pas être compromise quelque soit la lignée cellulaire « saine » ou « malade ». En effet, en général, nous trouvons peu de différences entre les cellules atteintes d'une surcharge lysosomale et les cellules contrôles. L'augmentation massive observée dans les ML CTL après 4 h de jeûne est probablement due à une erreur de manipulation. Après 6 h de jeûne, le pourcentage de dégradation est augmenté pour toutes les lignées cellulaires, excepté dans les ML4 et les CLN2<sup>-/-</sup> où il est diminué.

Suite à ces deux expériences, nous constatons que peu de protéines de longue durée de vie sont dégradées par macroautophagie. Pour savoir par quel(s) autre(s) mécanisme(s) ces protéines étaient dégradées, nous avons réalisé une expérience de dégradation des protéines marquées avec de la valine-C<sup>14</sup> en utilisant différents inhibiteurs des voies de dégradation lysosomale et du protéasome.

### **3.3.3. Utilisation d'inhibiteurs de la dégradation des protéines à l'état basal**

Dans cette expérience, les cellules ont été incubées durant 24 h dans un milieu complet en présence ou non de différents inhibiteurs des principales voies de dégradation.

Le chlorure d'ammonium ou NH<sub>4</sub>Cl est une base faible et un agent lysosomotrope qui augmente le pH des lysosomes et des endosomes. Il perturbe non seulement l'activité des hydrolases lysosomales mais aussi leur trafic intracellulaire car l'augmentation de pH empêche le recyclage du récepteur au mannose 6-phosphate des endosomes vers le TGN (Gonzalez-Noriega et al., 1980). Les enzymes sont donc envoyées à la membrane plasmique par défaut. Dans cette expérience, nous avons couplé le NH<sub>4</sub>Cl 10 mM avec de la leupeptine 250 µM, un inhibiteur des sérines protéases, pour bloquer complètement la dégradation lysosomale. Parmi les nombreux inhibiteurs du protéasome, nous avons choisi le MG132 (ou carbobenzoxy-L-leucyl-L-leucyl-L-leucinal) car il est capable de traverser les membranes. De plus, il est puissant et sélectif (son Ki est de 4 nM). La 3-méthyladénine a aussi été utilisée comme inhibiteur spécifique de la macroautophagie. Enfin, la bafilomycine A1 a été utilisée pour « sa double action » car non seulement elle augmente le pH intralysosomal mais aussi elle inhibe la macroautophagie en bloquant la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Yamamoto et al., 1998).

Pour obtenir des résultats les plus fiables possibles, il est indispensable d'utiliser une concentration saturante d'inhibiteur. Pour la plupart des inhibiteurs, nous avons choisi des concentrations sur base des données de la littérature (Gonzalez-Noriega et al., 1980; Hasilik and Neufeld, 1980). Pour la bafilomycine, nous avons testé différentes concentrations (10, 25, 50 et 100 nM) en nous basant sur l'accumulation de LC3B-II en Western blotting car une concentration saturante dans un type cellulaire ne l'est pas nécessairement dans un autre type cellulaire (Rubinsztein et al., 2009).

Nous avons testé des concentrations croissantes de bafilomycine pendant 6 h sur une lignée cellulaire, les ML CTL (**Fig.3.13**). Le blot montre que l'intensité maximale de la bande LC3B-II est obtenue avec 25 nM de bafilomycine. Nous avons donc choisi cette concentration dans notre expérience de dégradation des protéines de longue durée de vie.

L'expérience de dégradation des protéines marquées à la valine- $C^{14}$  a été réalisée sur les cellules ML4. Dans cette expérience, nous avons fait un contrôle avec du DMSO 0.1 %, c'est le solvant dans lequel sont dilués la bafilomycine et le MG 132. Il permet de s'assurer de la spécificité de l'effet causé par ces deux inhibiteurs. Le pourcentage de dégradation des protéines a été calculé pour chaque condition. En général, les effets des inhibiteurs sont bien marqués car nous observons bien une diminution du pourcentage de dégradation des protéines, sauf pour la 3-MA où son effet est faible. Dans les ML4 incubées en absence d'inhibiteurs, 42 % des protéines sont dégradées après 24 h dans un milieu normal. Cette valeur est similaire à nos premiers résultats où 38,1 % des protéines radiomarquées des protéines étaient dégradées. Lorsque les cellules sont incubées en présence de 3-MA 10 mM, 36,5 % des protéines sont dégradées. Autrement dit, conformément aux résultats obtenus précédemment (**Fig.3.11**), seulement 5,5 % des protéines sont dégradées par macroautophagie. Les pourcentages d'inhibition sont plus importants dans les cellules incubées en présence des autres inhibiteurs de la dégradation. Nous avons aussi observé une diminution de 19,4 % ; 14,8 % et 18,6 % avec respectivement le  $NH_4Cl$  10 mM/leupeptine 250  $\mu M$ , la bafilomycine 25 nM et le MG132 1 $\mu M$  (**Fig.3.14**).

Autrement dit, il semblerait que parmi les 42 % des protéines dégradées dans les ML4, maintenues pendant 24 h en condition basale, la moitié est dégradée par le protéasome et l'autre moitié par les lysosomes. Parmi les 20 % de protéines dégradées dans les lysosomes, il y a 5,5 % qui sont dégradées par la macroautophagie. Le reste pourrait être dégradé par l'autophagie médiée par les chaperones, microphagie ou après recapture par endocytose.

#### **3.3.4. L'état basal avec du Tran $^{35}S$ label**

Etant donné les faibles pourcentages de dégradation après 24 h d'incubation dans un milieu riche en nutriments, nous avons décidé de refaire une expérience avec des temps d'incubation plus longs. Malheureusement, la firme MP Biochemicals qui nous avait fourni la valine- $C^{14}$  a décidé d'arrêter la production et les autres firmes contactées n'en commercialisaient pas. Par conséquent, nous avons dû choisir un autre acide aminé radioactif. Nous avons évité la leucine qui est souvent utilisée dans ce genre d'expérience, car il a été montré qu'elle inhibait la macroautophagie dans des hépatocytes (Seglen et al., 1980). Nous avons donc utilisé du Tran $S^{35}$  label. C'est un extrait de bactéries cultivées en présence de  $^{35}SO_4$ . Il est constitué en outre de  $\geq 70$  % de L-méthionine- $S^{35}$  et de  $\leq 15$  % de L-cystéine- $S^{35}$ . Pour cette expérience, nous avons fait une cinétique du flux autophagique à l'état basal sur toutes les lignées cellulaires, après 15, 25 et 46 h d'incubation. Les cellules ont été placées dans un milieu complet en présence ou non de 3-MA 10 mM (**Fig.3.15**).

En général, et pour une raison non encore élucidée, les pourcentages de dégradation à l'état basal sont plus élevés ici que dans les expériences réalisées avec la valine- $C^{14}$ . Deuxièmement, dans toutes les lignées cellulaires, les pourcentages de dégradation varient entre 23 et 39 % et entre 76 et 100 % après, respectivement, 15 et 25 h d'incubation en condition basale. Il y a donc bien une augmentation de la dégradation des protéines de longue durée de vie entre 15 et 25 h d'incubation. Cependant, ce pourcentage chute complètement après 46 h d'incubation, quelque soit la lignée cellulaire.

Si nous regardons à présent, le pourcentage de dégradation des protéines uniquement due à la macroautophagie, dans les fibroblastes des patients atteints d'une maladie de surcharge lysosomale et dans les fibroblastes contrôles, nous constatons qu'après 15 h d'incubation, elle n'intervient pas, excepté pour les ML4 et les CLN2<sup>-/-</sup> où le pourcentage de dégradation par macroautophagie est de 13,0 % et 3,8 %, respectivement. La macroautophagie intervient surtout après 25 h d'incubation. Après cette période, on obtient en effet, 22,5 % et de 15,5 % de dégradation en présence de 3-MA dans les ML4 et les ML CTL, respectivement. Dans les MPS IVB, 42,6 % des protéines sont dégradées par macroautophagie contre 18 % dans les MPS CTL. Enfin, dans les CLN2<sup>-/-</sup>, il est de 43,9 %.

En conclusion, les deux expériences réalisées à l'état basal avec le marquage des cellules avec la valine-C<sup>14</sup> ou avec la mixture méthionine/cystéine-S<sup>35</sup> suggèrent qu'il y a une augmentation du flux autophagique dans les ML4 par rapport aux ML CTL, de même dans les CLN2<sup>-/-</sup> par rapport aux MPS CTL. En ce qui concerne les MPS IVB et les MPS CTL, les résultats sont plus difficiles à interpréter. Après 15 h de marquage avec la valine-C<sup>14</sup> ou avec la mixture méthionine/cystéine-S<sup>35</sup>, nous obtenons des résultats similaires dans les cellules atteintes de surcharge lysosomale et dans les cellules contrôles. Par contre, après 25 h, il ne semble pas y avoir d'augmentation de la macroautophagie dans les MPS IVB par rapport aux MPS CTL lors du marquage avec la valine-C<sup>14</sup> alors qu'il y a une forte augmentation lors du marquage avec du TranS<sup>35</sup> label. Cette expérience devrait absolument être recommencée pour pouvoir tirer une conclusion.

### **3.4. Mitophagie à l'état basal ou après un jeûne**

Comme déjà évoqué précédemment, l'autophagie est la principale voie de dégradation des organites endommagés, notamment les mitochondries. Un processus autophagique perturbé peut donc conduire à une accumulation de mitochondries anormales (altérées). Cette hypothèse a été avancée par le groupe de Kiselyov pour expliquer l'accumulation de mitochondries fragmentées dans des fibroblastes de patients atteints de LSDs, dont la mucopolysaccharidose IV et la lipofuscinose céréoïde neuronale de type 2 (Jennings et al., 2006).

L'idée était de faire un marquage avec un anticorps dirigé contre une protéine mitochondriale et avec un anticorps dirigé contre une protéine lysosomale et de voir si ces deux marquages se superposaient, au moins localement, comme décrit dans la littérature (Kristensen et al., 2008). Le premier problème auquel nous avons été confronté était de trouver des anticorps produits dans deux espèces différentes. Ensuite, nous avons testé des anticorps disponibles en URBC et en URPHYM et dirigés soit contre des protéines mitochondriales (Tom 40 et COX-1) soit contre des protéines lysosomales (LAMP-1 et cathepsine D). Malheureusement, dans nos cellules et dans les conditions expérimentales utilisées, les anticorps anti-Tom 40 (Santa Cruz Biotechnology, sc-11414) et anti-cathepsine D (Santa Cruz Biotechnology, sc-6487) n'ont pas permis de détecter d'intensité suffisante. Les anticorps anti-COX-1 (Invitrogen) et anti-LAMP-1 (Developmental Studies Hybridoma Bank, H4A3) étant tous les deux des anticorps monoclonaux de souris, nous n'avons pas pu les utiliser ensemble.

Finalement, nous avons réalisé un double marquage avec un anticorps monoclonal de souris anti-COX-1 (COX-1 étant une sous-unité de la cytochrome c oxydase mitochondriale) et avec un anticorps anti-LC3B de lapin, afin de déterminer s'il y avait une co-localisation partielle entre des mitochondries et des autophagosomes.

Sur les cellules incubées avec l'anticorps anti-COX-1, nous pouvons observer un marquage distribué partout dans le cytoplasme et dans les prolongements cellulaires aussi bien à l'état basal qu'après 2 h de jeûne dans de l'EBSS (**Fig.3.16**). À certains endroits, on peut deviner un marquage réticulaire, témoignant de la capacité des mitochondries à former un réseau (Chan, 2006). Les images ne nous permettent pas de dire s'il y a une accumulation des mitochondries fragmentées dans les ML4 et dans les CLN2<sup>-/-</sup>, comme cela a été décrit dans la littérature (Jennings et al., 2006). En ce qui concerne le marquage LC3B, à l'état basal, on retrouve le marquage diffus, déjà observé précédemment dans la plupart des lignées cellulaires sauf dans les cellules ML4 où l'on détecte assez bien de gros points fluorescents. Après 2 h de jeûne dans de l'EBSS, le nombre de vésicules fluorescentes augmente partout, sauf apparemment dans les CLN2<sup>-/-</sup> (**Fig.3.16**). Sur les images superposées, étant donné la structure réticulaire des mitochondries, il n'est pas possible de voir une éventuelle co-localisation entre les mitochondries et les autophagosomes (**Fig.3.16**). Il faudrait absolument faire de la microscopie électronique pour observer des événements de mitophagie.

## 4. Discussion et Perspectives

Les maladies de surcharge lysosomale forment un groupe de maladies métaboliques héréditaires, caractérisées par l'accumulation intralysosomale de macromolécules non-métabolisées (Platt and Walker, 2004). Ce sont toutes des maladies autosomiques récessives, excepté la maladie de Fabry et la MPS de type II (syndrome de Hunter). Il est possible de les classer en fonction de la nature du principal composé qui s'accumule. Ainsi, on peut avoir des lipidoses, des mucopolysaccharidoses, des glycogénoses, des mucopolipidoses, des oligosaccharidoses et des lipofuscinoses neuronales céroïdes. La plupart d'entre elles sont dues à une déficience en une hydrolase lysosomale mais certaines sont dues à une déficience en une protéine membranaire (LAMP-2 ou un transporteur). Les maladies les plus sévères surviennent à un âge précoce et sont souvent associées à une neurodégénérescence. Par contre, les maladies qui surviennent à l'âge adulte sont moins graves et concernent principalement les tissus périphériques, comme le foie et la rate.

Au cours de ces 25 dernières années, les recherches se sont focalisées sur la génétique des maladies de surcharge lysosomale. Ainsi, des progrès considérables ont été réalisés concernant l'identification des défauts enzymatiques, le clonage et l'identification du gène responsable de la maladie et la caractérisation des mutations. Cependant, nos connaissances sur les événements importants conduisant de la mutation à l'apparition des symptômes restent encore parcellaires. Cela doit impliquer des mécanismes non seulement au niveau cellulaire mais aussi dans les tissus et les organes (Ballabio and Gieselmann, 2009 ; Futerman and van Meer, 2004).

Au niveau cellulaire, plusieurs mécanismes pathogénétiques ont été découverts. Ils impliquent des altérations de voies de signalisation, de l'homéostasie du calcium intracellulaire, de la biosynthèse des lipides et du trafficking (Ballabio and Gieselmann, 2009). Depuis quelques années, il y a un regain d'intérêt pour le rôle de l'autophagie dans la pathogenèse des maladies de surcharge lysosomale.

Plusieurs études ont en effet montré une stimulation de l'autophagie basale dans plusieurs maladies de surcharge lysosomale. Les premières preuves ont été fournies par des études réalisées sur des cellules de patients atteints de la maladie de Danon (Nishino, 2006). Cette maladie est causée par des mutations du gène codant pour la protéine membranaire LAMP-2. Comme il a été décrit dans l'introduction de ce travail, les protéines LAMP-2 sont plus que des simples constituants membranaires, ils jouent un rôle dynamique dans la macroautophagie, l'autophagie médiée par les chaperones ainsi que dans la phagocytose (Eskelinen et al., 2003). En effet, des études réalisées sur des souris déficientes pour LAMP-2 ont montré une accumulation importante de vacuoles autophagiques précoces dans plusieurs tissus. L'accumulation de ces autophagosomes précoces, observée chez ces souris ainsi que chez les patients atteints de la maladie de Danon, pourrait éventuellement s'expliquer par un défaut de la maturation des autophagosomes (Eskelinen et al., 2002). Par la suite, une accumulation de vacuoles autophagiques a aussi été observée chez des patients atteints de la maladie de Pompe, d'une déficience multiple en sulfatases (MSD), de la mucopolysaccharidose IIIA, de la gangliosidose de type GM1, de la maladie de Niemann-Pick de type C (NPC), et de la mucopolipidose de type IV. De même, une accumulation d'autophagosomes a été observée dans les neurones de modèles murins de lipofuscinoses céroïdes neuronales (NCL) (Cao et al., 2006; Fukuda et al., 2006; Ko et al., 2005; Koike et al., 2005; Settembre et al., 2008; Takamura et al., 2008; Vergarajauregui et al., 2008).



Cette accumulation d'autophagosomes dans les maladies de surcharge lysosomale pourrait résulter soit d'une induction de l'autophagie, soit d'un défaut dans la maturation des autophagosomes. Dans certaines LSDs, comme la maladie de Niemann-Pick de type C, la GM1 gangliosidose, des lipofuscinoses céréoïdes neuronales, il a été démontré que l'autophagie est activée, comme en témoigne l'augmentation de l'abondance de la bécline-1, une protéine qui est activée au cas d'induction de l'autophagie. Dans d'autres LSDs, comme la maladie de Danon, la mucopolipidose IV, les MPS-III A et la MSD, on a constaté un blocage partiel de la maturation des autophagosomes. Selon un modèle émergent, le stockage de matériel dans les lysosomes affecterait l'efficacité de fusion entre les autophagosomes et les lysosomes. Cela ralentirait la dégradation des agrégats protéiques polyubiquitylés et des mitochondries non fonctionnelles. Ces substrats de l'autophagie s'accumuleraient dans la cellule et *in fine* provoqueraient la mort cellulaire. Pour éviter d'en arriver là, l'autophagie pourrait être induite par un mécanisme compensatoire (Ballabio and Gieselmann, 2009).

Le but de notre travail était d'étudier l'autophagie basale dans des fibroblastes de peau de patients atteints de la mucopolysaccharidose IVB et de la lipofuscinoses céréoïde neuronal de type 2 par rapport à des fibroblastes contrôles provenant d'adultes non atteints. Pour cela, nous avons utilisé comme contrôles positifs, des fibroblastes de patients souffrant de mucopolipidose IV, dans lesquels l'équipe de Puertollano a montré une augmentation de l'autophagie basale (Vergarajauregui et al., 2008).

Dans la première partie de notre travail, nous avons analysé la morphologie des fibroblastes par immunofluorescence. Nous espérions observer une différence de la taille des lysosomes entre les cellules des patients atteints d'une surcharge lysosomale et les cellules contrôles. L'immunomarquage réalisé contre la protéine LAMP-1 a montré que les organites positifs pour LAMP-1 étaient concentrés dans la région périnucléaire mais il n'a pas permis pas de mettre en évidence un gonflement des lysosomes dans les cellules MPS IVB, ML4 ou CLN2<sup>-/-</sup> par rapport aux cellules MPS CTL et ML CTL. La résolution de la microscopie à fluorescence n'est probablement pas suffisante pour voir des différences aussi subtiles. Pour cela, il faut recourir à la microscopie électronique. Pour des raisons techniques, nous n'avons malheureusement pas pu observer toutes les cellules en microscopie électronique à transmission. Toutefois, sur les photos des cellules MPS CTL et MPS IVB que nous avons prises, il ne semble pas y avoir d'accumulation de vacuoles d'autophagie dans les cellules MPS IVB par rapport aux cellules MPS CTL, contrairement à ce que l'équipe de Puertollano avait clairement observé dans les fibroblastes des patients atteints de la mucopolipidose IV (ML4) (Vergarajauregui et al., 2008).

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons réalisé une série d'expériences d'immunofluorescence et de Western blotting afin de déterminer l'abondance de la protéine LC3B-II, marqueur des autophagosomes.

