

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE n°524 Biologie – Santé

FACULTE de Médecine

EA 3842 : «Homéostasie Cellulaire et Pathologies»

Thèse N° []

Thèse
pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges

Discipline / Spécialité : Neurosciences

présentée et soutenue par

Mlle Amandine Magnaudeix

le 27 septembre 2011

Autophagie dans le système nerveux central et neuroprotection

**Thèse dirigée par Mme le Professeur Catherine Yardin et Mr le Docteur Faraj
Terro**

JURY :

Rapporteurs :

Mr Patrice Codogno - Directeur de Recherche, INSERM U984, Paris-Sud 11

Mr Nicolas Sergeant - Directeur de Recherche, INSERM U837, Lille II

Examineurs :

Mlle Guylène Page - Professeur des Universités, GReViC EA3808, Poitiers

Mr Benoît Funalot - Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, CHU Limoges

Directeurs de thèse :

Mme Catherine Yardin - Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, EA3842 Limoges

Mr Faraj Terro - Maître de Conférence Universitaire, Praticien Hospitalier, EA3842, Limoges

UNIVERSITE DE LIMOGES

ECOLE DOCTORALE n°524 Biologie – Santé

FACULTE de Médecine

EA 3842 : «Homéostasie Cellulaire et Pathologies»

Thèse N° []

Thèse
pour obtenir le grade de
Docteur de l'Université de Limoges

Discipline / Spécialité : Neurosciences

présentée et soutenue par

Mlle Amandine Magnaudeix

le 27 septembre 2011

Autophagie dans le système nerveux central et neuroprotection

**Thèse dirigée par Mme le Professeur Catherine Yardin et Mr le Docteur Faraj
Terro**

JURY :

Rapporteurs :

Mr Patrice Codogno - Directeur de Recherche, INSERM U984, Paris-Sud 11

Mr Nicolas Sergeant - Directeur de Recherche, INSERM U837, Lille II

Examineurs :

Mlle Guylène Page - Professeur des Universités, GReViC EA3808, Poitiers

Mr Benoît Funalot - Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, CHU Limoges

Directeurs de thèse :

Mme Catherine Yardin - Professeur des Universités, Praticien Hospitalier, EA3842 Limoges

Mr Faraj Terro - Maître de Conférence Universitaire, Praticien Hospitalier, EA3842, Limoges

A ma famille...

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	10
Résumé	13
Summary	14
Abréviations	15
Index des figures	22
Index des tableaux	28
Codes et unités internationales	29
PRÉAMBULE	31
ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE	34
<hr/>	
PARTIE 1 : VOIES CATABOLIQUES DE LA CELLULE EUCARYOTE	35
<hr/>	
HISTORIQUE	35
LE CONCEPT D'HOMÉOSTASIE PROTÉIQUE	38
Protéostasie : principe de fonctionnement	38
Protéostasie et vieillissement	41
Interconnexions entre les voies cataboliques cellulaires	44
Mécanismes de formation des inclusions neuronales caractéristiques des pathologies neurodégénératives	45
LE SYSTÈME UBIQUITINE-PROTÉASOME	47
Ubiquitylation et systèmes «ubiquitin-like» (UBL)	47
Dégradation des substrats : le protéasome 26S	50
LES VOIES LYSOSOMALES	51
Le lysosome	51
Les voies d'endocytose (Hétérophagie)	54

L'autophagie	54
La microautophagie	55
L'autophagie assistée par des chaperons protéiques	57
La macroautophagie (cf Partie 2)	59
La voie CVT (Cytoplasm to Vacuole Targeting) : transport de protéines à la vacuole	59
PARTIE 2 : LA MACROAUTOPHAGIE	63
<hr/>	
PRINCIPE GÉNÉRAL	63
MÉCANISMES MOLÉCULAIRES	65
La signalisation autophagique	65
La voie TOR/mTOR et inhibition de l'autophagie	66
Voies d'inhibition de l'autophagie dans les cellules de mammifères	70
TORC1 et phosphatases	80
Déroulement : de la formation du phagophore à la dégradation du substrat	84
Autophagie chez la levure	84
Autophagie chez les mammifères	89
Importance des phosphoinositides pour l'autophagie	90
<i>Les complexes hVPS34-p150-Beclin-1</i>	92
<i>PI(3)P Phosphatases</i>	94
Mise en place de l'omégasome	94
Nucléation et expansion de la membrane d'isolement	97
<i>Origine de la membrane autophagosomale</i>	106
Maturation des autophagosomes et fusion avec les lysosomes	108
<i>Les protéines LAMP1 et LAMP2</i>	113
AUTOPHAGIE ET CYTOSQUELETTE	115
Filaments d'actine et autophagie spécifique	116
Les microtubules	116