Dans les fibroblastes contrôles cultivés dans un milieu contenant du sérum, le marquage de LC3B en immunofluorescence était diffus et distribué partout dans tout le cytoplasme. Par contre, dans les cellules ML4, comme attendu, nous avons observé une augmentation du nombre de gros points fluorescents, témoins de la conversion de LC3B-I cytosolique en LC3B-II membranaire. En ce qui concerne les cellules MPS CTL, MPS IVB et CLN2<sup>-/-</sup>, le marquage était principalement diffus, même si dans certaines cellules, des points fluorescents apparaissaient également. Il ne semble donc pas y avoir d'induction de l'autophagie basale dans les MPS IVB et les CLN2<sup>-/-</sup> comparées aux cellules contrôles. Toutefois, toutes les lignées cellulaires sont capables de stimuler l'autophagie lorsqu'elles sont privées de sérum pendant 6 h. En effet, après une période de jeûne, le marquage diffus est remplacé en grande

partie par les gros points fluorescents. Ceux-ci sont encore plus visibles lorsque les cellules sont incubées en présence de bafilomycine, une molécule qui bloque la fusion des autophagosomes avec les lysosomes et qui empêche la dégradation lysosomale.

Les résultats de Western blotting corroborent les observations faites en immunofluorescence. En effet, en condition basale, nous avons systématiquement observé une augmentation de la forme LC3B-II dans les cellules ML4 par rapport aux cellules ML CTL, alors que dans les cellules MPS IVB et CLN2<sup>-/-</sup>, la quantité de LC3B-II était plus faible que dans les cellules MPS CTL. Cependant, après une période de jeûne, la quantité de LC3B-II augmentait dans tous les lysats cellulaires et cette augmentation était encore plus importante après une incubation en présence de bafilomycine. Cela signifie que la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes n'est pas complètement bloquée.

Rappelons qu'une augmentation de la forme LC3B-II en Western Blot peut provenir soit d'une induction de l'autophagie soit d'un problème de fusion entre les autophagosomes et les lysosomes. Pour distinguer ces deux possibilités, on peut incuber les cellules avec de la bafilomycine (Rubinsztein et al., 2009). Si on observe une augmentation de LC3B-II en présence de bafilomycine dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles, l'accumulation de LC3B-II est due à une augmentation de la formation des autophagosomes dans les cellules traitées. À l'inverse, si on observe une diminution de LC3B-II en présence de bafilomycine dans les cellules traitées par rapport aux cellules contrôles, l'accumulation de LC3B-II est due à une inhibition de la dégradation (Rubinsztein et al., 2009).

Nous avons appliqué cette procédure avec les résultats de l'expérience décrite à la figure 3.8. Nous avons d'abord calculé le rapport entre les cellules atteintes d'une surcharge lysosomale traitées avec la bafilomycine et les cellules contrôles aussi traitées avec la bafilomycine. Nous constatons qu'il y a juste une légère augmentation dans les ML4 et dans les CLN2<sup>-/-</sup> mais pas de différence dans les MPS IVB, par rapport aux cellules contrôles correspondantes. Dès lors, il est possible que l'augmentation des bandes LC3B-II dans les cellules ML4 et CLN2<sup>-/-</sup> soit due à une faible induction de l'autophagie et donc à une augmentation de la formation des autophagosomes. Si maintenant nous calculons le rapport entre les cellules traitées et non-traitées avec la bafilomycine, cela permet d'avoir une idée sur la dégradation des autophagosomes (Rubinsztein et al., 2009). Celle-ci est nettement diminuée dans les ML4 par rapport aux cellules ML CTL, indiquant que l'augmentation de la LC3B-II résulte non seulement d'une faible induction mais aussi d'une inhibition de la dégradation des autophagosomes. Ceci est parfaitement en accord avec les résultats de Vergarajauregui et al. (2008) et pourrait expliquer pourquoi des mitochondries fragmentées s'accumulent dans ces cellules ML4 (Jennings et al., 2006).

En appliquant les mêmes formules avec les autres lignées cellulaires, on constate que, dans les cellules CLN2<sup>-/-</sup>, la dégradation des autophagosomes est du même ordre de grandeur que dans les cellules MPS CTL. Par contre, dans les cellules MPS IVB, on enregistre une nette augmentation de la dégradation par rapport aux cellules MPS CTL, ce qui suggérerait que la fusion des autophagosomes avec les lysosomes est accélérée dans les cellules atteintes d'une surcharge lysosomale par rapport aux cellules contrôles. Nous ne pouvons pas écarter cette hypothèse, mais nous nous demandons si ce ne sont pas les cellules MPS CTL qui se comportent bizarrement. En effet, si nous examinons de plus près les Western blots réalisés avec les cellules MPS CTL cultivées en condition basale (Fig. 3.8 et 3.9), nous constatons que la quantité de LC3B-II est supérieure à celle observée dans les ML CTL et parfois même à celle des ML4. Dès lors, il semblerait que les cellules MPS CTL ne constituent pas un

contrôle idéal. C'est vrai que lorsque nous regardons les Western blots de la figure 3.9, nous constatons que la quantité de LC3B-II dans les lysats des cellules MPS IVB et CLN2<sup>-/-</sup> représente dans les deux cas, 83 % de la quantité de LC3B-II obtenue dans les cellules ML CTL alors qu'elle représentait 46 % de la quantité de LC3B-II obtenue dans les cellules MPS CTL. Pour éviter ce genre de confusion, nous aurions dû utiliser comme contrôles, des cellules de patients atteints de MPS IVB ou de CLN2 transfectées avec un plasmide contenant la séquence nucléotidique de la protéine déficiente plutôt que des fibroblastes d'individus sains.

Pour terminer avec cette analyse des Western blots, il ne semble donc pas y avoir d'induction de l'autophagie ni dans les cellules MPS IVB ni dans les cellules CLN2<sup>-/-</sup>.

La dernière série d'expériences a consisté à étudier la dégradation des protéines de longue durée de vie afin de connaître l'importance du flux autophagique dans les cellules souffrant d'une surcharge lysosomale et dans les cellules contrôles. Afin de calculer le pourcentage de dégradation des protéines de longue durée de vie, uniquement dû à la macroautophagie, nous avons utilisé la 3-méthyladénine. Comme attendu sur base de la littérature (Chan et al., 2007; Fuertes et al., 2003), le flux autophagique dans les fibroblastes cultivés en condition basale est très faible. Une expérience réalisée sur les cellules ML 4 incubées en présence de différents inhibiteurs des principales voies de protéolyse, a montré que, sur les 42 % de protéines de longue durée de vie dégradées en 24 h, environ la moitié était dégradée par le protéasome et l'autre moitié par les lysosomes. Et parmi ces ~20 % de protéines dégradées par les lysosomes, seulement 5.5 % étaient dégradées par la macroautophagie. Il faut bien reconnaître que le choix de cellules ML4 pour faire cette manipulation n'était pas des plus judicieux puisque il a été montré que non seulement la macroautophagie mais aussi l'autophagie médiée par les chaperones étaient stimulées dans ces cellules (Venugopal et al., 2009; Vergarajauregui et al., 2008). Cependant, les valeurs que nous avons obtenues sont très similaires à celles que l'on peut trouver dans la littérature (Chan et al., 2007; Fuertes et al., 2003).

Si nous faisons le bilan des deux expériences réalisées à l'état basal, soit avec la valine-C<sup>14</sup>, soit avec un mélange de méthionine-S<sup>35</sup> et de cystéine-S<sup>35</sup>, nous constatons que dans les ML4, il y a une augmentation de la dégradation des protéines de longue durée de vie par rapport aux cellules contrôles. Ce résultat paraît contradictoire par rapport aux résultats de Western blots. En effet, les analyses quantitatives des Western blots semblaient indiquer, en accord avec les résultats de Vergarajauregui et al. (2008) que l'augmentation de la quantité de LC3B-II observée dans les ML4 par rapport aux ML CTL était due, au moins en partie, à un défaut dans la maturation des autophagosomes. Or, si le flux autophagique est augmenté, cela suggère que l'induction de l'autophagie compense largement le défaut dans la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. Nous ne pouvons pas l'exclure mais cela nécessiterait des expériences plus approfondies. Par exemple, on pourrait envisager de mesurer le taux d'expression des protéines Atg impliquées dans la formation des autophagosomes par RT-PCR ou par Western blotting. On pourrait aussi envisager de détecter l'accumulation de protéines polyubiquitinylées telle que p62 qui peuvent également servir d'outil pour mesurer le flux autophagique (Settembre et al., 2008 ; Vergarajauregui et al., 2008).

En ce qui concerne les CLN2<sup>-/-</sup>, nous observons également une augmentation du flux autophagique en condition basale que ce soit par rapport aux MPS CTL ou aux ML CTL. Pour les CLN2<sup>-/-</sup> aussi, ces résultats sont en désaccord avec les résultats du Western Blot présenté à la figure 3.8. De plus, que ce soit avec les cellules CLN2<sup>-/-</sup> ou avec les cellules

ML4, l'augmentation du flux autophagique que nous observons n'est pas compatible avec l'accumulation des mitochondries fragmentées rapportées par Jennings et al. (2006). Etant donné que les résultats obtenus avec les cellules MPS IVB varient d'une expérience à l'autre, il est impossible de tirer des conclusions.

Comme les résultats des tests de dégradation des protéines de longue durée de vie sont en contradiction avec nos résultats de Western blotting, on peut se demander si ces expériences de dégradation ont été réalisées dans de bonnes conditions. Pour nous rassurer, nous avons stimulé l'autophagie par un jeûne. La privation de nutriments induit la macroautophagie afin de permettre la survie cellulaire. En effet, lorsque les nutriments viennent à manquer, les cellules eucaryotes dégradent leurs propres protéines pour générer des acides aminés qui peuvent alimenter la synthèse de nouvelles protéines (Kristensen et al., 2008; Levine and Yuan, 2005). Comme attendu, nous avons constaté une augmentation de la dégradation des protéines de longue durée de vie. Ainsi, après 6 h de jeûne dans l'EBSS, le pourcentage de dégradation variait entre 7,7 et 10,1 % dans les différentes lignées cellulaires alors qu'en condition basale, nous avons obtenu maximum 1 % de dégradation et uniquement dans les CLN2<sup>-/-</sup>. De plus, après 2 h d'incubation dans l'EBSS, nous obtenons entre 2 et 3 % de dégradation, ce qui est conforme aux 4 % publiés dans l'article de Chan et al. (2007). Il n'y a donc pas de raison apparente de rejeter les résultats de ces expériences de dégradation mais il faut bien admettre qu'ils soulèvent plus de questions qu'ils n'en résolvent.

En conclusion, nous pouvons dire que nos expériences d'immunofluorescence et de Western blot confirment une activation de la macroautophagie dans les fibroblastes de patients atteints de la mucopolysaccharidose IV par rapport aux fibroblastes contrôles. Conformément aux expériences de Puertollano, cette activation pourrait s'expliquer par une faible stimulation de l'autophagie et par un défaut de maturation des autophagosomes. Par contre, nos expériences ne nous ont pas permis de montrer une activation de la macroautophagie dans les cellules CLN2<sup>-/-</sup> et dans les cellules MPS IVB puisque, dans ces deux lignées cellulaires, nous n'avons pas observé ni une augmentation du marquage punctiforme caractéristique de la forme membranaire de LC3B en immunofluorescence ni une augmentation de la quantité de LC3B-II en Western blotting. De plus, l'examen des cellules MPS IVB en microscopie électronique à transmission n'a pas révélé d'accumulation d'autophagosomes ou d'organites denses aux électrons.

## 5. Bibliographie

- Bach, G. 2001. Mucopolidosis type IV. *Mol Genet Metab.* 73:197-203.
- Ballabio, A., and V. Gieselmann. 2009. Lysosomal disorders: from storage to cellular damage. *Biochim Biophys Acta.* 1793:684-96.
- Callahan, J.W. 1999. Molecular basis of GM1 gangliosidosis and Morquio disease, type B. Structure-function studies of lysosomal beta-galactosidase and the non-lysosomal beta-galactosidase-like protein. *Biochim Biophys Acta.* 1455:85-103.
- Cao, Y., J.A. Espinola, E. Fossale, A.C. Massey, A.M. Cuervo, M.E. MacDonald, and S.L. Cotman. 2006. Autophagy is disrupted in a knock-in mouse model of juvenile neuronal ceroid lipofuscinosis. *J Biol Chem.* 281:20483-93.
- Chan, D.C. 2006. Mitochondrial fusion and fission in mammals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 22:79-99.
- Chan, E.Y., S. Kir, and S.A. Tooze. 2007. siRNA screening of the kinome identifies ULK1 as a multidomain modulator of autophagy. *J Biol Chem.* 282:25464-74.
- de Duve, C., and R. Wattiaux. 1966. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol.* 28:435-92.
- Dell'Angelica, E.C., V. Shotelersuk, R.C. Aguilar, W.A. Gahl, and J.S. Bonifacino. 1999. Altered trafficking of lysosomal proteins in Hermansky-Pudlak syndrome due to mutations in the beta 3A subunit of the AP-3 adaptor. *Mol Cell.* 3:11-21.
- Dong, X.P., X. Cheng, E. Mills, M. Delling, F. Wang, T. Kurz, and H. Xu. 2008. The type IV mucopolidosis-associated protein TRPML1 is an endolysosomal iron release channel. *Nature.* 455:992-6.
- Eskelinen, E.L., A.L. Illert, Y. Tanaka, G. Schwarzmann, J. Blanz, K. Von Figura, and P. Saftig. 2002. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Mol Biol Cell.* 13:3355-68.
- Eskelinen, E.L., Y. Tanaka, and P. Saftig. 2003. At the acidic edge: emerging functions for lysosomal membrane proteins. *Trends Cell Biol.* 13:137-45.
- Finn, P.F., and J.F. Dice. 2006. Proteolytic and lipolytic responses to starvation. *Nutrition.* 22:830-44.
- Forgac, M. 2007. Vacuolar ATPases: rotary proton pumps in physiology and pathophysiology. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:917-29.
- Fuertes, G., A. Villarroya, and E. Knecht. 2003. Role of proteasomes in the degradation of short-lived proteins in human fibroblasts under various growth conditions. *Int J Biochem Cell Biol.* 35:651-64.
- Fukuda, T., A. Roberts, M. Ahearn, K. Zaal, E. Ralston, P.H. Plotz, and N. Raben. 2006. Autophagy and lysosomes in Pompe disease. *Autophagy.* 2:318-20.
- Futerman, A.H., and G. van Meer. 2004. The cell biology of lysosomal storage disorders. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:554-65.
- Ghosh, P., N.M. Dahms, and S. Kornfeld. 2003. Mannose 6-phosphate receptors: new twists in the tale. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:202-12.
- Golabek, A.A., and E. Kida. 2006. Tripeptidyl-peptidase I in health and disease. *Biol Chem.* 387:1091-9.
- Gonzalez-Noriega, A., J.H. Grubb, V. Talkad, and W.S. Sly. 1980. Chloroquine inhibits lysosomal enzyme pinocytosis and enhances lysosomal enzyme secretion by impairing receptor recycling. *J Cell Biol.* 85:839-52.
- Grabowski, G.A. 2008. Phenotype, diagnosis, and treatment of Gaucher's disease. *Lancet.* 372:1263-71.
- Hasilik, A., and E.F. Neufeld. 1980. Biosynthesis of lysosomal enzymes in fibroblasts. Synthesis as precursors of higher molecular weight. *J Biol Chem.* 255:4937-45.

- Hirosako, K., H. Imasato, Y. Hirota, T. Kuronita, N. Masuyama, M. Nishioka, A. Umeda, H. Fujita, M. Himeno, and Y. Tanaka. 2004. 3-Methyladenine specifically inhibits retrograde transport of cation-independent mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptor from the early endosome to the TGN. *Biochem Biophys Res Commun.* 316:845-52.
- Hoogeveen, A.T., H. Graham-Kawashima, A. d'Azzo, and H. Galjaard. 1984. Processing of human beta-galactosidase in GM1-gangliosidosis and Morquio B syndrome. *J Biol Chem.* 259:1974-7.
- Hosokawa, N., T. Hara, T. Kaizuka, C. Kishi, A. Takamura, Y. Miura, S. Iemura, T. Natsume, K. Takehana, N. Yamada, J.L. Guan, N. Oshiro, and N. Mizushima. 2009. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy. *Mol Biol Cell.* 20:1981-91.
- Janvier, K., and J.S. Bonifacino. 2005. Role of the endocytic machinery in the sorting of lysosome-associated membrane proteins. *Mol Biol Cell.* 16:4231-42.
- Jennings, J.J., Jr., J.H. Zhu, Y. Rbaibi, X. Luo, C.T. Chu, and K. Kiselyov. 2006. Mitochondrial aberrations in mucopolipidosis Type IV. *J Biol Chem.* 281:39041-50.
- Jung, C.H., C.B. Jun, S.H. Ro, Y.M. Kim, N.M. Otto, J. Cao, M. Kundu, and D.H. Kim. 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol Biol Cell.* 20:1992-2003.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi, and T. Yoshimori. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *Embo J.* 19:5720-8.
- Kim, E., P. Goraksha-Hicks, L. Li, T.P. Neufeld, and K.L. Guan. 2008. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat Cell Biol.* 10:935-45.
- 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. 2008a. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy.* 4:151-75.
- Klionsky, D.J., Z. Elazar, P.O. Seglen, and D.C. Rubinsztein. 2008b. Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes? *Autophagy.* 4:849-950.
- Ko, D.C., L. Milenkovic, S.M. Beier, H. Manuel, J. Buchanan, and M.P. Scott. 2005. Cell-autonomous death of cerebellar purkinje neurons with autophagy in Niemann-Pick type C disease. *PLoS Genet.* 1:81-95.
- Koike, M., M. Shibata, S. Waguri, K. Yoshimura, I. Tanida, E. Kominami, T. Gotow, C. Peters, K. von Figura, N. Mizushima, P. Saftig, and Y. Uchiyama. 2005. Participation

- of autophagy in storage of lysosomes in neurons from mouse models of neuronal ceroid-lipofuscinoses (Batten disease). *Am J Pathol.* 167:1713-28.
- Kovacs, A.L., Z. Palfia, G. Rez, T. Vellai, and J. Kovacs. 2007. Sequestration revisited: integrating traditional electron microscopy, de novo assembly and new results. *Autophagy.* 3:655-62.
- Kristensen, A.R., S. Schandorff, M. Hoyer-Hansen, M.O. Nielsen, M. Jaattela, J. Dengjel, and J.S. Andersen. 2008. Ordered organelle degradation during starvation-induced autophagy. *Mol Cell Proteomics.* 7:2419-28.
- Kwiatkowski, D.J., and B.D. Manning. 2005. Tuberous sclerosis: a GAP at the crossroads of multiple signaling pathways. *Hum Mol Genet.* 14 Spec No. 2:R251-8.
- LaPlante, J.M., C.P. Ye, S.J. Quinn, E. Goldin, E.M. Brown, S.A. Slaugenhaupt, and P.M. Vassilev. 2004. Functional links between mucopolipin-1 and Ca<sup>2+</sup>-dependent membrane trafficking in mucopolipidosis IV. *Biochem Biophys Res Commun.* 322:1384-91.
- Le Borgne, R., A. Alconada, U. Bauer, and B. Hoflack. 1998. The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *J Biol Chem.* 273:29451-61.
- Lefrancois, S., J. Zeng, A.J. Hassan, M. Canuel, and C.R. Morales. 2003. The lysosomal trafficking of sphingolipid activator proteins (SAPs) is mediated by sortilin. *Embo J.* 22:6430-7.
- Levine, B., and G. Kroemer. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 132:27-42.
- Levine, B., and J. Yuan. 2005. Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest.* 115:2679-88.
- Lin, L., I. Sohar, H. Lackland, and P. Lobel. 2001. The human CLN2 protein/tripeptidyl-peptidase I is a serine protease that autoactivates at acidic pH. *J Biol Chem.* 276:2249-55.
- Luzio, J.P., P.R. Pryor, and N.A. Bright. 2007. Lysosomes: fusion and function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:622-32.
- Meijer, A.J., and P. Codogno. 2004. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:2445-62.
- Meikle, P.J., D.A. Brooks, E.M. Ravenscroft, M. Yan, R.E. Williams, A.E. Jaunzems, T.K. Chataway, L.E. Karageorgos, R.C. Davey, C.D. Boulter, S.R. Carlsson, and J.J. Hopwood. 1997. Diagnosis of lysosomal storage disorders: evaluation of lysosome-associated membrane protein LAMP-1 as a diagnostic marker. *Clin Chem.* 43:1325-35.
- Meyer, C., D. Zizioli, S. Lausmann, E.L. Eskelinen, J. Hamann, P. Saftig, K. von Figura, and P. Schu. 2000. mu1A-adaptin-deficient mice: lethality, loss of AP-1 binding and rerouting of mannose 6-phosphate receptors. *Embo J.* 19:2193-203.
- Miedel, M.T., Y. Rbaibi, C.J. Guerriero, G. Colletti, K.M. Weixel, O.A. Weisz, and K. Kiselyov. 2008. Membrane traffic and turnover in TRP-ML1-deficient cells: a revised model for mucopolipidosis type IV pathogenesis. *J Exp Med.* 205:1477-90.
- Mizushima, N., B. Levine, A.M. Cuervo, and D.J. Klionsky. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature.* 451:1069-75.
- Mizushima, N., and T. Yoshimori. 2007. How to interpret LC3 immunoblotting. *Autophagy.* 3:542-5.
- Montesano, R., and L. Orci. 1988. Intracellular diaphragmed fenestrae in cultured capillary endothelial cells. *J Cell Sci.* 89 ( Pt 3):441-7.
- Nakatogawa, H., K. Suzuki, Y. Kamada, and Y. Ohsumi. 2009. Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:458-67.
- Ni, X., M. Canuel, and C.R. Morales. 2006. The sorting and trafficking of lysosomal proteins. *Histol Histopathol.* 21:899-913.

- Nishino, I. 2006. Autophagic vacuolar myopathy. *Semin Pediatr Neurol.* 13:90-5.
- Pattingre, S., A. Tassa, X. Qu, R. Garuti, X.H. Liang, N. Mizushima, M. Packer, M.D. Schneider, and B. Levine. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell.* 122:927-39.
- Peters, C., M.J. Bayer, S. Buhler, J.S. Andersen, M. Mann, and A. Mayer. 2001. Trans-complex formation by proteolipid channels in the terminal phase of membrane fusion. *Nature.* 409:581-8.
- Petiot, A., E. Ogier-Denis, E.F. Blommaert, A.J. Meijer, and P. Codogno. 2000. Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem.* 275:992-8.
- Platt, F.M., and S.U. Walkey. 2004. Lysosomal defects and storage. *Lysosomal disorders of the brain.* Ed. by Platt, F.M. & Walkey, S.U.:32-49.
- Prat, C., O. Lemaire, J. Bret, L. Zabraniecki, and B. Fournie. 2008. Morquio syndrome: diagnosis in an adult. *Joint Bone Spine.* 75:495-8.
- Raben, N., L. Shea, V. Hill, and P. Plotz. 2009. Monitoring autophagy in lysosomal storage disorders. *Methods Enzymol.* 453:417-49.
- Ravikumar, B., M. Futter, L. Jahreiss, V.I. Korolchuk, M. Lichtenberg, S. Luo, D.C. Massey, F.M. Menzies, U. Narayanan, M. Renna, M. Jimenez-Sanchez, S. Sarkar, B. Underwood, A. Winslow, and D.C. Rubinsztein. 2009. Mammalian macroautophagy at a glance. *J Cell Sci.* 122:1707-11.
- Razi, M., E.Y. Chan, and S.A. Tooze. 2009. Early endosomes and endosomal coatome are required for autophagy. *J Cell Biol.* 185:305-21.
- Reczek, D., M. Schwake, J. Schroder, H. Hughes, J. Blanz, X. Jin, W. Brondyk, S. Van Patten, T. Edmunds, and P. Saftig. 2007. LIMP-2 is a receptor for lysosomal mannose-6-phosphate-independent targeting of beta-glucocerebrosidase. *Cell.* 131:770-83.
- Reusch, U., O. Bernhard, U. Koszinowski, and P. Schu. 2002. AP-1A and AP-3A lysosomal sorting functions. *Traffic.* 3:752-61.
- Rubinsztein, D.C., A.M. Cuervo, B. Ravikumar, S. Sarkar, V. Korolchuk, S. Haushik, and D.J. Klionsky. 2009. In search of an "autophagometer". *Autophagy.* 5:1-5.
- Saftig, P., and J. Klumperman. 2009. Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: trafficking meets function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:623-35.
- Sancak, Y., T.R. Peterson, Y.D. Shaul, R.A. Lindquist, C.C. Thoreen, L. Bar-Peled, and D.M. Sabatini. 2008. The Rag GTPases bind raptor and mediate amino acid signaling to mTORC1. *Science.* 320:1496-501.
- Sarkar, S., R.A. Floto, Z. Berger, S. Imarisio, A. Cordenier, M. Pasco, L.J. Cook, and D.C. Rubinsztein. 2005. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *J Cell Biol.* 170:1101-11.
- Seglen, P.O., and P.B. Gordon. 1982. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:1889-92.
- Seglen, P.O., P.B. Gordon, and A. Poli. 1980. Amino acid inhibition of the autophagic/lysosomal pathway of protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Biochim Biophys Acta.* 630:103-18.
- Settembre, C., A. Fraldi, L. Jahreiss, C. Spampinato, C. Venturi, D. Medina, R. de Pablo, C. Tacchetti, D.C. Rubinsztein, and A. Ballabio. 2008. A block of autophagy in lysosomal storage disorders. *Hum Mol Genet.* 17:119-29.
- Sleat, D.E., J.A. Wiseman, M. El-Banna, K.H. Kim, Q. Mao, S. Price, S.L. Macauley, R.L. Sidman, M.M. Shen, Q. Zhao, M.A. Passini, B.L. Davidson, G.R. Stewart, and P. Lobel. 2004. A mouse model of classical late-infantile neuronal ceroid lipofuscinosis



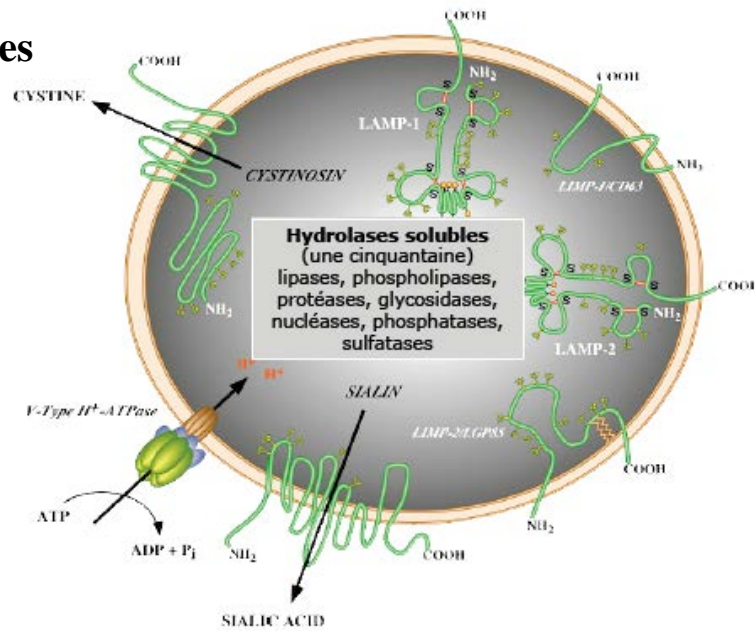
- based on targeted disruption of the CLN2 gene results in a loss of tripeptidyl-peptidase I activity and progressive neurodegeneration. *J Neurosci.* 24:9117-26.
- Smith, P.K., R.I. Krohn, G.T. Hermanson, A.K. Mallia, F.H. Gartner, M.D. Provenzano, E.K. Fujimoto, N.M. Goeke, B.J. Olson, and D.C. Klenk. 1985. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 150:76-85.
- Soyombo, A.A., S. Tjon-Kon-Sang, Y. Rbaibi, E. Bashllari, J. Bisceglia, S. Muallem, and K. Kiselyov. 2006. TRP-ML1 regulates lysosomal pH and acidic lysosomal lipid hydrolytic activity. *J Biol Chem.* 281:7294-301.
- Takamura, A., K. Higaki, K. Kajimaki, S. Otsuka, H. Ninomiya, J. Matsuda, K. Ohno, Y. Suzuki, and E. Nanba. 2008. Enhanced autophagy and mitochondrial aberrations in murine G(M1)-gangliosidosis. *Biochem Biophys Res Commun.* 367:616-22.
- van der Vaart, A., M. Mari, and F. Reggiori. 2008. A picky eater: exploring the mechanisms of selective autophagy in human pathologies. *Traffic.* 9:281-9.
- Venugopal, B., N.T. Mesires, J.C. Kennedy, C. Curcio-Morelli, J.M. Laplante, J.F. Dice, and S.A. Slaugenhaupt. 2009. Chaperone-mediated autophagy is defective in mucopolipidosis type IV. *J Cell Physiol.* 219:344-53.
- Vergarajauregui, S., P.S. Connelly, M.P. Daniels, and R. Puertollano. 2008. Autophagic dysfunction in mucopolipidosis type IV patients. *Hum Mol Genet.* 17:2723-37.
- Walkley, S.U., and M.T. Vanier. 2009. Secondary lipid accumulation in lysosomal disease. *Biochim Biophys Acta.* 1793:726-36.
- Wang, X., and C.G. Proud. 2009. Nutrient control of TORC1, a cell-cycle regulator. *Trends Cell Biol.* 19:260-7.
- Wei, Y., S. Sinha, and B. Levine. 2008. Dual role of JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy.* 4:949-51.
- Yamamoto, A., Y. Tagawa, T. Yoshimori, Y. Moriyama, R. Masaki, and 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.
- Young, A.R., E.Y. Chan, X.W. Hu, R. Kochl, S.G. Crawshaw, S. High, D.W. Hailey, J. Lippincott-Schwartz, and S.A. Tooze. 2006. Starvation and ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN and endosomes. *J Cell Sci.* 119:3888-900.

# Table des matières

<b>1. Introduction</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Les lysosomes</b>	<b>1</b>
1.1.1. Caractéristiques générales	1
1.1.2. Transport des protéines lysosomales	2
1.1.3. Biogenèse des lysosomes	3
1.1.4. La V-H <sup>+</sup> -ATPase	4
<b>1.2. Les maladies de surcharge lysosomale</b>	<b>5</b>
1.2.1. Caractéristiques générales des maladies de surcharge lysosomale	5
1.2.2. La mucopolidose de type IV	7
1.2.3. La mucopolysaccharidose de type IVB (ou maladie de Morquio B)	8
1.2.4. La lipofuscinose céréoïde neuronale de type 2	9
1.2.5. Les différents traitements possibles des LSDs	10
<b>1.3. La dégradation des protéines</b>	<b>11</b>
1.3.1. Le système ubiquitine-protéasome	11
1.3.2. L'autophagie	11
1.3.2.1. Mécanisme général de la macroautophagie	12
1.3.2.2. Le rôle de la macroautophagie	12
1.3.2.3. Les mécanismes moléculaires	13
a) L'implication de mTOR dans la formation des autophagosomes	13
b) Le complexe ULK1-Atg13-FIP200	14
c) Le complexe phosphatidylinositol 3-kinase de classe III (PI3K III)	14
d) Les deux systèmes de conjugaison	15
e) La maturation et la fusion des autophagosomes	15
1.3.2.4. La régulation de la macroautophagie	15
a) Les voies dépendantes de mTOR	15
b) Les voies indépendantes de mTOR	17
1.3.3. Les inhibiteurs de la macroautophagie	17
1.3.3.1. La 3-méthyladénine	17
1.3.3.2. La bafilomycine	17
1.3.3.3 Les siRNA	18
<b>1.4. Objectifs du mémoire</b>	<b>19</b>
<b>2. Matériel et Méthodes</b>	<b>21</b>
<b>2.1. Culture cellulaire</b>	<b>21</b>
2.1.1. Les lignées cellulaires	21
2.1.2. Conditions de culture et de repiquage des cellules	21
2.1.3. Conditions de jeûne des cellules et Traitement avec la bafilomycine	21
<b>2.2. Préparation des lysats totaux</b>	<b>22</b>
<b>2.3. Dosage des protéines par la technique du BCA (acide bicinchoninique)</b>	<b>22</b>
2.3.1. Principe	22

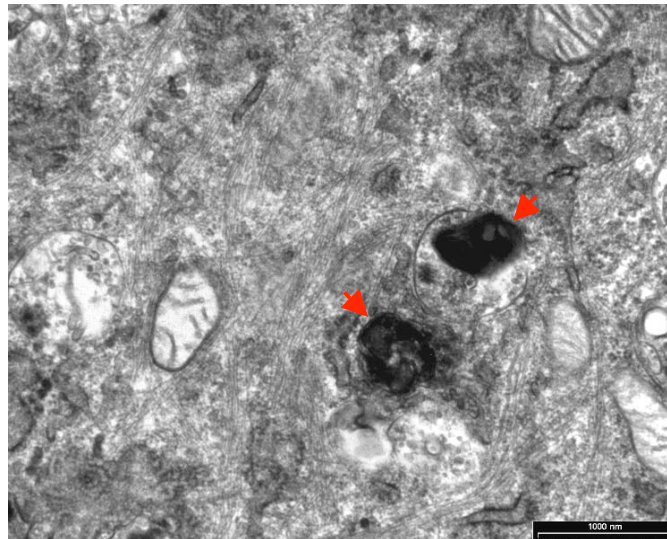
2.3.2.	Méthode	22
<b>2.4.</b>	<b>Western blotting</b>	<b>22</b>
2.4.1.	<i>Principe</i>	22
2.4.2.	<i>L'électrophorèse</i>	23
2.4.3.	<i>Le transfert sur une membrane de PVDF</i>	23
2.4.4.	<i>Incubation avec les anticorps</i>	23
2.4.5.	<i>Révélation</i>	24
<b>2.5.</b>	<b>Immunofluorescence</b>	<b>24</b>
2.5.1.	<i>Marquage de LC3</i>	24
2.5.2.	<i>Marquage de LAMP-1 et de COX-1</i>	24
<b>2.6.</b>	<b>La microscopie électronique à transmission (MET)</b>	<b>25</b>
2.6.1.	<i>Principe</i>	25
2.6.2.	<i>Méthode</i>	25
<b>2.7.</b>	<b>La dégradation des protéines de longue durée de vie</b>	<b>26</b>
2.7.1.	<i>Principe</i>	26
2.7.2.	<i>Méthode</i>	26
<b>3.</b>	<b>Résultats</b>	<b>28</b>
<b>3.1.</b>	<b>Caractérisation des lignées cellulaires</b>	<b>28</b>
3.1.1.	Observation en microscopie à contraste de phase	28
3.1.2.	Observation en microscopie à fluorescence	28
3.1.3.	Observation en microscopie électronique à transmission	29
<b>3.2.</b>	<b>Abondance des autophagosomes déterminée grâce à un anticorps anti-LC3B</b>	<b>29</b>
3.2.1.	Détection de LC3B par microscopie à fluorescence	30
3.2.2.	Détection de LC3B-II par Western Blotting	30
3.2.2.1.	Validation	30
3.2.2.2.	L'abondance de LC3B-II en conditions basale, à jeun ou après traitement avec la bafilomycine A1	31
3.2.2.3.	Abondance de LC3B-II en condition basale	32
3.2.2.4.	Cinétique d'accumulation de la protéine LC3B-II au cours du temps en condition basale	33
<b>3.3.</b>	<b>Le flux autophagique déterminé par la dégradation des protéines de longue durée de vie</b>	<b>33</b>
3.3.1.	L'état basal	34
3.3.2.	L'état de jeûne	34
3.3.3.	Utilisation d'inhibiteurs de la dégradation des protéines à l'état basal	35
3.3.4.	L'état basal avec du Tran <sup>35</sup> S label	36
<b>3.4.</b>	<b>Mitophagie à l'état basal ou après un jeûne</b>	<b>37</b>
<b>4.</b>	<b>Discussion et Perspectives</b>	<b>39</b>
<b>5.</b>	<b>Bibliographie</b>	<b>44</b>

## 6. Annexes



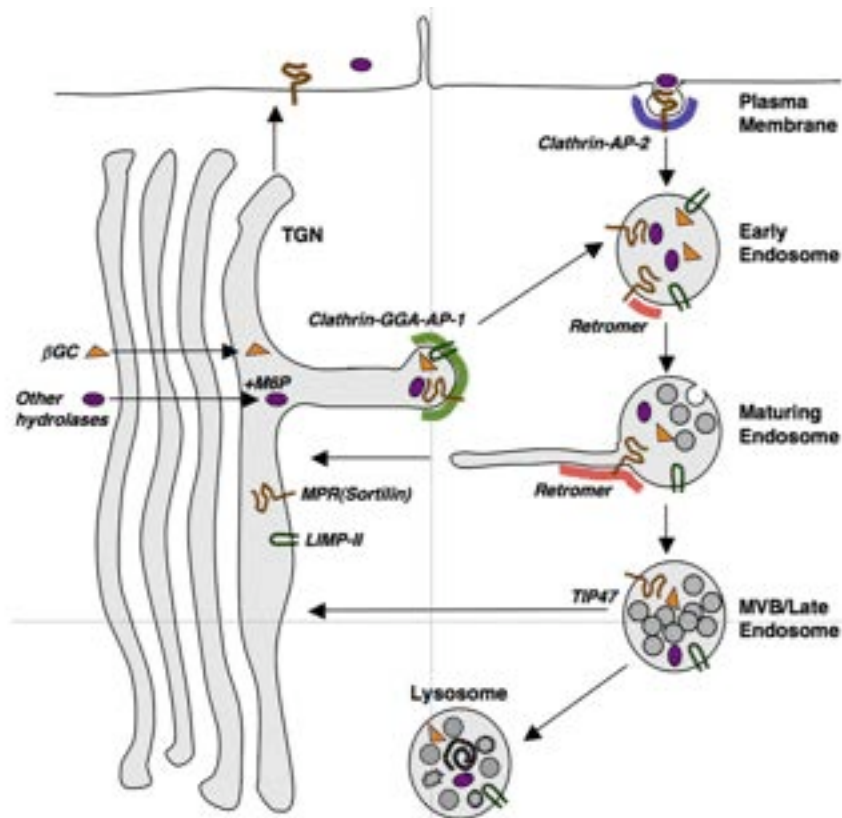
### Figure 1.1 : Structure du lysosome.

Les lysosomes sont des organites intracellulaires qui contiennent une cinquantaine d'hydrolases solubles. La membrane des lysosomes contient des protéines membranaires fortement glycosylées comme les LAMPs, LIMPs ainsi que des transporteurs comme la cystinosine ou la sialine. On trouve aussi la pompe V-H<sup>+</sup>-ATPase qui est responsable de l'acidification de la lumière (pH 4,5-5).