AUTOPHAGIE SPÉCIFIQUE	119
Distinction entre autophagie constitutive et autophagie induite par un stress	119
Acteurs et voies : importance des récepteurs autophagiques	121
Agréphagie : p62 et ses partenaires	127
<i>Homo-oligomérisation de p62 et formation des agrésomes</i>	129
PARTIE 3 : RÔLES ET PHYSIOLOGIE DE L'AUTOPHAGIE	134
<hr/>	
RÔLES PHYSIOLOGIQUES DE L'AUTOPHAGIE	134
Développement : morphogenèse et embryogenèse	134
Importance de l'autophagie au niveau tissulaire : pathologies associées à l'autophagie	135
Modèles animaux de modifications des gènes impliqués dans l'autophagie	135
Dysfonctionnements de l'autophagie et pathologies	136
Contrôle autonome de l'autophagie par la cellule	148
Modulation de l'autophagie et stress cellulaire	149
Stress du réticulum endoplasmique	149
Stress oxydatif	150
Relations entre autophagie et mort cellulaire	151
CARACTÉRISTIQUES DE L'AUTOPHAGIE NEURONALE	155
Particularités du système nerveux central	155
Système lysosomal neuronal	156
Autophagie canonique et autophagie neuronale	157
Rôles de l'autophagie neuronale	157
Voies neuronales de contrôle de l'autophagie	157
Spécificités de l'autophagie dans les neurones	158
PARTIE 4 : MALADIE D'ALZHEIMER ET AUTOPHAGIE	161
<hr/>	
La maladie d'Alzheimer est une amyloïdopathie	161
<hr/>	

La maladie d'Alzheimer est aussi une tauopathie	163
Généralités sur la protéine tau	164
Phosphorylation des protéines tau	165
Agrégation de tau et maladie d'Alzheimer	166
La maladie d'Alzheimer : une pathologie lysosomale ?	168
Liens entre autophagie et toxicité du peptide A β	169
Protéine tau et autophagie	171
Modèle incluant la pathologie autophagique lysosomale à la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer	173
HYPOTHÈSES ET OBJECTIFS	175
<hr/>	
RÉSULTATS ET DISCUSSION	178
<hr/>	
PARTIE 1 : ANALYSE COMPARATIVE DE L'AUTOPHAGIE DANS DIFFÉRENTS TYPES CELLULAIRES DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL	179
<hr/>	
CARACTÉRISATION DES CULTURES PRIMAIRES CORTICALES	180
ANALYSE DE L'AUTOPHAGIE BASALE ET INDUITE DANS LES NEURONES EN COMPARAISON AVEC LES ASTROCYTES	181
Immunofluorescences dans les cultures primaires corticales enrichies en neurones.	181
Détection des autophagosomes in situ	181
Profils d'expression de Beclin-1	183
Immunofluorescences dans les cultures primaires corticales enrichies en astrocytes	184
ANALYSE DES MARQUEURS AUTOPHAGIQUES PAR WESTERN-BLOT	185
ANALYSE DU FLUX AUTOPHAGIQUE DANS LES CULTURES PRIMAIRES MIXTES	189
Analyse en western-blot	189
Densité autophagosomale en fonction des types cellulaires en microscopie confocale	191