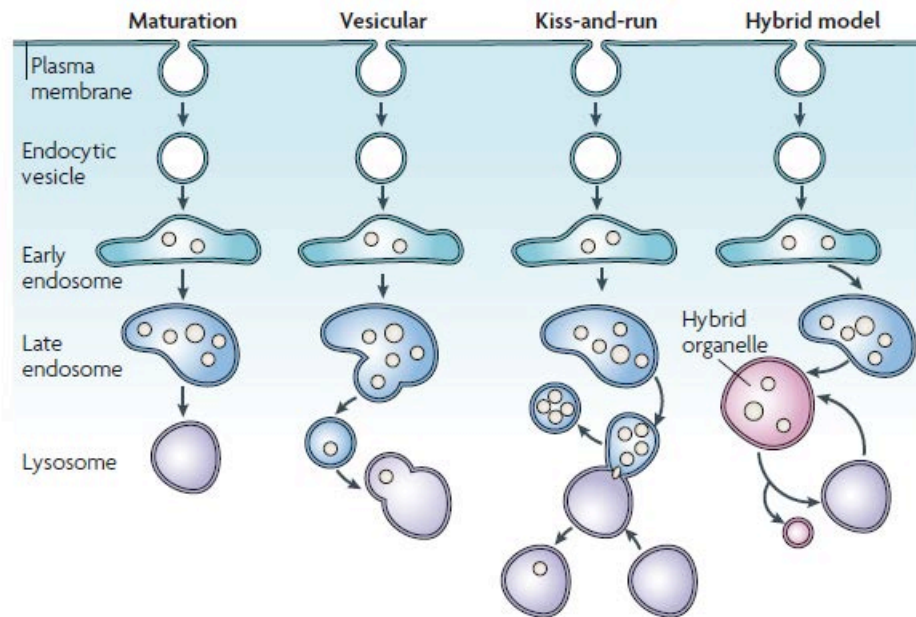
### Figure 1.2 : Micrographie prise en microscopie électronique à transmission.

Les lysosomes (pointés par des flèches rouges) sont des corps denses aux électrons. Photo d'un fibroblaste de peau.



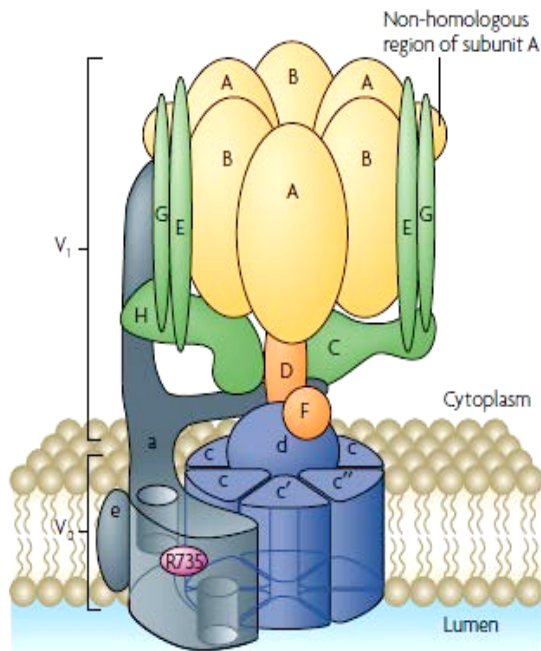
**Figure 1.3 : Transport des hydrolases lysosomales dépendant des récepteurs au M6P.**

Les hydrolases lysosomales sont synthétisées dans le cytoplasme, puis transloquées et N-glycosylées dans la lumière du réticulum endoplasmique (RE). Dans l'appareil de Golgi, elles acquièrent un signal de reconnaissance, un M6P qui est reconnu par un des deux récepteurs au mannose 6-phosphate (M6PR) au niveau du *réseau trans-Golgien* (TGN). Les complexes enzymes-récepteurs sont ensuite concentrés dans des vésicules recouvertes de clathrine et de protéines adaptatrices de type AP-1 et/ou GGA qui assurent leur transport du TGN vers les compartiments endosomaux. Dans les endosomes, les M6PR se dissocient de leurs ligands et sont recyclés vers le TGN par transport rétrograde (Braulke *et al.*, 2008).



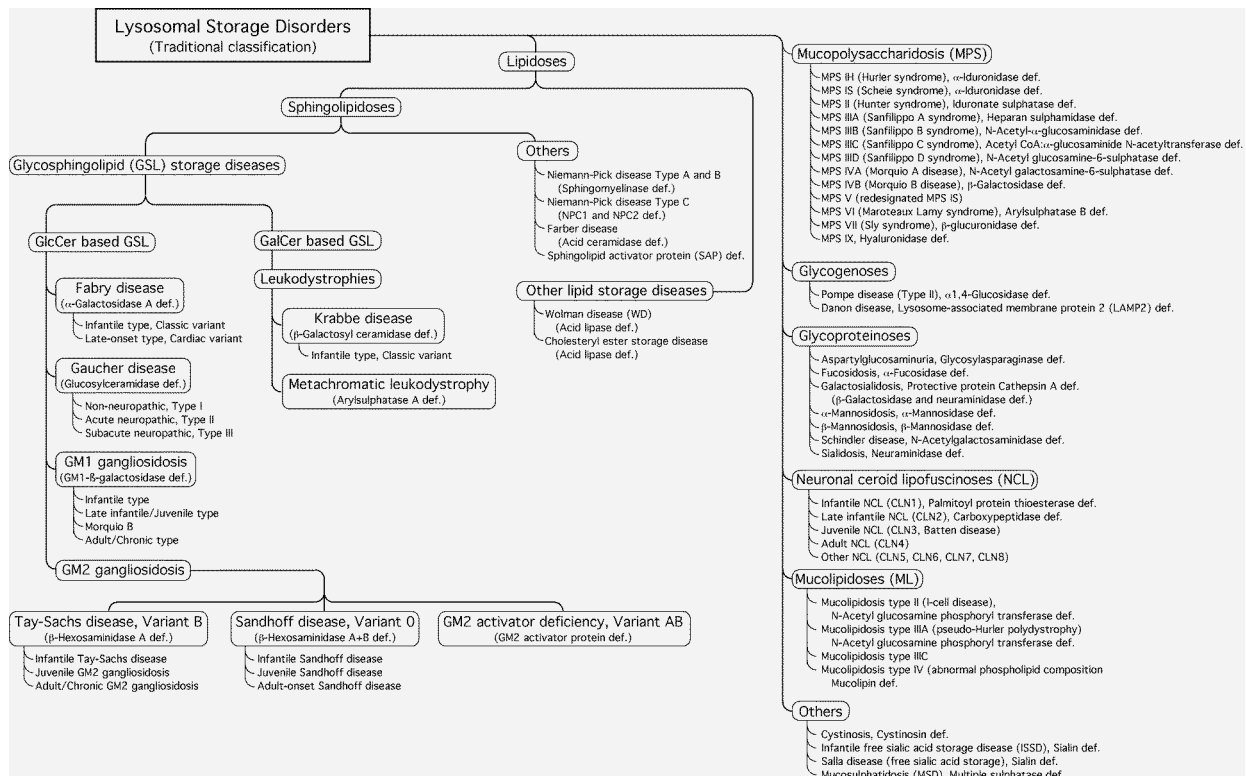
**Figure 1.4 : Modèles concernant la biogenèse des lysosomes.**

1) le modèle de la maturation, où les endosomes précoces se transforment en endosomes tardifs puis en lysosomes ; 2) le transport vésiculaire où des vésicules transportent le cargo d'un compartiment à l'autre ; 3) le modèle de « *kiss end run* » où les endosomes tardifs fusionnent de manière transitoire avec les lysosomes permettant l'échange de matériaux entre les deux compartiments ; 4) le modèle hybride, basé sur la formation d'un organelle hybride comprenant des caractéristiques des endosomes tardifs et des lysosomes (Luzio et al., 2007).



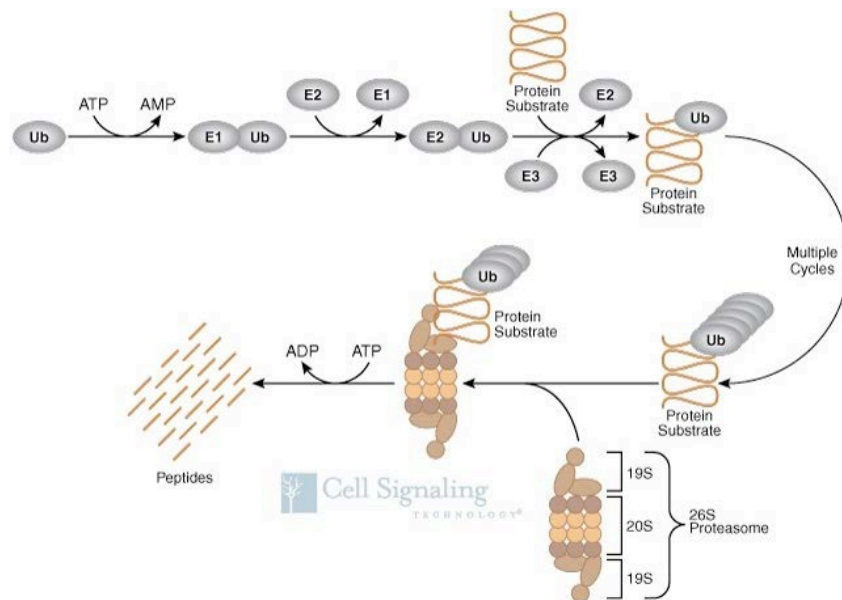
**Figure 1.5 : Structure de la pompe V-H<sup>+</sup>-ATPase.**

La V-H<sup>+</sup>-ATPase est composée d'un domaine cytoplasmique V<sub>1</sub> et d'un domaine transmembranaire V<sub>0</sub>. Le domaine V<sub>0</sub> est composé de 8 sous-unités différentes (A à H) et est responsable de l'hydrolyse de l'ATP. Les sous-unités A et B sont disposées alternativement et forment une structure hexamérique. Le domaine V<sub>1</sub>, constitué de 6 sous-unités différentes (a, c, c', c'', d et e) permet la translocation des protons à travers la membrane. Les sous-unités c sont arrangées en anneau de protéolipides. La sous-unité a possède 2 héli-canaux pour l'entrée et la sortie des protons et un résidu Arginine (R735) indispensable pour la translocation des H<sup>+</sup>. Les domaines V<sub>1</sub> et V<sub>0</sub> sont reliés par des appendices central et périphérique (Forgac, 2007).



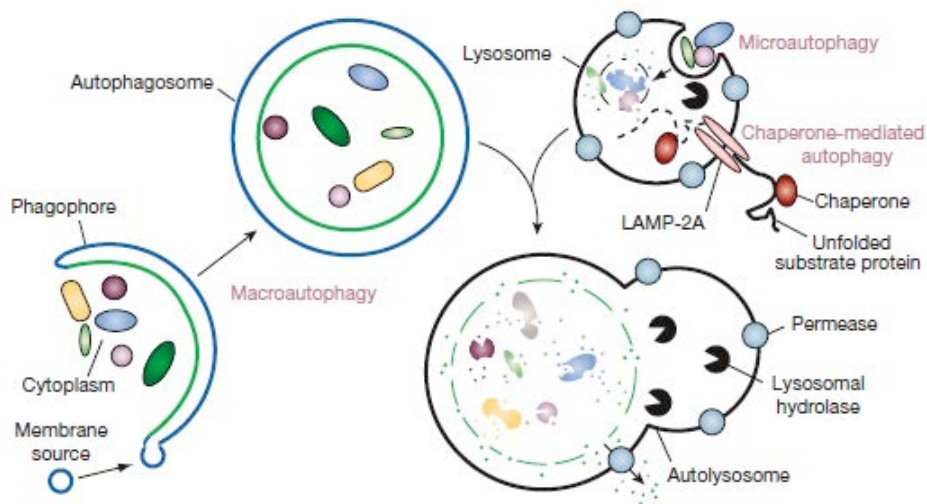
**Tableau 1.2 : Classification traditionnelle des maladies de surcharge lysosomale.**

On dénombre environ 60 maladies de surcharge lysosomale pouvant être classées en différents groupes et sous-groupes. Cette figure représente une classification en fonction du matériel accumulé (Platt and Walkley « lysosomal defects and storage » from lysosomal storage in the brain, Oxford University, 2004)



**Figure 1.6 : Le système ubiquitine-protéasome.**

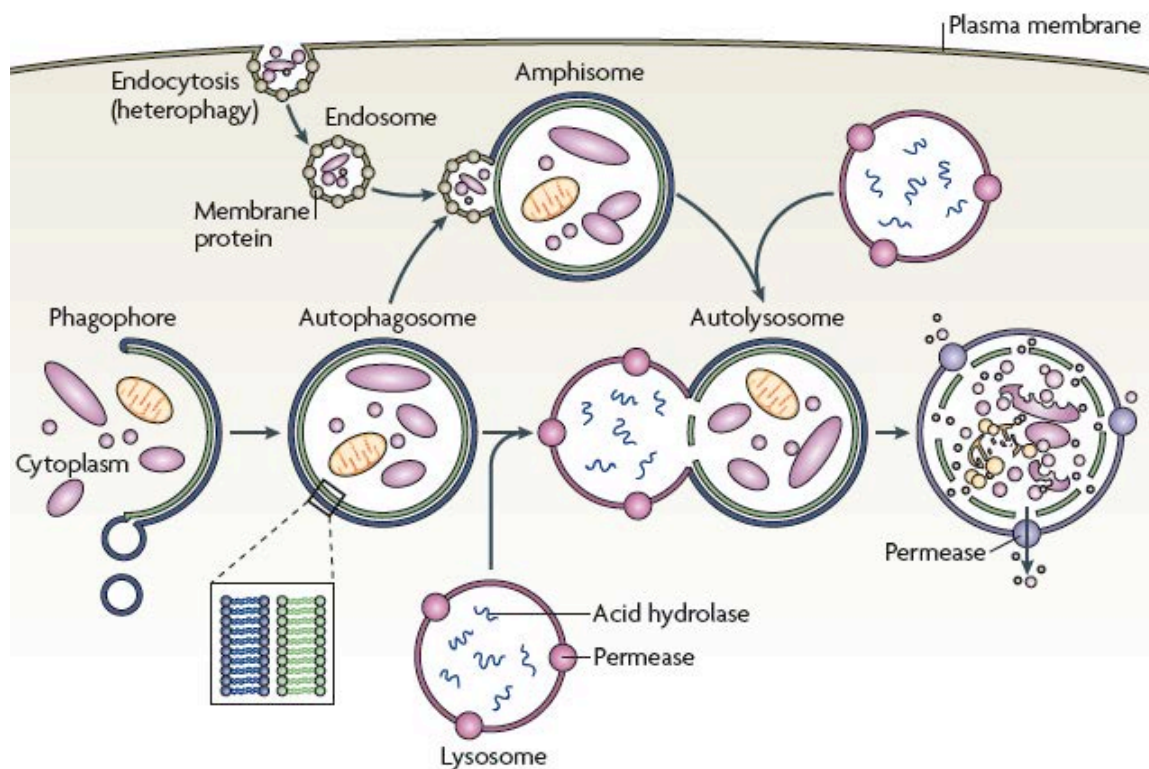
Les protéines substrats sont marquées par des chaînes d'ubiquitine et sont ensuite reconnues par le protéasome 26S qui les hydrolyse en oligopeptides et recycle l'ubiquitine. Ce phénomène requiert l'activité séquentielle de plusieurs enzymes. D'abord, l'enzyme E1 active l'ubiquitine et la transfère sur l'enzyme E2. L'enzyme E3 est nécessaire pour transférer l'ubiquitine sur la protéine substrat et enfin, l'enzyme E4 permet l'allongement des chaînes poly-ubiquitine ([www.cellsignal.com/.../Ubiquitin\\_Proteasome.html](http://www.cellsignal.com/.../Ubiquitin_Proteasome.html)).



**Figure 1.7 : Les différents types d'autophagie : la microautophagie, la macroautophagie et l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA).**

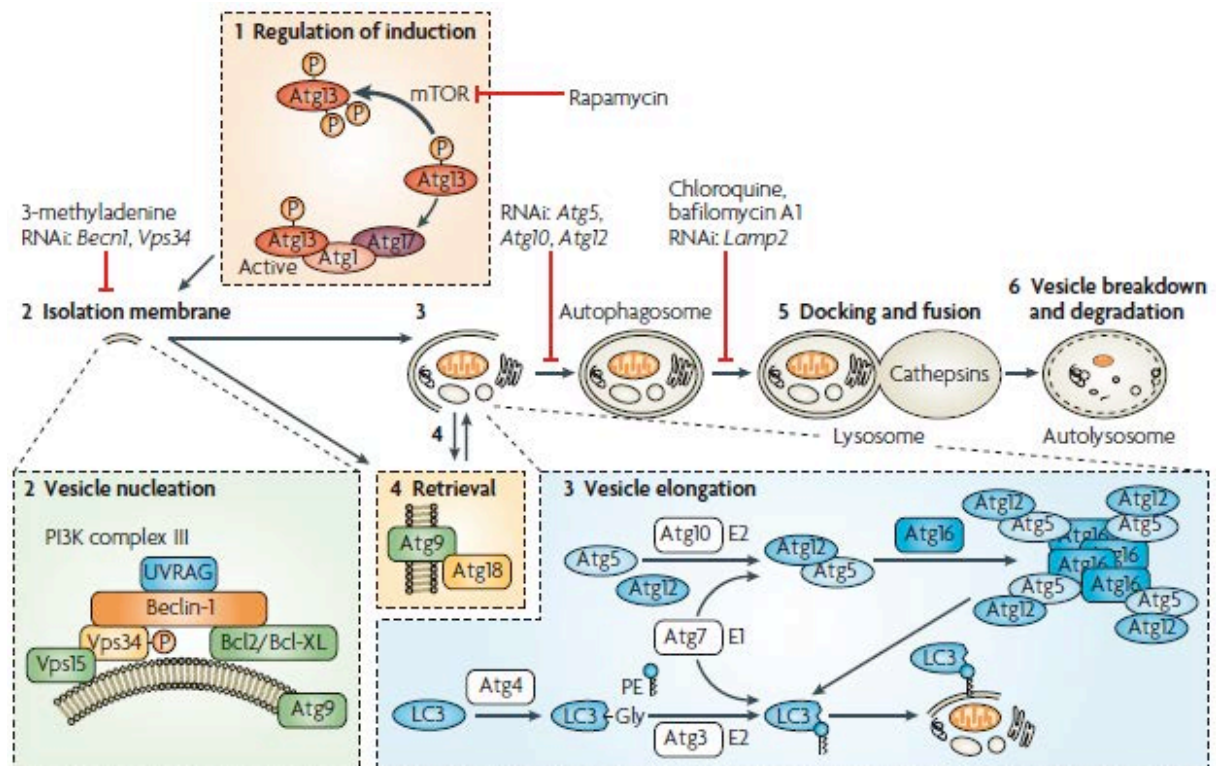
La microautophagie réfère à la séquestration de constituants cytosoliques directement par la membrane des lysosomes qui s'invagine. Dans le cas de la macroautophagie, le cargo est d'abord séquestré dans une vésicule possédant une double membrane, l'autophagosome. Il fusionne ensuite avec le lysosome pour former un autolysosome (ou autophagolysosome) où le matériel séquestré est dégradé. L'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) est caractérisée par la translocation directe des protéines substrats à travers la membrane des lysosomes. Cela requiert des protéines chaperonnes et la protéine intégrale LAMP-2A qui joue le rôle de récepteur (*Mizushima et al., 2008*).





**Figure 1.8 : Représentation des principales étapes de la macroautophagie.**

La séquestration de matériaux cytosoliques commence avec la formation d'un phagophore qui s'allonge jusqu'à former une vésicule limitée par une double membrane, appelée autophagosome. Celui-ci fusionne ensuite avec un lysosome ou un endosome tardif pour donner naissance à des autophagolysosomes et des amphisomes, respectivement. Les hydrolases lysosomales dégradent d'abord la membrane interne des autophagosomes, ensuite leur contenu. Les produits de dégradation sont ensuite libérés dans le cytosol et réutilisés pour la synthèse de nouvelles molécules (Klionsky, 2007).