PARTIE 2 : ETUDE DE L'EFFET DE L'AMPHOTÉRICINE B SUR L'AUTOPHAGIE **197**

EFFETS DE L'AMB SUR L'AUTOPHAGIE DANS LES CELLULES DE LA LIGNÉE COS-7 **199**

Analyse de la toxicité de l'AmB **199**

Effet de l'AmB sur la viabilité cellulaire **199**

Clivage de la caspase-3 **199**

Variations des marqueurs autophagiques causées par l'AmB **200**

Détection des autophagosomes in situ **200**

Visualisation de Beclin-1 en immunofluorescence **203**

Analyse des marqueurs autophagiques en western-blot **203**

EFFETS DE L'AMB DANS LES CULTURES PRIMAIRES NEURONALES **205**

Cultures primaires corticales d'embryons de rat **206**

Gamme de concentrations **206**

Analyse des marqueurs autophagiques en western-blot **207**

Vésicules autophagiques in situ **208**

EFFETS DE L'AMB SUR LES VOIES DE L'AMPK ET MTOR **212**

EFFETS DE L'AMB SUR LA CMA **213**

PARTIE 3 : EFFET INHIBITEUR DE L'ACIDE OKADAÏQUE SUR L'AUTOPHAGIE. RÔLE DE LA PROTÉINE PHOSPHATASE 2A **218**

CINÉTIQUE ET TEST DE DOSES D'ACIDE OKADAÏQUE **220**

L'INHIBITION DE LA PP2A PAR L'ACIDE OKADAÏQUE INHIBE L'AUTOPHAGIE ET PROVOQUE UNE ACCUMULATION INTRANEURONALE DE PROTÉINES UBIQUITINYLÉES **223**

L'acide okadaïque inhibe l'autophagie en amont des phases de maturation **223**

La suppression de l'activité de la PP2A par extinction de l'expression de sa sous-unité catalytique inhibe l'autophagie **228**

L'acide okadaïque inhibe l'autophagie induite par différents stress **230**

Effet de l'inactivation de la PP2A sur les voies de signalisation dépendantes de l'AMPK et de mTOR 233

L'inhibition de la PP2A provoque une relocalisation de p62 au sein d'inclusions cytoplasmiques positives pour l'ubiquitine 235

L'inhibition de la PP2A par l'OKA modifie la distribution de LC3-I entre une population cytosolique libre et une fraction liée (fraction insoluble dans le Triton X-100) 239

INFLUENCE DE LA RAPAMYCINE SUR LA DISTRIBUTION DE LC3-I 241

EFFETS DE LA RAPAMYCINE SUR LES NIVEAUX DE PHOSPHORYLATION DE TAU 242

DISCUSSION GÉNÉRALE, CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES 253

MATÉRIEL ET MÉTHODES 265

CULTURES 266

CULTURES PRIMAIRES CORTICALES 266

Solutions 266

Protocole 266

Préparation des supports de culture 266

Dissection 267

Culture 267

CULTURES PRIMAIRES CORTICALES ENRICHIES EN ASTROCYTES 268

LIGNÉES CELLULAIRES 268

COS-7 268

SH-SY5Y 269

TRAITEMENTS 269

Induction de l'autophagie 269

Par un stress nutritionnel 269

Pharmacologiquement 270

Analyse du flux autophagique 270

Evaluation de la survie cellulaire par le test MTT	271
TRANSFECTIONS	271
Transfection de cellules COS-7 par le vecteur pEGFP-LC3	271
Extinction de l'expression de la PP2A-C dans les cultures primaires corticales	272
WESTERN-BLOT	273
Solutions	273
Extraction protéique	274
Extraction protéique totale	274
Fractionnement cellulaire	275
Electrophorèse sur gel de polyacrylamide	276
Préparation des gels « simples »	276
Préparation des gels en gradients de concentrations	277
Electrophorèse	277
Transfert sur membrane de PVDF	277
Saturation des sites antigéniques aspécifiques	278
Immunomarquage et révélation	278
IMMUNOFLUORESCENCES INDIRECTES	280
Fixation des cellules	280
Perméabilisation et saturation	280
Immunomarquage	280
Contre-marquage nucléaire	281
Observation	281
Microscopie électronique	281
Bibliographie	283
Glossaire	323
Annexes	327

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier Monsieur le Docteur Patrice Codogno et Monsieur le Docteur Nicolas Sergeant de nous avoir fait l'honneur d'être les rapporteurs de ce travail et de participer au jury de cette thèse.

Je souhaite également adresser mes remerciements à Mademoiselle le Professeur Guylène Page et à Monsieur le Docteur Benoît Funalot d'avoir accepté de juger ce travail de

Je remercie sincèrement Mr le Docteur Faraj Terro pour la confiance qu'il m'a accordée, sa disponibilité et son soutien au cours de ces années de thèse et sans qui ce travail n'aurait pu avoir lieu.

Je tiens à remercier Mme le Professeur Catherine Yardin pour son soutien et sa gentillesse.

Un grand remerciement à l'association France Alzheimer et Maladies Apparentées et aux personnes qui lui sont associées pour leur soutien financier et la confiance accordée au projet.

J'adresse mes remerciements à Madame le Professeur Marie-Odile Jauberteau pour m'avoir accueillie au sein de l'EA3842.

Je remercie Mr le Docteur Fabrice Lalloué pour son soutien, son aide et ses conseils pour cette année en tant qu'ATER. Mes remerciements vont également à Madame le Docteur Mireille Verdier et Madame le Professeur Danielle Troutaud pour leur disponibilité et leur soutien.

Je tiens à remercier Mademoiselle Claire Carrion et Monsieur le Docteur Eric Pinaud pour leur aide, leur disponibilité et leur gentillesse.

Merci à Monsieur le Docteur Daniel Rondelaud pour ses conseils et son soutien.

Je souhaite aussi remercier Madame Françoise Forestier et Madame Marie-Laure Perrin pour leur aide indispensable, leur disponibilité et leur gentillesse.

Mes remerciements s'adressent également à tous les doctorants et étudiants que j'ai côtoyés : Cynthia, Elodie, Marie-Claude, Mathilde, Romain, Carole, Hussein, Thomas, Pierre et à ceux qui ont partagé ce cheminement vers la recherche depuis un peu plus longtemps : Thomas, Rémi, Vincent, Guillaume, Carine, Sébastien...

Merci à Anne (maintenant je connais toutes les nuances de couleur comprises entre le parme et le lilas), Charlotte (et ses poneys) et Sugan, stagiaires au laboratoire.

Je tiens également à remercier Madame le Docteur Cornelia Wilson, pour son aide inestimable, son amitié et son soutien.

Je souhaite remercier profondément Mademoiselle le Docteur Sylvie Bourthoumieu, pour son aide, sa gentillesse, sa logique et ses conseils affutés.

Un grand merci à Monsieur le Docteur Ludovic Martin, présent depuis le début, avant tout pour son amitié, mais aussi pour ses conseils avisés, sa très grande patience, et pour avoir partagé sa vision de la recherche.

Un énorme merci à Marion et à Xénia, pour leur amitié indéfectible ainsi qu'à Marie.

Je remercie enfin mes parents et ma grand-mère pour leur amour et leur soutien, vous m'avez permis de dépasser mes doutes. Merci à mon frère Vincent, mes sœurs Diane et Ségolène, et mon

beau-frère Vincent, on peut compter sur vous... Merci Tonton de m'avoir aidé à découvrir la beauté des « petites choses ».

Je souhaite enfin adresser une pensée à toi, Pépé, qui n'a pas pu voir l'aboutissement de ce travail.

RÉSUMÉ

La macroautophagie est l'une des voies cataboliques majeures de la cellule eucaryote. Elle joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie protéique. Une caractéristique commune à la plupart des pathologies neurodégénératives est la présence d'agrégats protéiques dans les cerveaux de patients. Il s'agit par exemple de l'accumulation de dépôts extracellulaires de peptide β -amyloïde et d'agrégats intra-neuronaux de protéine tau hyperphosphorylée dans la maladie d'Alzheimer. A l'heure actuelle, nous ne savons pas si ces anomalies participent directement à la pathogenèse ou si elles en sont une conséquence. Au cours du vieillissement, facteur de risque majeur pour la survenue de pathologies neurodégénératives, l'activité des voies cataboliques décline. La suppression de l'autophagie dans le SNC de souris est suffisante pour causer la neurodégénérescence et la formation d'inclusions protéiques intraneurales. L'induction de l'autophagie *in vitro* et *in vivo* est protectrice contre la surexpression de protéines pathologiques. Donc l'autophagie peut être considérée comme un mécanisme neuroprotecteur.