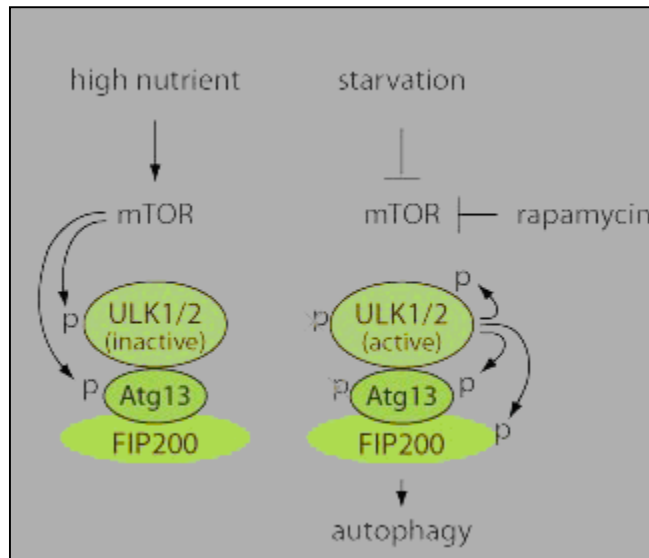


**Figure 1.9 : Les différentes étapes de l'autophagie et ses différents acteurs moléculaires**

(1-2) : La formation d'un autophagosome se déroule en plusieurs étapes en commençant par la répression de mTor induite par un jeûne ou par la rapamycine) et par l'activation du complexe de la PI3K III. Ce complexe PI3KIII peut être inhibé notamment par la 3-méthyladénine.

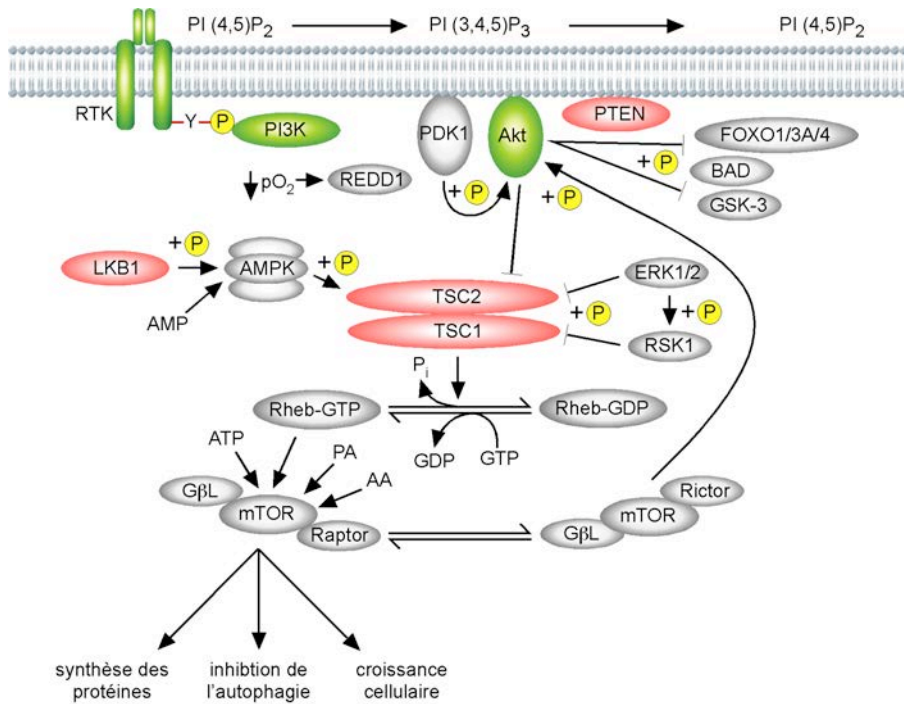
3) : L'expansion de la vésicule fait intervenir 2 systèmes de conjugaison type l'ubiquitine (voir texte).

(5-6) : Une fois formé, l'autophagosome poursuit sa maturation en fusionnant avec un lysosome où il sera dégradé ainsi que son contenu.



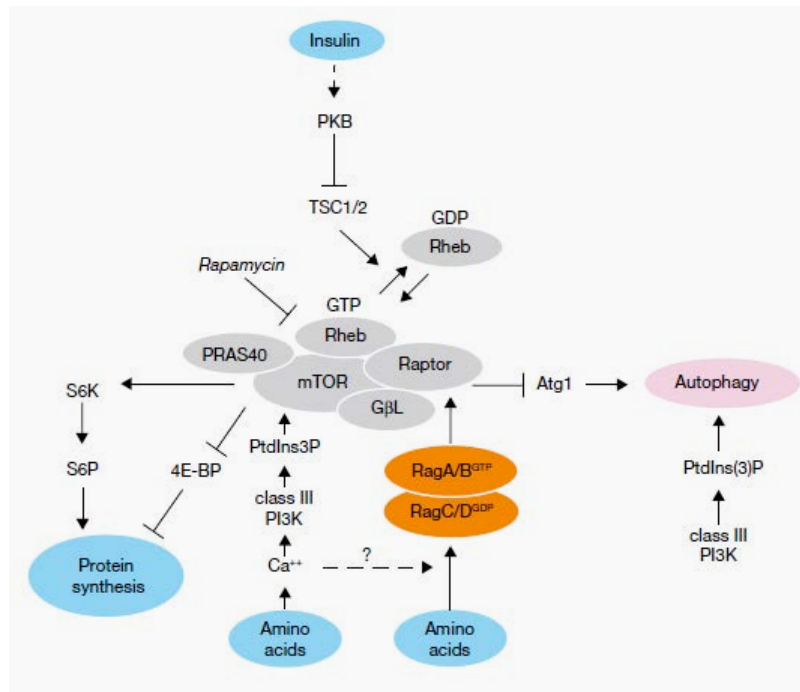
**Figure 1.10: Modèle : Le complexe ULK1-Atg13-FIP200.**

Lorsque l'environnement est riche en nutriments, mTOR s'associe à ce complexe ULK1-Atg13-FIP200 et phosphoryle Atg13 ainsi que ULK1. La phosphorylation de ULK1 par mTOR inhiberait son activité de phosphorylation sur FIP200 et donc, inhiberait la macroautophagie. Inversement, lorsque l'environnement est appauvri en nutriments, mTOR n'est plus associée au complexe, Atg13 et ULK1 ne sont plus phosphorylées. ULK1 peut donc phosphoryler Atg13 et FIP200 et induire ainsi la macroautophagie (*Jung et al., 2009*).



**Figure 1.11 : Les complexes TSC1/TSC2 dans l'autophagie.**

La phosphorylation de TSC2 par l'Akt inhibe sa capacité à jouer son rôle de protéine activatrice des GTPases Rheb. L'augmentation du taux des protéines Rheb GTP active mTORC1 et donc inhibe la macroautophagie. Par contre, la phosphorylation de TSC2 par l'AMPK active TSC2. Rheb GTP n'interagit plus avec mTORC1 et est inhibée, dans ce cas, l'autophagie est induite (*Schéma modifié à partir de Kwiatkowski et al. 2005*).



**Figure 1.12 : Les acides aminés et la voie mTor.**

En présence d'acides aminés mTORC1 est activé grâce aux protéines Rag A/B-C/D (voir texte) (*Meijer et Codogno, 2008*).

	<b>Anticorps primaires</b>	<b>Anticorps secondaires</b>
<b>LC3</b>	Anticorps monoclonal de souris anti-LC3 (Nano-tools) dilué 50 fois dans une solution de d-PBS/0,1% BSA/0,1 % saponine	Anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de souris couplé à une sonde fluorescente Alexa Fluor 488 (Molecular Probes, Invitrogen) dilué 500 fois dans une solution de d-PBS/BSA/Saponine
	Anticorps polyclonal de lapin anti-LC3 (Sigma) dilué 250 fois dans une solution de d-PBS/0,1% BSA/0,1 % saponine	Anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de lapin couplé à une sonde fluorescente Alexa 488 (Molecular Probes, Invitrogen) dilué 500 fois dans une solution de d-PBS/BSA/Saponine
<b>LAMP-1</b>	Anticorps monoclonal de souris anti-LAMP-1 (H <sub>4</sub> A <sub>3</sub> , Developmental Studies Hybridoma Bank, Ohio) dilué 400 fois dans une solution de d-PBS/2% BSA	Anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de souris couplé à une sonde fluorescente Alexa Fuor 488 ou Alexa 633 (Molecular Probes, Invitrogen) dilué 500 fois dans une solution de d-PBS/2% BSA
<b>COX-1</b>	Anticorps monoclonal de souris anti-COX-1 (Invitrogen) dilué 20 fois dans une solution de d-PBS/2% BSA	Anticorps de chèvre anti-IgG (H+L) de souris couplé à une sonde fluorescente Alexa Fluor 633 (Molecular Probes, Invitrogen) dilué 500 fois dans une solution de d-PBS/2% BSA

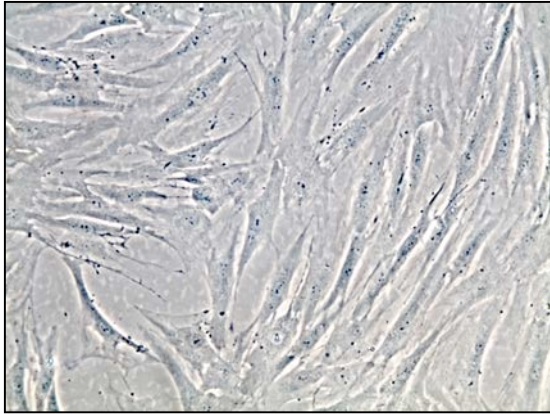
**Tableau 2.6 : Anticorps utilisés pour les expériences d'immunofluorescence.**

	Milieu appauvri en valine (mg/l)	Milieu appauvri en méthionine (mg/l)
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	265,00	265,00
KCl	400,00	400,00
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	200,00	200,00
NaCl	5800,00	5800,00
NaHCO <sub>3</sub>	2200,00	2200,00
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	140,00	140,00
Glucose	1000,00	1000,00
l-Arginine.HCl	126,40	126,40
l-Cystine	24,00	24,00
l-Histidine.HCl.H <sub>2</sub> O	42,00	42,00
l-Isoleucine	52,40	52,40
l-Leucine	52,40	52,40
l-Lysine.HCl	73,00	73,00
l-Méthionine	<u>15,00</u>	<u>2,25</u>
L-Phénylalanine	33,00	33,00
l-Threonine	47,60	47,60
l-Tryptophan	10,20	10,20
l-Tyrosine	36,20	36,20
l-Valine	<u>7,62</u>	<u>46,89</u>

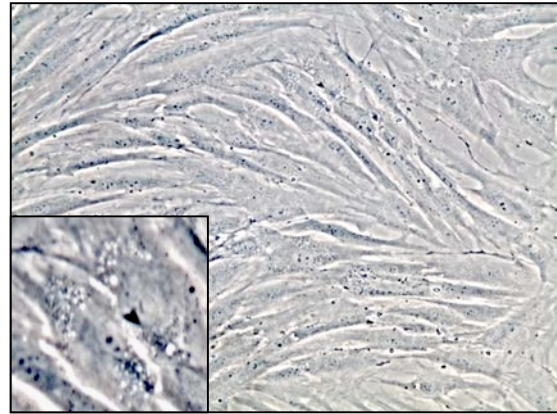
**Tableau 2.8 : Composition du milieu appauvri en valine ou en méthionine.**

Ces milieux ont été filtrés sur des Stéricup de 0,22 µm (Millipore), des vitamines (Sigma) ont été ajoutées ainsi que 10 % de sérum foetal de bovin dialysé (Sigma), 100 mM NEAA, 2 mM de L-glutamax (Thermofisher Scientific), 100 mM de pyruvate de sodium (Lonza).

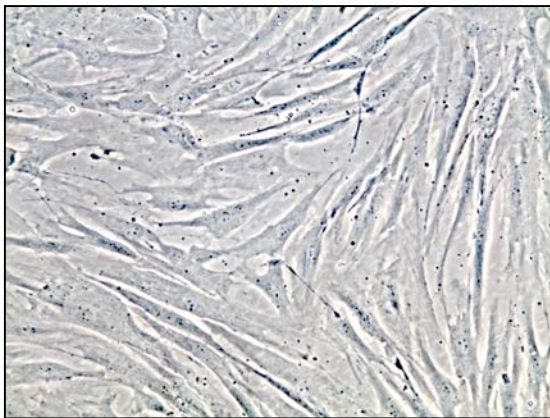
ML CTL



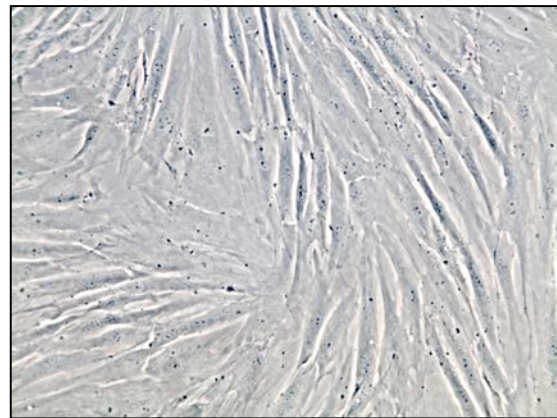
ML4



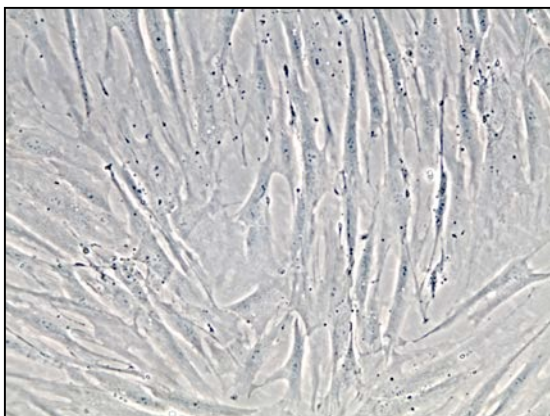
MPS CTL



MPS IVB

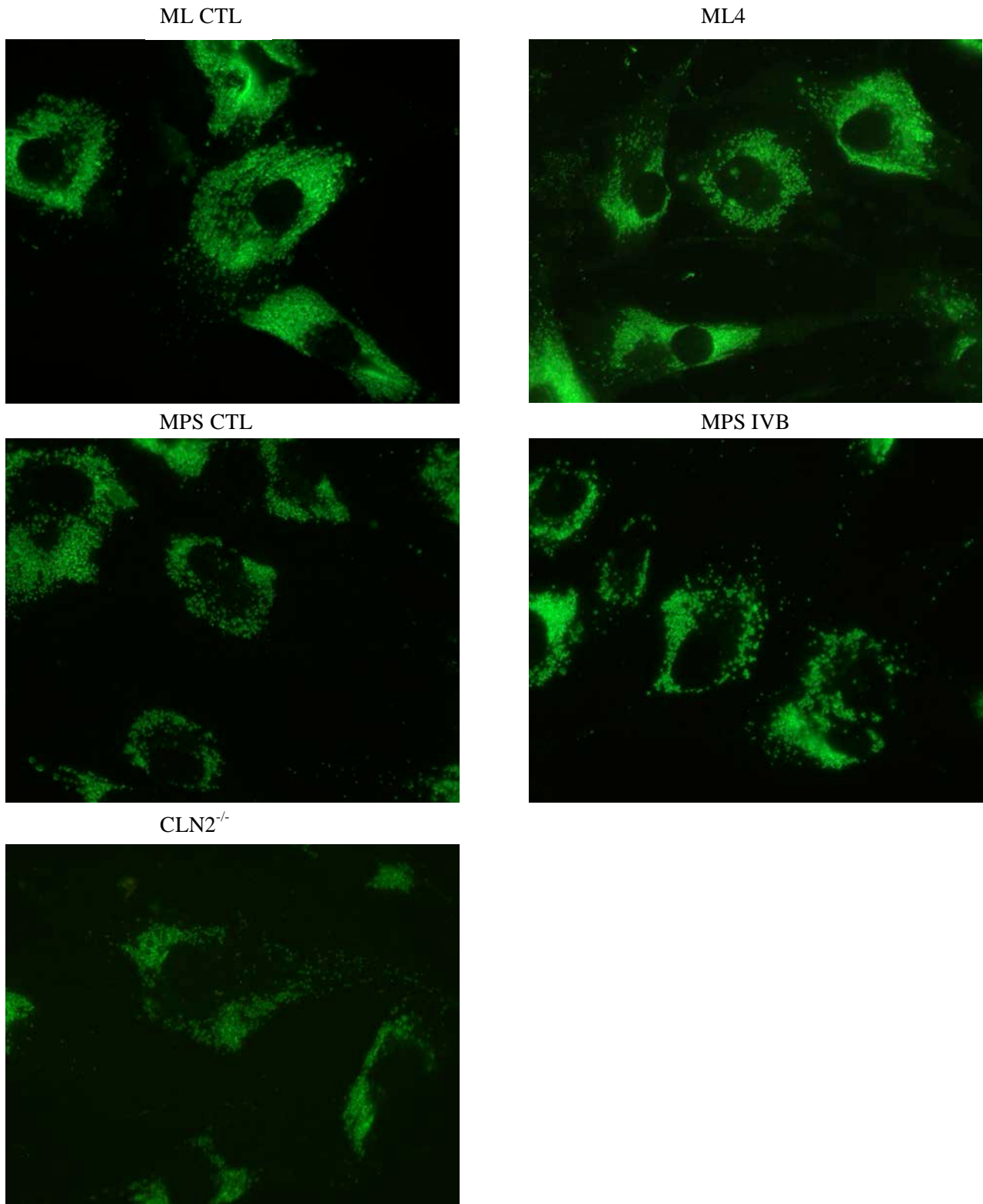


CLN2<sup>-/-</sup>



**Figure 3.1 : Photographies des fibroblastes ML CTL, ML 4, MPS CTL, MPS IVB et CLN2<sup>-/-</sup> observés en microscopie à contraste de phase.**

Les cellules ont été cultivées dans du milieu EMEM supplémenté avec des acides aminés non essentiels, du L-glutamax, du pyruvate de sodium et du sérum de veau foetal 10 %. Les images ont été prises entre les passages 17,5 et 23,5 avec un grossissement de 200 fois.

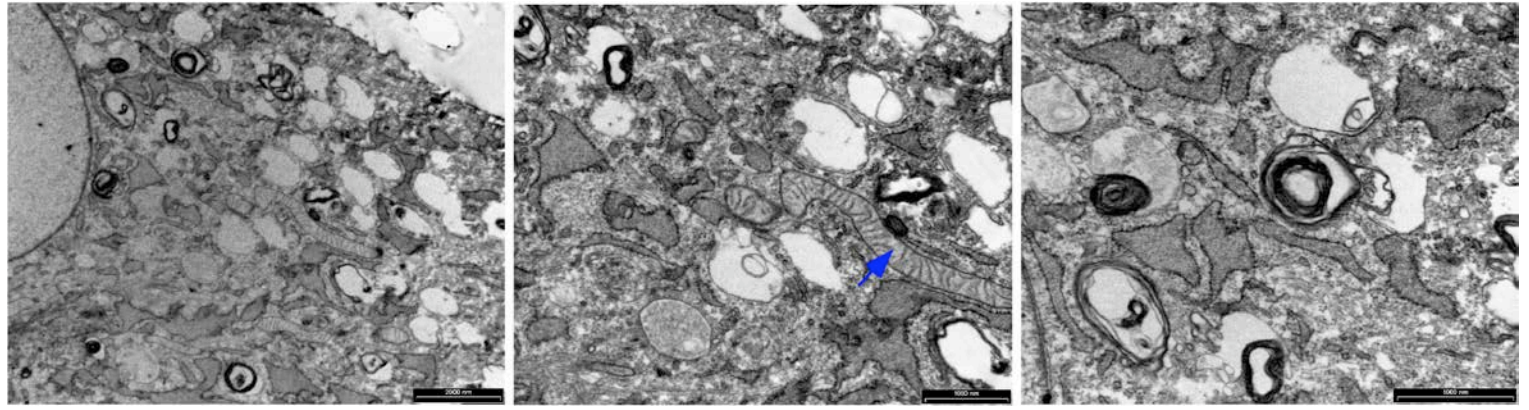


**Figure 3.2 : Immunomarquage de LAMP-1 et visualisation en microscopie à épifluorescence.**

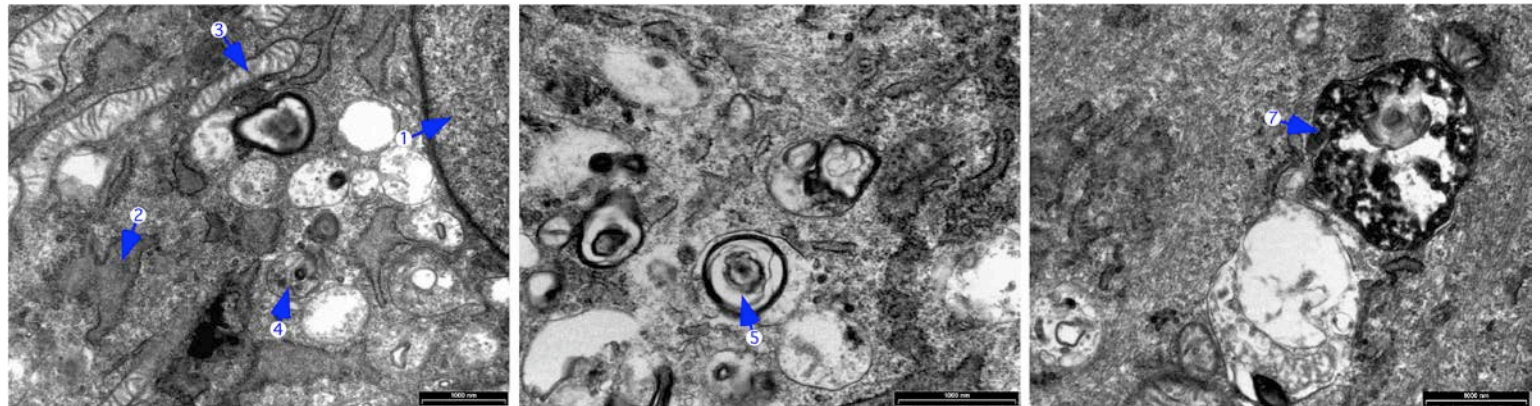
Les cellules ont été ensemencées sur des lamelles couvre-objets. Elles ont été fixées et perméabilisées avec 80 % de méthanol et 20 % d'acétone. Après une période de 20 min de saturation avec du dPBS/BSA 2 %, les lamelles ont été incubées pendant 2 h avec un anticorps monoclonal de souris anti-LAMP-1 (H4A3) puis pendant 1 h avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris couplé à Alexa 488. Enfin, les lamelles ont été montées sur des lames porte-objet avec du Mowiol 4-88 et observées à l'aide d'un microscope à fluorescence de type Olympus Provis Ax70 (LabCeTi).



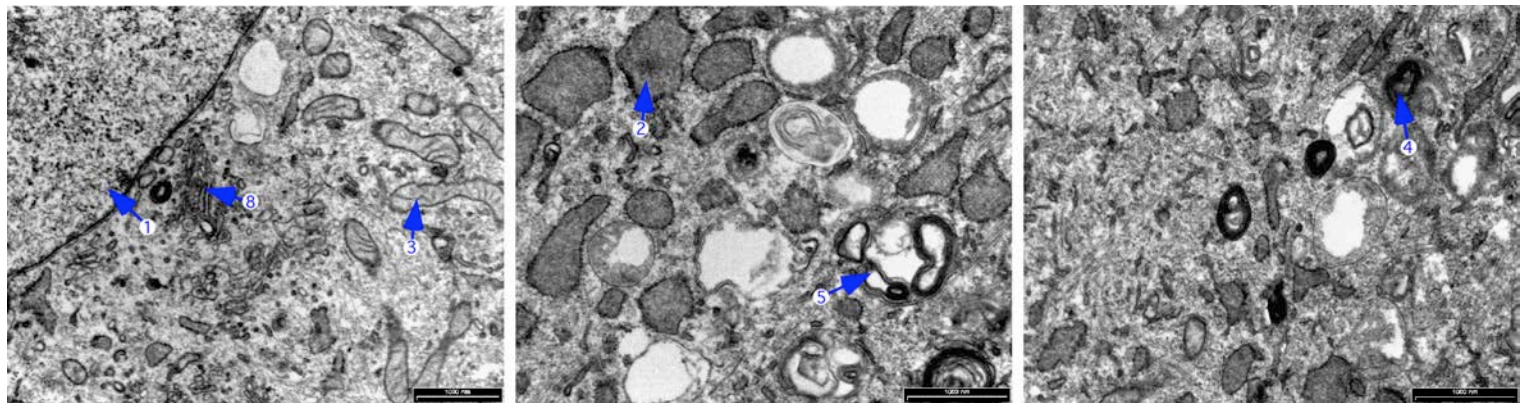
## ML CTL



## MPS CTL

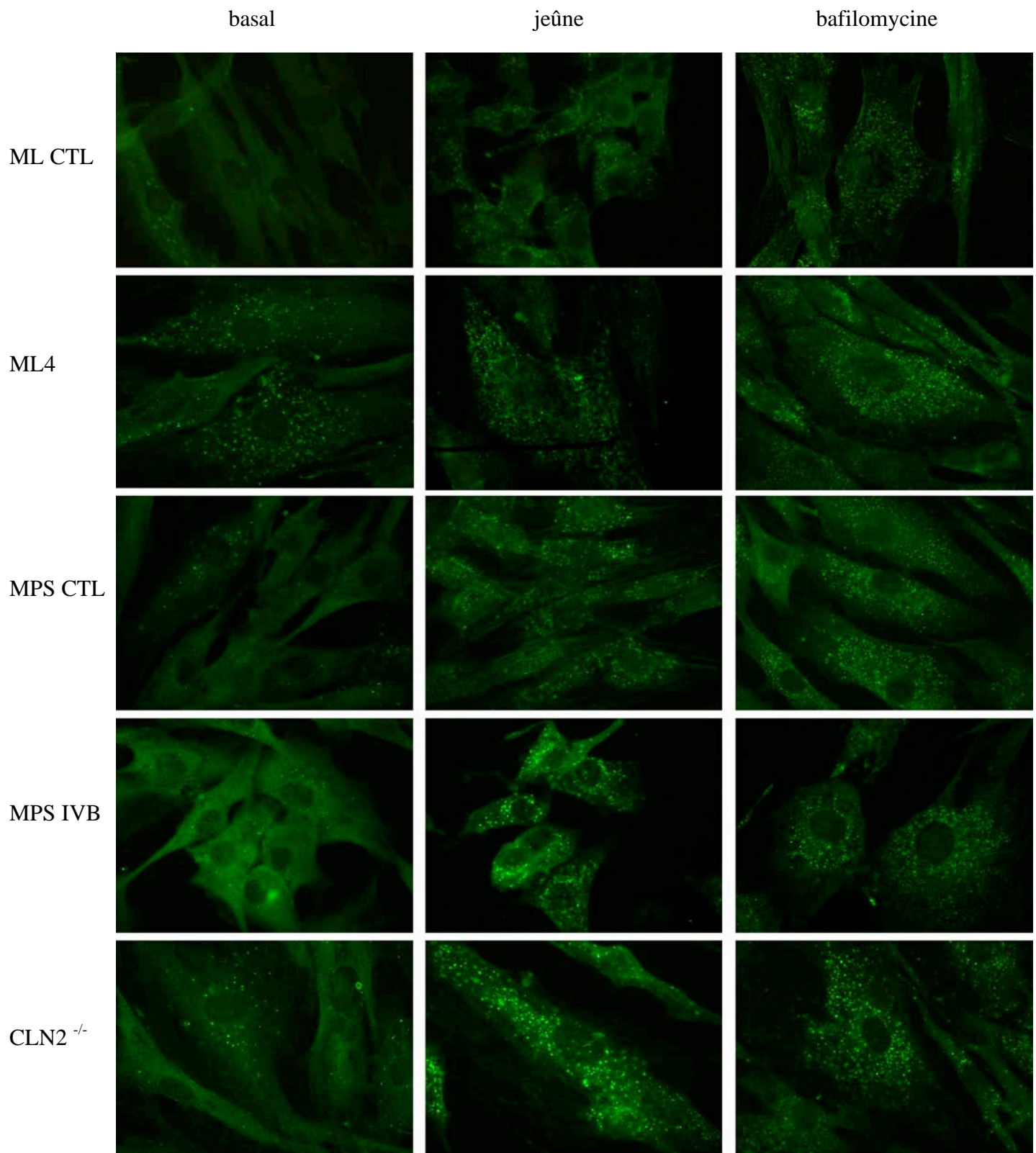


## MPS IVB



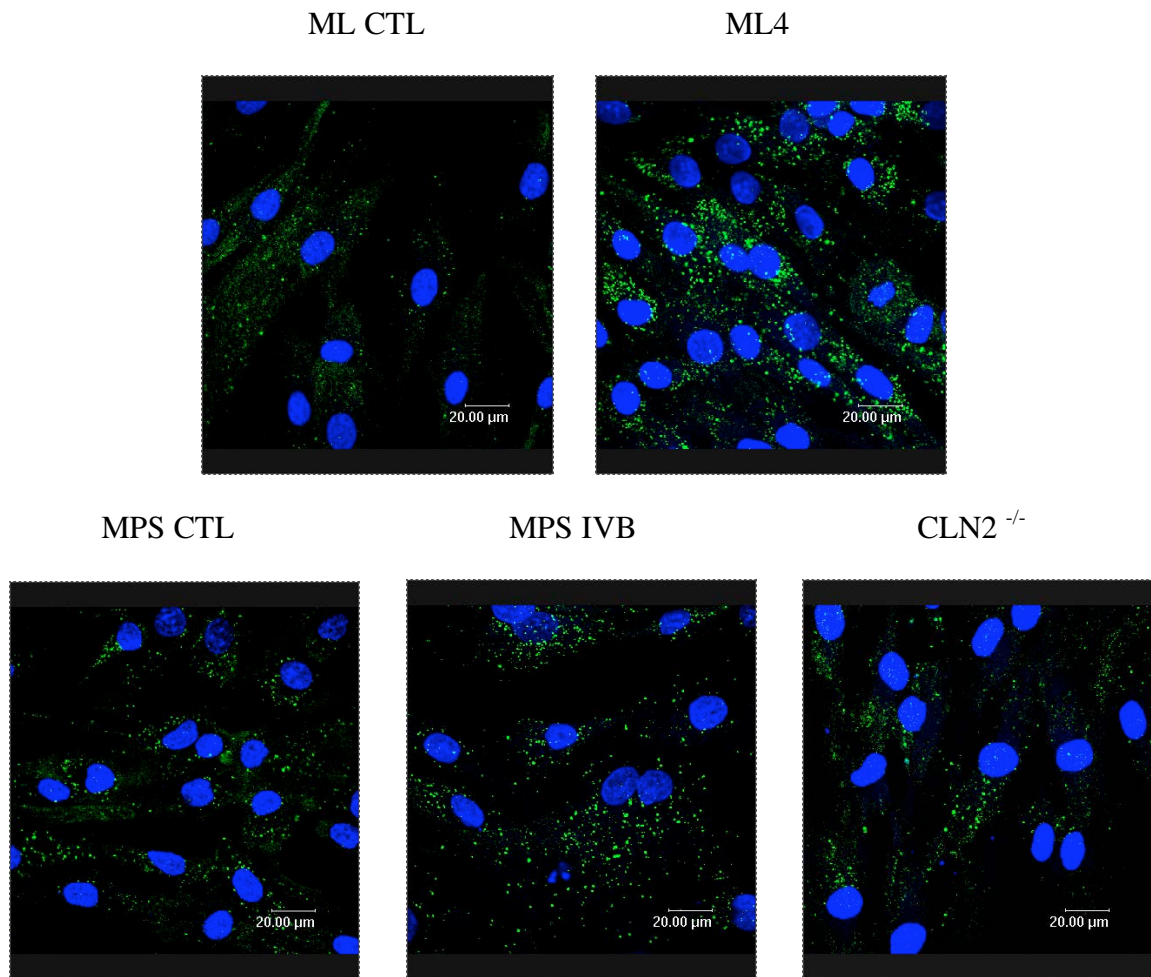
### Figure 3.3 : Micrographies électroniques de fibroblastes humains.

Les cellules ont été fixées avec de la glutaraldéhyde, puis postfixées séquentiellement avec du tétr oxyde d'osmium, de l'acide tannique et de l'acétate d'uranyle. Ensuite, elles ont été déshydratées dans différents alcools et enrobées dans une résine. Enfin, des coupes de 40 nm d'épaisseur ont été obtenues à partir des blocs de résine et contrastées dans de l'acétate d'uranyle. Sur ces micrographies, nous pouvons distinguer des noyaux (1), des citernes de réticulum endoplasmique décorées de ribosomes denses aux électrons (2), des mitochondries avec des crêtes mitochondriales intactes (3), des structures contenant des éléments denses aux électrons, probablement des lysosomes (4), des structures multiconcentriques lamellaires (5), des vacuoles réfringentes (6), des autophagosomes (7) et des saccules l'appareil de Golgi (8).



**Figure 3.4 : Immunodétection de LC3B en microscopie à épifluorescence sur les cellules ML CTL, ML4, MPS CTL, MPS IVB et CLN2<sup>-/-</sup>.**

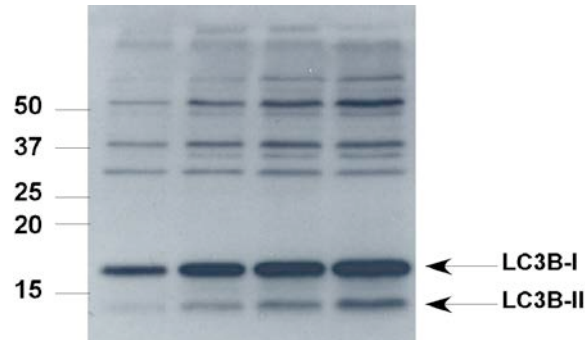
Les cellules ont été ensemencées sur des lamelles et maintenues dans un milieu complet (basal), pendant 6 h dans un milieu sans sérum, sans acides aminés non essentiels, sans L-glutamax et sans pyruvate de sodium (jeûne) ou pendant 4 h dans un milieu complet contenant de la bafilomycine A1 100 nM (bafilomycine). Ensuite, elles ont été fixées avec un mélange glacé de méthanol/acétone. Les lamelles ont été incubées pendant 2 h avec un anticorps polyclonal de lapin anti-LC3B (Sigma) puis pendant 1 h avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de lapin couplé à Alexa 488. Les anticorps étaient dilués dans du dPBS contenant de la BSA 0,1% et de la saposine 0,1%. Enfin, les lamelles ont été montées sur des lames porte-objet et observées avec un microscope à fluorescence de type Olympus Provis Ax70 (LabCeTi).



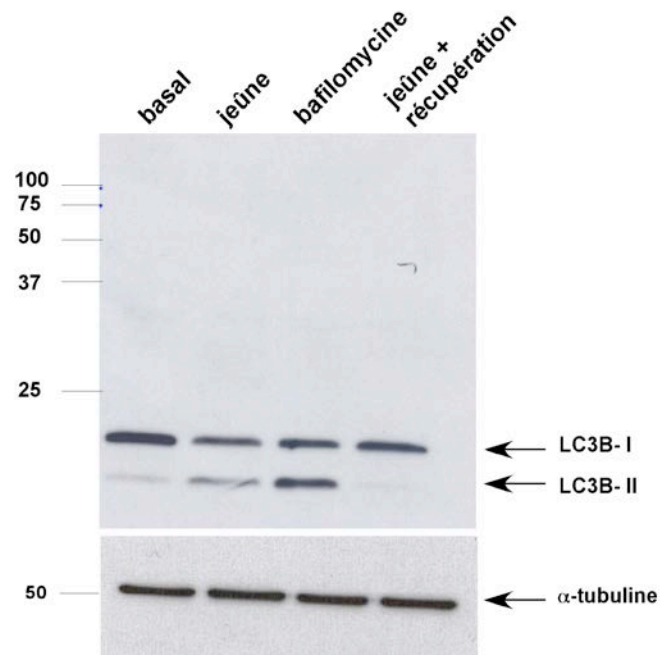
**Figure 3.5 : Immunodétection de LC3B en microscopie à fluorescence confocale sur les cellules ML CTL, ML4, MPS CTL, MPS IVB et CLN2<sup>-/-</sup> cultivées en condition basale.**

Les cellules ont étéensemencées sur des lamelles, maintenues dans un milieu complet (basal), puis fixées avec un mélange glacé de méthanol/acétone. Les lamelles ont été incubées pendant 2 h avec un anticorps polyclonal de souris anti-LC3B (nano Tools) puis pendant 1 h avec un anticorps secondaire de chèvre anti-IgG de souris couplé à Alexa 488. Les anticorps étaient dilués dans du dPBS contenant de la BSA 0,1% et de la saposine 0,1%. Les noyaux ont été marqués pendant 30 min avec du TO-PRO-3 dilué 80 fois dans du PBS contenant de la RNase A. Les lamelles ont été montées sur des lames porte-objet avec du Mowiol 4-88 et observées au microscope confocal (Leica, URBC).