Au cours de ce travail nous avons mis en évidence que l'activité autophagique basale était faible dans les neurones en comparaison avec les astrocytes. Ceci nous a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle cette faible activité autophagique constituerait une propriété intrinsèque neuronale contribuant à l'accumulation d'agrégats protéiques dans ces cellules, au cours des pathologies neurodégénératives. L'induction de l'autophagie étant considérée comme neuroprotectrice, nous avons caractérisé ensuite les propriétés pro-autophagiques d'une molécule antifongique, l'amphotéricine B dans des lignées cellulaires et dans des cultures primaires de neurones corticaux de rat dans lesquelles l'effet de cette substance est plus modéré. Cependant, les propriétés neuroprotectrices de cette substance restent à déterminer. Par ailleurs, nous avons montré que l'inactivation pharmacologique ou moléculaire de la PP2A dans nos cultures corticales primaires de neurones induisait une inhibition de l'autophagie, au niveau des phases précoces de ce processus, associée à l'accumulation intraneuronale d'inclusions positives pour p62 et l'ubiquitine. De plus, l'inhibition de la PP2A conduit à des anomalies de la distribution de la protéine MAP-LC3-I, composant clé de la machinerie autophagique, entre des fractions solubles et insolubles au détergent Triton X-100. La signification de cette mal-distribution de LC3-I ainsi que les mécanismes moléculaires de la régulation de l'autophagie par la PP2A restent à déterminer. Ces données sont importantes car elles apportent la preuve de l'existence d'un lien entre trois caractéristiques pathologiques observées au cours de la maladie d'Alzheimer : la réduction de l'activité de la PP2A, des anomalies de l'autophagie et l'agrégation protéique.

Mots clés : Autophagie, Neuroprotection, Alzheimer, Neurones, PP2A, tau

SUMMARY

Macroautophagy is one of the major catabolic routes in the eukaryotic cell. This process plays an important role in the protein homeostasis maintenance. Presence of protein aggregates in the brain are a common characteristic of most of neurodegenerative diseases. In the case of Alzheimer's disease, these aggregates consist in extracellular deposits of amyloid- β peptide and intraneuronal aggregates of hyperphosphorylated tau. Whether these abnormalities are directly involved in pathogenesis or are a consequence is not yet established. During aging, which is a major risk factor for appearance of neurodegenerative diseases, catabolic pathway activity is down-regulated. Abolition of autophagy in the mouse CNS is sufficient to cause the neurodegeneration and intraneuronal protein inclusion formation. Autophagy induction *in vitro* and *in vivo* protects against pathological protein overexpression. Consequently, autophagy can be considered as a neuroprotective mechanism.

During this work, we showed that basal autophagic activity was low in neurons when compared to astrocytes, leading us to emit the hypothesis that this low autophagic activity could be a neuronal intrinsic property contributing to protein aggregate accumulation during development of neurodegenerative pathologies. Autophagy induction being neuroprotective, we characterised the pro-autophagic properties of an anti-fungal molecule, Amphotericin B (AmB) in cell lines and rat neuronal primary cultures where its effect is moderate. However, AmB neuroprotective capacities need to be determined. Beside, we showed that pharmacological or molecular inactivation of PP2A in primary cortical neuronal cultures, inhibited autophagy in early stages of the process associated with the formation of intraneuronal p62- and ubiquitin-positive inclusions. Moreover, PP2A inhibition led to abnormalities of LC3-I distribution, key protein of the autophagic core machinery, between soluble- and insoluble-Triton X-100 fractions. Significance of this mal-distribution as well as the molecular mechanisms of PP2A involvement in regulation of autophagy remain to be determined. These data are important since they provide links between three pathological features observed in Alzheimer's disease : down-regulation of PP2A, autophagy abnormalities and protein aggregation.