**A.**



**B.**

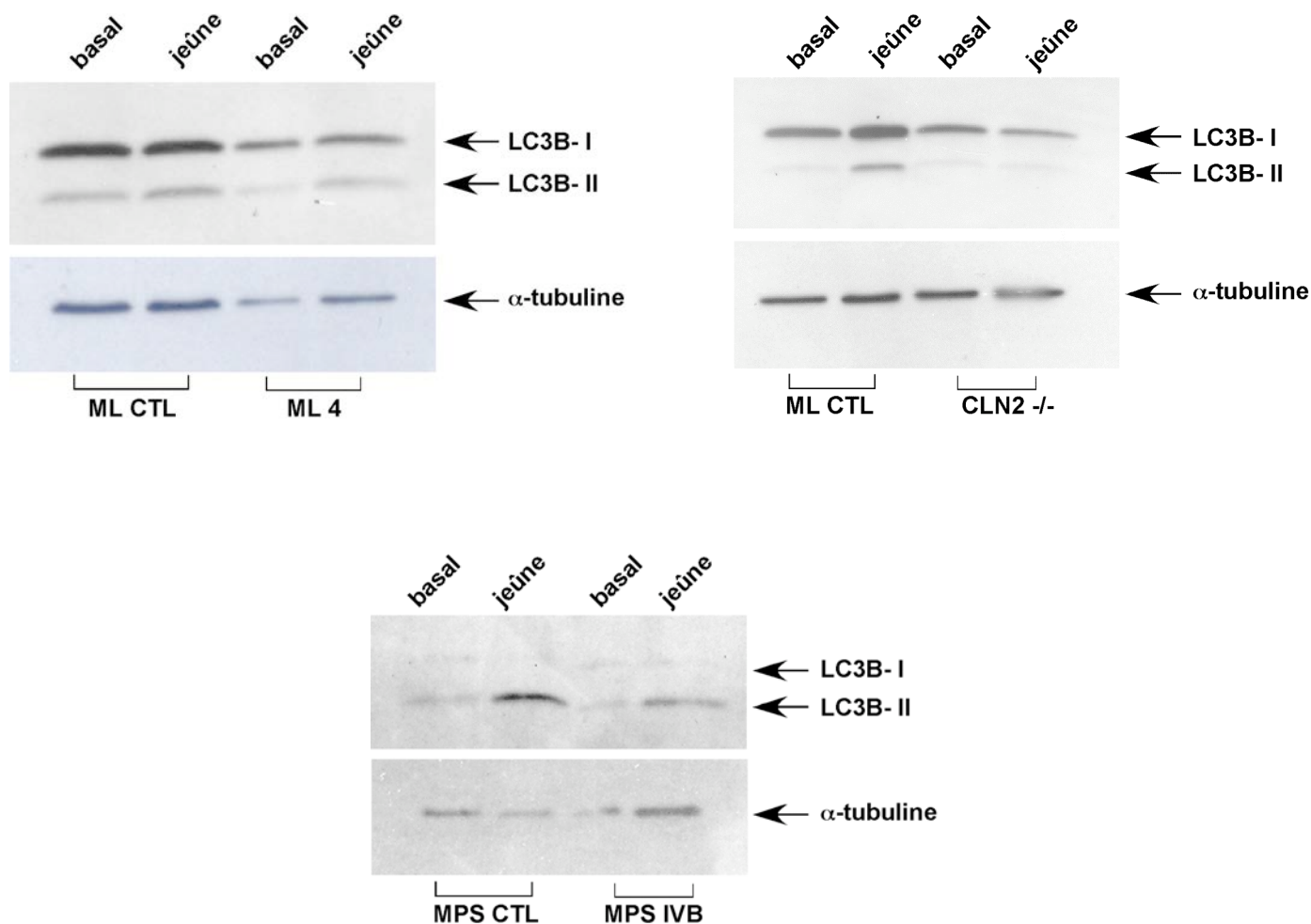


**Figure 3.6 : Détection de LC3B en Western blotting sur des lysats totaux.**

**A.** Expérience réalisée avec l'anticorps polyclonal de lapin anti-LC3B (Sigma). Les différentes pistes correspondent à des quantités croissantes de protéines provenant de lysats totaux de cellules CLN2<sup>-/-</sup>.

**B.** Expérience réalisée avec l'anticorps monoclonal de souris anti-LC3B (nano Tools). Des cellules ML CTL ont été maintenues dans un milieu complet (basal), pendant 6 h dans un milieu sans sérum avec ou pas une période de récupération de 22 h (jeûne ± récupération) ou pendant 6 h dans un milieu complet contenant de la bafilomycine A1 10 nM (bafilomycine).

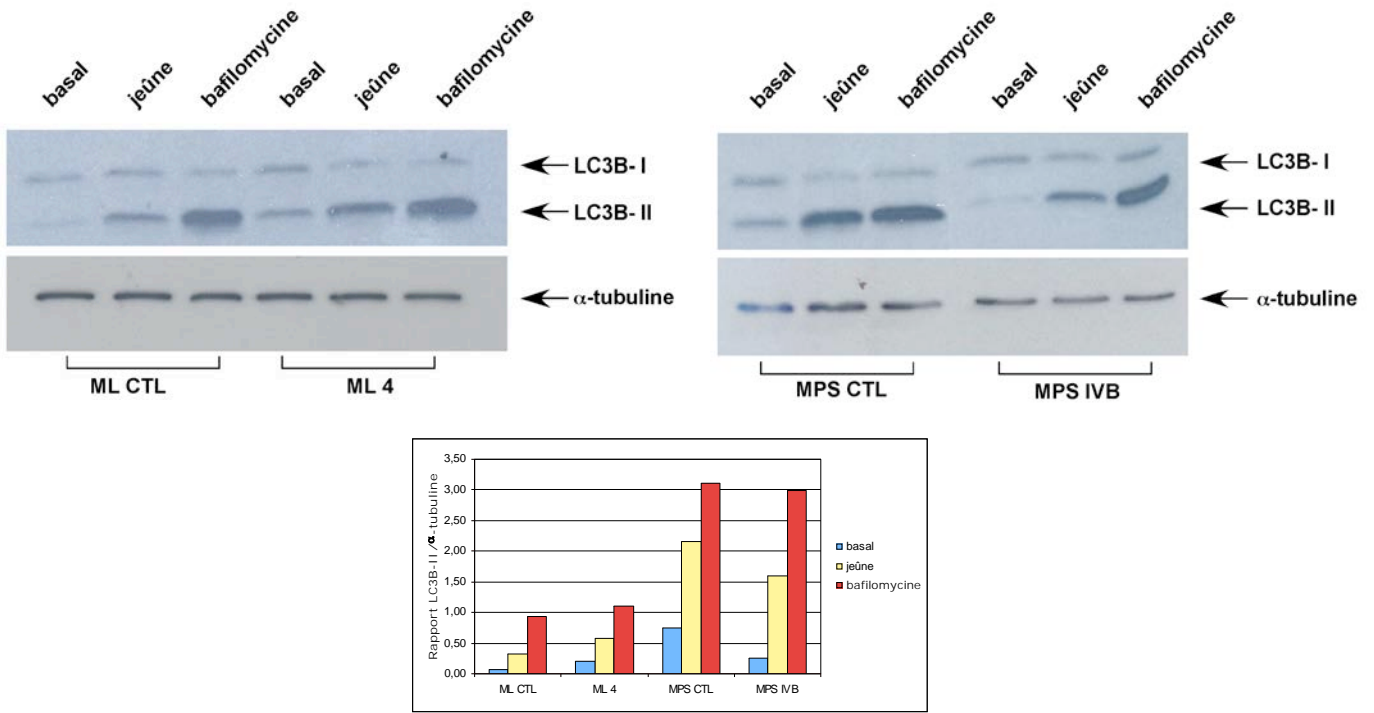
Dans les deux expériences, les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA contenant des inhibiteurs de protéases. Les échantillons ont été déposés sur des gels SDS-PAGE de 15 % en présence de  $\beta$ -mercaptoéthanol et de SDS. Après transfert électrophorétique des protéines, les membranes de PVDF ont été incubées pendant 2 h avec les anticorps anti-LC3B puis pendant 1 h avec un anticorps secondaire couplé à HRP. Les protéines LC3B ont été révélées par chémoluminescence sur des films d'autoradiographie. Dans la 2<sup>ème</sup> expérience, la membrane a été réhybridée avec un anticorps monoclonal de souris anti- $\alpha$ -tubuline (Sigma-Aldrich) afin de contrôler la quantité de protéines chargées dans chaque piste.



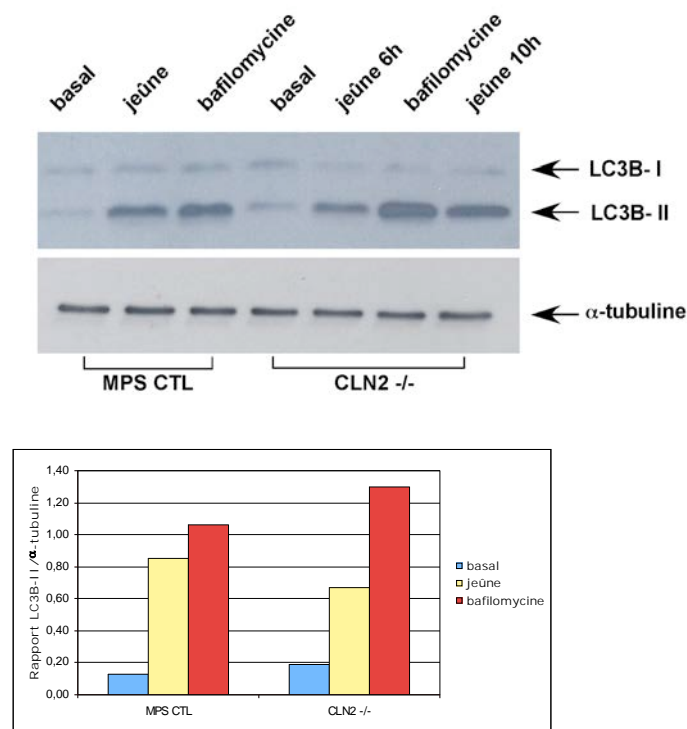
**Figure 3.7 : Détection de LC3B en condition basale et après 6h de jeûne.**

Les fibroblastes ont été cultivés pendant 6 h dans du milieu complet (basal) ou dans un milieu dépourvu de sérum, d'acides aminés non essentiels, de L-glutamax et de pyruvate de sodium (jeûne). Ensuite, les cellules ont été lysées dans du tampon RIPA contenant des inhibiteurs de protéases. Les échantillons (10 ou 15  $\mu$ g de protéines selon le type cellulaire) ont été déposés sur des gels SDS-PAGE de 15%. Après transfert électrophorétique des protéines, les membranes de PVDF ont été incubées pendant 2 h avec l'anticorps anti-LC3B (nano Tools) puis pendant 1 h avec un anticorps de chèvre IgG couplé à HRP. Le marquage de l' $\alpha$ -tubuline sert de contrôle de charge.

A.



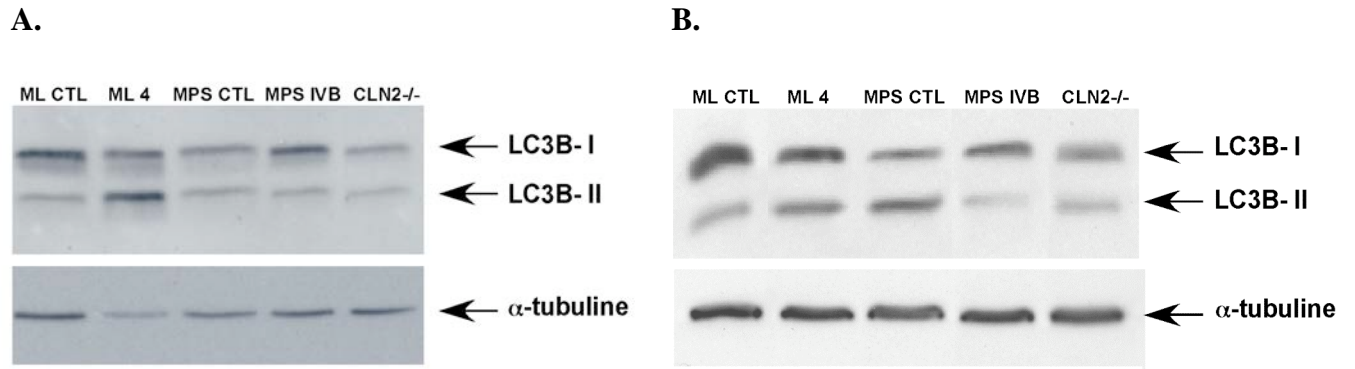
B.



**Figure 3.8 : Abondance de LC3B-II dans les lignées cellulaires placées dans différentes conditions.**

A. Cellules ML CTL, ML4, MPS CTL, MPS IVB. B. Cellules MPS CTL et CLN2<sup>-/-</sup>.

Les cellules ont été cultivées pendant 6 h dans du milieu complet, dans du milieu de jeûne ou dans du milieu complet additionné de bafilomycine A1 10 nM. Après la lyse cellulaire, 15  $\mu$ g de protéines ont été séparées par SDS-PAGE. Après transfert électrophorétique sur membrane de PVDF, LC3B-II et l' $\alpha$ -tubuline ont été révélées par immunoblotting avec des anticorps monoclonaux de souris et un anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à HRP. Les bandes ont été révélées par chemiluminescence sur films d'autoradiographie et l'intensité des bandes a été déterminée avec le programme NIH Image J.

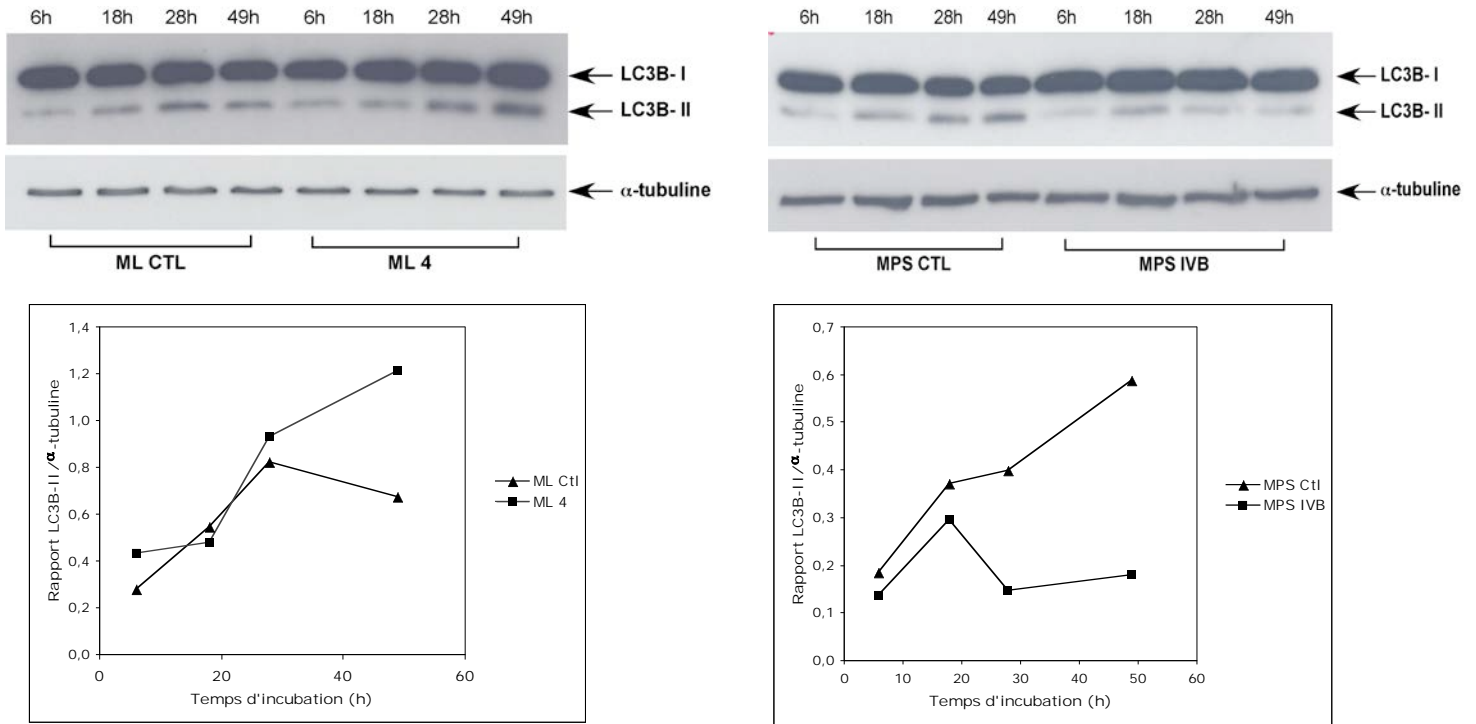


**Figure 3.9 : Abondance de la forme LC3B-II à l'état basal uniquement.**

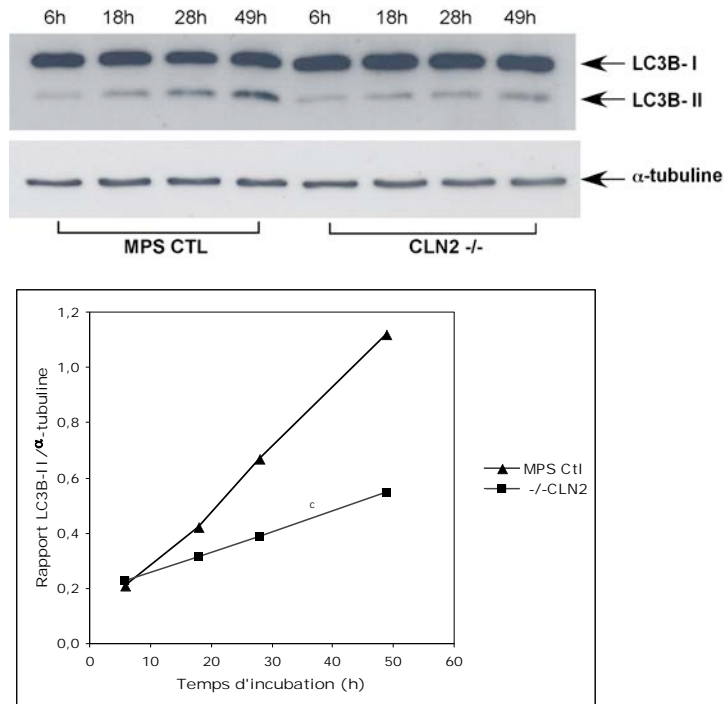
**A.** 6 h d'incubation en milieu complet. **B.** 24 h d'incubation en milieu complet.

Des cellules ML CTL, ML4, MPS CTL, MPS IVB et CLN2<sup>-/-</sup> ont été cultivées pendant 6 h dans du milieu riche en nutriments. Après la lyse cellulaire, plus de 15 à 20 µg de protéines ont été séparées par SDS-PAGE. Après transfert électrophorétique sur membrane de PVDF, LC3B-II et l'α-tubuline ont été révélées par immunoblotting avec des anticorps monoclonaux de souris et un anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à HRP. Les bandes ont été révélées par chemiluminescence sur films d'autoradiographie. A et B sont 2 expériences indépendantes.

**A.**



**B.**



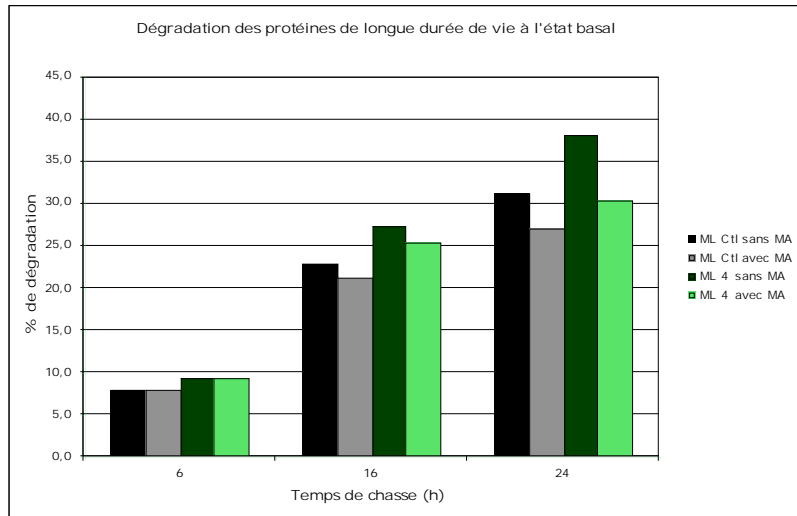
**Figure 3.10 : Cinétique de l'autophagie basale dans toutes les lignées cellulaires.**

**A :** Les cellules ML CTL, ML4, MPS CTL et MPS IVB. **B :** les cellules MPS CTL et CLN2<sup>-/-</sup>.

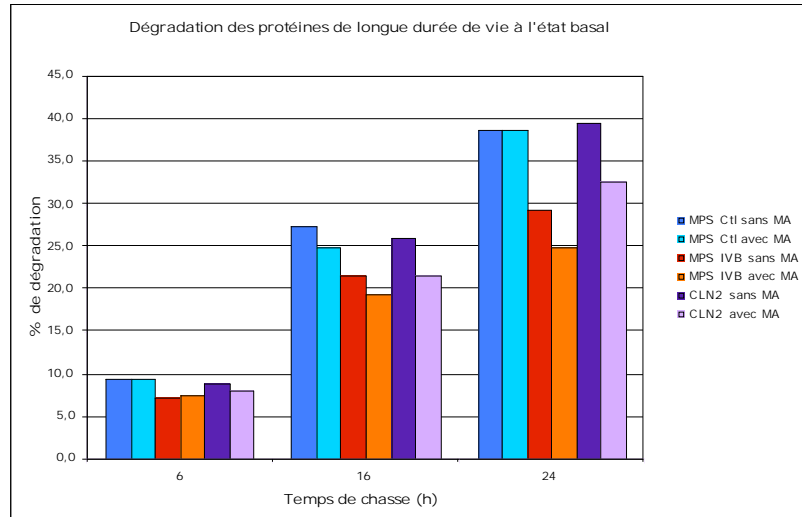
Les cellules ont été incubées pendant 6, 18 et 49 h dans un milieu complet. 15  $\mu$ g de protéines ont été chargées sur des gels SDS-PAGE de 15 %. Après transfert électrophorétique sur membrane de PVDF, LC3B-II et l' $\alpha$ -tubuline ont été révélées par immunoblotting avec des anticorps monoclonaux de souris et un anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à HRP. Les bandes ont été révélées par chemiluminescence sur films d'autoradiographie et l'intensité des bandes a été déterminée avec le programme NIH Image J.



A.



B.



	ML CTL	ML4	MPS CTL	MPS IVB	CLN2 <sup>-/-</sup>
<b>6 h</b>	0,0	-0,1 ?	0,0	-0,4 ?	1,0
<b>16 h</b>	1,5	2,0	2,6	2,3	4,4
<b>24 h</b>	4,0	7,7	-0,1 ?	4,4	7,0

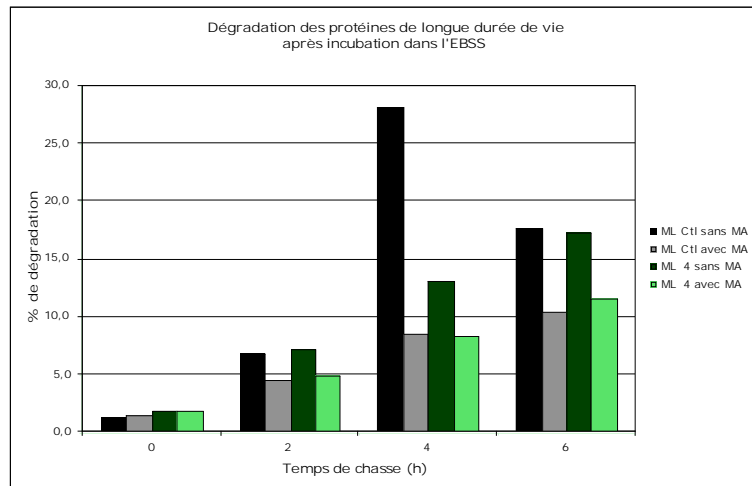
**Figure 3.11 : Cinétique de dégradation des protéines de longue durée de vie marquées à la valine <sup>14</sup>C, en condition basale.**

A. Cellules ML CTL et ML4

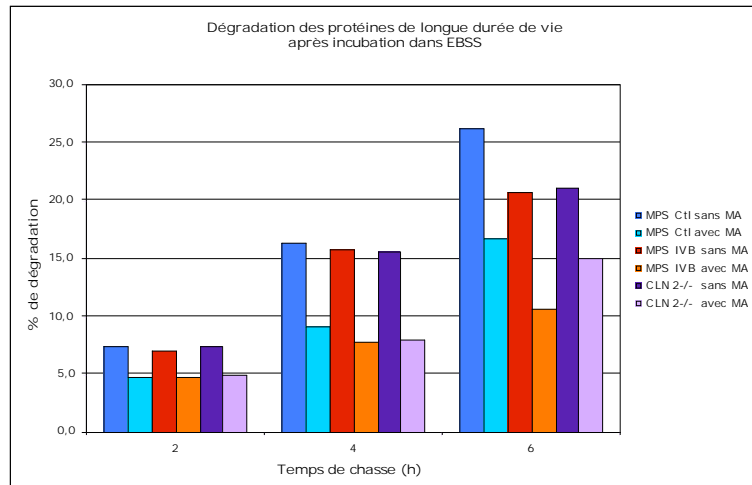
B. Cellules MPS CTL, MPS IVB et CLN2<sup>-/-</sup>.

Les cellules ont été incubées pendant une nuit à 37°C dans un milieu contenant du sérum dialysé (10%) et de la valine-<sup>14</sup>C (0.2 µCi/ml). Ensuite, elles ont été rincées et incubées pendant 4 h à 37°C dans du milieu EMEM complet contenant de la valine froide en excès, de façon à permettre la dégradation des protéines de courte durée de vie. A l'issue de cette période de 4 h, le milieu était remplacé par un milieu complet (avec ou sans 3-MA 10 mM) et les cellules étaient à nouveau incubées à 37°C pour une période de 6, 16 ou 24 h. Finalement, les milieux de culture étaient recueillis, les cellules étaient lysées et les protéines étaient précipitées avec du TCA 10%. La radioactivité soluble et précipitée a été mesurée avec un compteur β (Beckman LS6500). Sur les graphiques, les valeurs représentent le % de dégradation en présence et en absence de 3-MA. Dans le tableau, les valeurs représentent la différence entre les % obtenus en absence de 3-MA et en présence de 3-MA. Elles reflètent l'implication de la macroautophagie dans la dégradation des protéines de longue durée de vie.

A.



B.



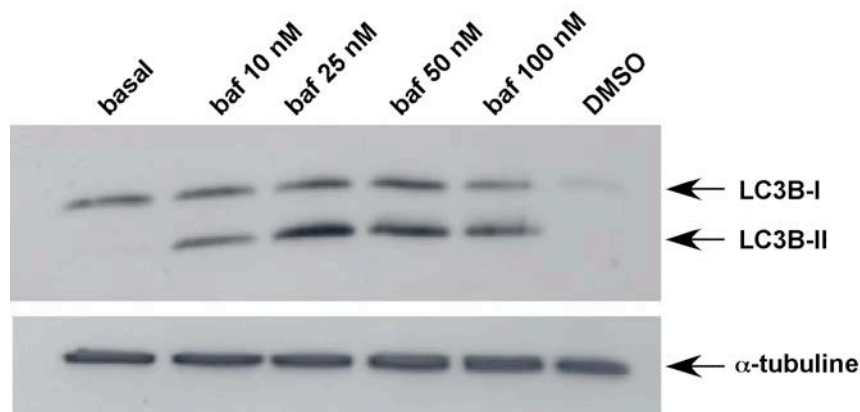
	ML CTL	ML4	MPS CTL	MPS IVB	CLN2 <sup>-/-</sup>
0 h	0,0	0,0	0,0	0,1	0,0
2 h	2,6	2,7	2,6	2,3	2,8
4 h	29,5 ?	6,0	7,1	8,0	9,6
6 h	9,7	7,7	9,5	10,1	9,0

**Figure 3.12 : Expérience de dégradation des protéines de longue durée de vie après une période de jeûne dans de l'EBSS.**

A. Cellules ML CTL et ML4

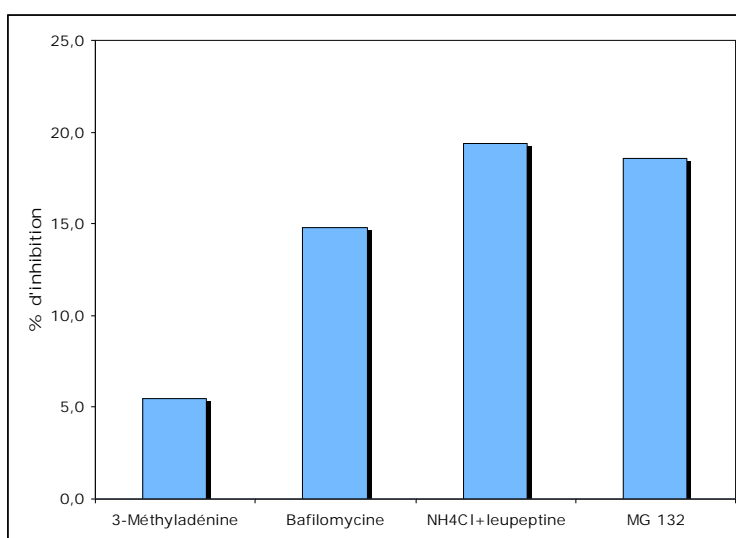
B. Cellules MPS CTL, MPS IVB et CLN2<sup>-/-</sup>.

Les cellules ont été incubées pendant une nuit à 37°C dans un milieu contenant du sérum dialysé (10%) et de la valine-<sup>14</sup>C (0.2 µCi/ml). Ensuite, elles ont été rincées et incubées pendant 4 h à 37°C dans du milieu EMEM complet contenant de la valine froide en excès, de façon à permettre la dégradation des protéines de courte durée de vie. A l'issue de cette période de 4 h, le milieu était remplacé par de l'EBSS (avec ou sans 3-MA 10 mM) et les cellules étaient à nouveau incubées à 37°C pour une période de 2, 4 ou 6 h. Finalement, les milieux de culture étaient recueillis, les cellules étaient lysées et les protéines étaient précipitées avec du TCA 10%. La radioactivité soluble et précipitée a été mesurée avec un compteur β (Beckman LS6500). Sur les graphiques, les valeurs représentent le % de dégradation en présence et en absence de 3-MA. Dans le tableau, les valeurs représentent la différence entre les % obtenus en absence de 3-MA et en présence de 3-MA. Elles reflètent l'implication de la macroautophagie dans la dégradation des protéines de longue durée de vie.



**Figure 3.13 : Inhibition de la fusion des autophagosomes avec les lysosomes par incubation avec la bafilomycine.**

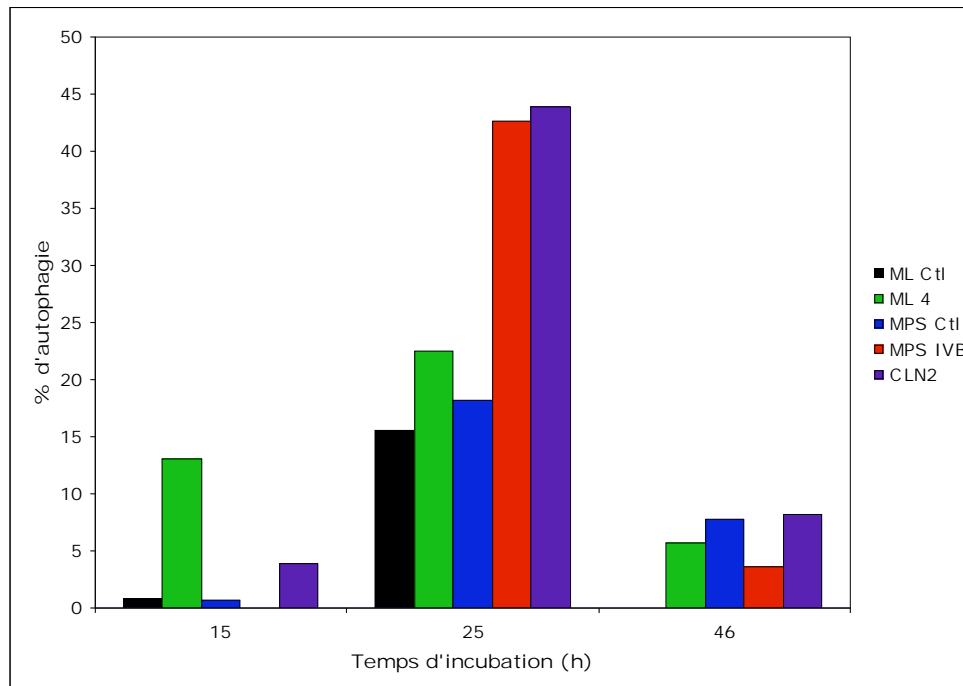
Des cellules ML CTL ont été incubées pendant 6 h dans un milieu complet contenant du DMSO ou des concentrations croissantes de bafilomycine A1 (0, 10, 25, 50 et 100 nM). 12 µg de protéines ont été chargées sur des gels SDS-PAGE de 15%. Après transfert électrophorétique sur membrane de PVDF, LC3B-II et l'α-tubuline ont été révélées par immunoblotting avec des anticorps monoclonaux de souris et un anticorps secondaire de chèvre anti-souris couplé à HRP. Les bandes ont été révélées par chemiluminescence sur films d'autoradiographie.



Contrôles	% de dégradation	Inhibiteurs	% de dégradation	Δ
Basal	42,0	3-Méthyladénine	36,5	5,5
		NH4Cl	22,6	14,8
DMSO	37,8	Bafilomycine	23,0	19,4
		MG132	19,2	18,6

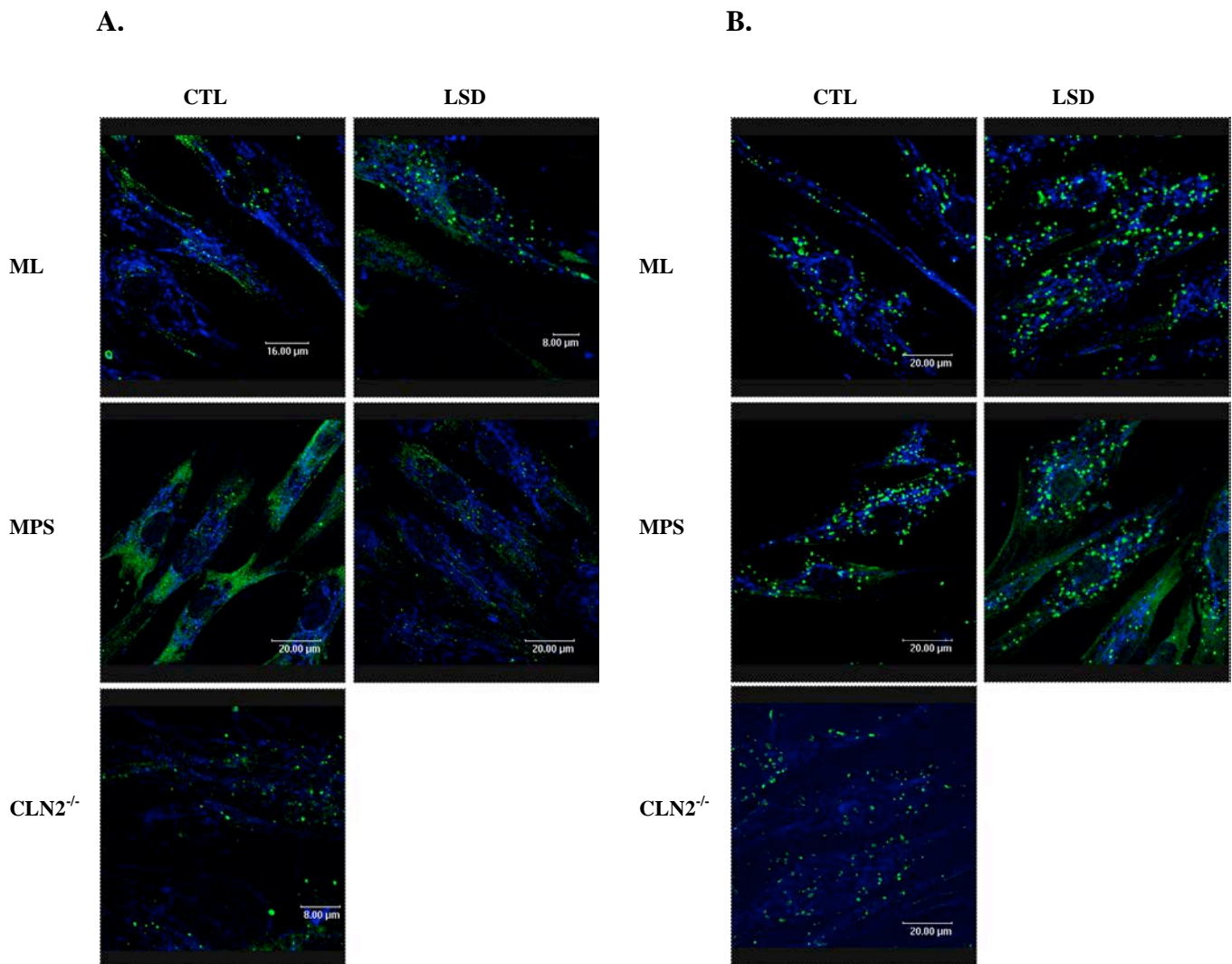
**Figure 3.14 : Dégradation des protéines de longue durée de vie en présence d'inhibiteurs.**

Les cellules ML4 ont été marquées avec de valine-<sup>14</sup>C (0,2 µCi/ml) comme décrit dans la légende de la figure 3.11. À l'issue de la période de 4 h post-marquage, le milieu a été remplacé par un milieu complet contenant du DMSO, de la 3-MA 10 mM, de la bafilomycine 25 nM, du NH<sub>4</sub>Cl 10 mM + Leupeptine 250 µM ou du MG 132 1 µM pour une période de 24 h. Finalement, les milieux de culture étaient recueillis, les cellules étaient lysées et les protéines étaient précipitées avec du TCA 10 %. La radioactivité soluble et précipitée a été mesurée avec un compteur β (Beckman LS6500). Sur les graphiques, les valeurs représentent le pourcentage de dégradation en présence et en absence d'inhibiteur.



**Figure 3.15 : Cinétique de dégradation des protéines de longue durée de vie marquées avec du Tran<sup>35</sup>S label, en condition basale.**

Les cellules ML CTL, ML4, MPS CTL, MPS IVB et CLN2<sup>-/-</sup> ont été incubées pendant une nuit à 37°C dans un milieu contenant du sérum dialysé (10%) et du Trans<sup>35</sup>S label (2 µCi/ml). Ensuite, elles ont été rincées et incubées pendant 4 h à 37°C dans du milieu EMEM complet contenant de la méthionine froide en excès. À l'issue de cette période de 4 h, le milieu était remplacé par un milieu complet (avec ou sans 3-MA 10 mM) et les cellules étaient à nouveau incubées à 37°C pour une période de 15, 25 ou 46 h. Finalement, les milieux de culture étaient recueillis, les cellules étaient lysées et les protéines étaient précipitées avec du TCA 10%. La radioactivité soluble et précipitée a été mesurée avec un compteur β (Beckman LS6500). Sur les graphiques, les valeurs représentent le pourcentage de dégradation en présence et en absence de 3-MA. Dans le tableau, les valeurs représentent la différence entre les pourcentages obtenus en absence de 3-MA et en présence de 3-MA.



**Figure 3.16 : Immunodétection de COX-1 et de LC3B en microscopie à fluorescence confocale.**

**A :** Condition basale. **B :** Condition de jeûne

Les cellules ML CTL, ML4, MPS CTL, MPS IVB et CLN2<sup>-/-</sup> ont été maintenues en culture dans un milieu complet (basal) ou dans de l'EBSS (jeûne) pendant 2h à 37°C. Ensuite, elles ont été fixées et perméabilisées avec du méthanol 100 % pendant 5 min, suivi de l'acétone 80 % pendant 2 min, à -20°C. Après une étape de saturation en présence de dPBS/BSA 2 %, les lamelles sur lesquelles étaient ensemencées les cellules ont été incubées pendant 2 h avec un anticorps polyclonal de lapin anti-LC3B (Sigma) puis avec un anticorps monoclonal de souris anti-COX-1. Ensuite, les lamelles ont été incubées pendant 1 h avec les anticorps secondaires anti-IgG de lapin couplé à Alexa Fluor 488 (LC3B en vert) et anti-IgG de souris couplé à Alexa Fluor 633 (COX-1 en bleu). Enfin, les lamelles ont été montées sur des lames porte-objet avec du Mowiol 4-88 et observées séquentiellement au microscope confocal (Leica, URBC).