Key words: Autophagy, neuroprotection, Alzheimer's disease, PP2A, tau

ABRÉVIATIONS

(D)ALIS	<i>(Dendritic cells) Aggresome-Like Inducible Structure</i>
(h)VPS34	<i>(human) Vacuolar Protein Sorting 34)</i>
(MAP-)LC3	<i>(Microtubule-Associated Protein) Light-Chain 3</i>
3-MA	<i>3-Méthyladénine</i>
Aβ	<i>Peptide β-amyloïde</i>
aa	<i>Acide Aminé</i>
AAA	<i>ATPases Associated with diverse cellular Activities</i>
AAP	<i>Amino Acid Permease</i>
ABD	<i>Ams1 Binding Domain</i>
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
ADN	<i>Acide Désoxyribonucléique</i>
AICD	<i>AβPP Intracellular Domain</i>
Alfy	<i>Autophagy-Linked FYVE</i>
AmB	<i>Amphotéricine B</i>
AMBRA-1	<i>Activating Molecule in Beclin-1 Regulated Autophagy 1</i>
AMPA	<i>acide α-amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique</i>
AMPK	<i>Adenosine 5'-MonoPhosphate-activated protein Kinase</i>
Ams1	<i>α-mannosidase 1</i>
AP3	<i>Adaptor Protein complex 3</i>
Ape1	<i>Aminopeptidase 1</i>
Ape4	<i>Aspartyl aminopeptidase 4</i>
APF-1	<i>ATP-dependent proteolysis factor-1)</i>
APH-1	<i>Anterior Pharynx-defective phenotype</i>
APOE	<i>Apolipoprotéine E</i>
APP	<i>Amyloid Precursor Protein</i>
ARL8	<i>ADP-ribosylation factor-Like 8</i>
ARNi	<i>ARN interférence</i>
ARNm	<i>Acide Ribonucléique messenger</i>
Arp2/3	<i>Actin Related Protein 2/3</i>
ATG/Atg	<i>Autophagy Related Gene ou Autophagy</i>
ATM	<i>Ataxia Telangiectasia Mutated</i>
ATP	<i>Adénosine TriPhosphate</i>
ATR	<i>ATM et RAD3 related</i>
AVM	<i>Autophagic Vacuolar Myopathies</i>
BACE-1	<i>β-site APP-Cleaving Enzyme-1</i>
Bag	<i>Bcl-2-associated Athanogene protein</i>
BARKOR	<i>Beclin1 associated Autophagy Related Key regulator</i>
BARON	<i>Beclin1 Associated RUN domain containing protein</i>
Bcl-2	<i>B-Cell Lymphoma-2</i>
BEACH	<i>Blue Cheese And Chédiak-Higashi</i>

Beclin-1	<i>Bcl2-interacting protein-1</i>
Bif-1	<i>Bax Interacting Factor 1</i>
BLOC-1	<i>Biogenesis of Lysosome-related Organelle Complex 1</i>
BNIP3	<i>Bcl-2 et Adenovirus E1B 19 kDa-Interacting-Protein-3</i>
BRCA-1	<i>Breast Cancer-1</i>
BUZ	<i>Bound to Ubiquitin Zinc</i>
CAM	<i>Cell Adhesion Molecule</i>
CaMKKβ	<i>Calmodulin-dependent Kinase Kinase β</i>
Caspase	<i>Cystein-dependent ASPartate-directed proteASE</i>
CC	<i>coiled-coil</i>
Cdk	<i>Cyclin-Dependent Kinases</i>
Ce	<i>Cænorhabditis elegans</i>
CKI	<i>Caséine Kinase 1</i>
CLIP	<i>Cytoplasmic Linker Protein of 170kDa</i>
CLU	<i>Clusterine</i>
CM	<i>Milieu Conditionné</i>
CMA	<i>Chaperone Mediated Autophagy / CMA</i>
CMH	<i>Complexe Majeur d'Histocompatibilité</i>
CR1	<i>Complement Recepteur 1</i>
CUL3	<i>Cullin3-based</i>
CVT	<i>Cytoplasm to Vacuole Targeting</i>
CYLD	<i>Cylindromatose</i>
DAPI	<i>4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride</i>
DAPk	<i>Death-Associated Protein Kinase</i>
DEPTOR	<i>DEP_domain containing mTOR-interacting protein</i>
DFCP-1	<i>Double FYVE-Containing Protein 1</i>
DISC	<i>Death-Inducing Signalling Complex</i>
DLC1	<i>Dynein Light Chain 1</i>
Dm	<i>Drosophila melanogaster</i>
DNF	<i>Dégénérescence Neurofibrillaire</i>
DR5/DR6	<i>Death Receptor 5/6</i>
DRAM	<i>Damage-Related Autophagy Modumator</i>
DUB	<i>Deubiquitination enzyme</i>
DYRK1A	<i>Dual-specificity tyrosine phosphorylation et Related Kinases 1A</i>
EBSS	<i>Earle's Balanced Salt Solution</i>
ECE	<i>Endothelin-Converting Enzyme</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
EEA1	<i>Early Endosome Antigen 1</i>
EF1α	<i>Elongation Factor 1α</i>
EGF	<i>Epithelial Growth Factor</i>
EGO	<i>Exit from rapamycin-induced Growth Arrest</i>
EGTA	<i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i>
ERAD	<i>Endoplasmic Reticulum Associated Degradation</i>
ERK1/2	<i>Extracellular signal-Regulated protein Kinase</i>
ERO	<i>Espèces Réactives de l'Oxygène</i>

ESCRT	<i>Endosomal Sorting Complex Required for Transport</i>
FADD	<i>Fas Associated protein with death domain</i>
FAT	<i>FRAP, ATM, TTRAP</i>
FATC	<i>FRAP, ATM, TTRAP C-terminal</i>
FIP200	<i>Focal Adhesion Kinase family interacting protein of 200 kDa</i>
FKBP12	<i>FK506-Binding Protein of 12 kDa</i>
FOXO1	<i>Forkhead box class O 1</i>
FRAP	<i>FKBP-Rapamycin Associated Protein</i>
FRB	<i>FPR1-Rapamycin Binding site</i>
FTDP-17	<i>Frontotemporal Dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17</i>
FYCO1	<i>FYVE et Coiled-coil domain containing</i>
FYVE	<i>Fab1, YOTB/ZK632.12, Vac1 et EEAI</i>
GABA	<i>Gamma AminoButyrate type A</i>
GAIP	<i>Gai activating protein</i>
GAP	<i>GTPase Activating Protein</i>
GAPDH	<i>Glycéraldéhyde-3-Phosphate Deshydrogénase</i>
GATE-16	<i>Golgi-Associated ATPase Enhancer of 16 kDa</i>
GEP	<i>Guanine nucleotide Exchange Factor</i>
GFAP	<i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i>
GH	<i>Growth Hormone</i>
GLK	<i>Germinal centre-Like Kinase</i>
GRP78/BiP	<i>Glucose-Related Protein of 78 kDa / heavy-chain Binding Protein</i>
GβL	<i>G-protein β-subunit-Like protein</i>
GSK3β	<i>Glycogen-Synthetase Kinase 3β</i>
H⁺ v-ATPases	<i>Pompes à protons vacuolaires dépendantes de l'ATP</i>
HBSS	<i>Hanks' Balanced Salt Solution</i>
HCMV	<i>Human Cytomegalovirus</i>
HDAC6	<i>Histone Déacétylase 6</i>
HEAT	<i>Huntingtine, facteur d'élongation 3, protéine phosphatase 2A et TOR</i>
HIF1	<i>Hypoxia Inducible Factor1</i>
HOPS	<i>Homotypic fusion et Protein Sorting</i>
HRE	<i>Hypoxia Response Element</i>
Hrs	<i>Hepatocyte-growth factor-Regulated tyrosine kinase Substrate</i>
Hsc	<i>Heat-Shock Cognate</i>
HSF-1	<i>Heat-Shock Factor-1</i>
Hsp	<i>Heat-Shock Protein</i>
HSV-1	<i>Herpes Simplex Virus-1</i>
I1PP2A/PHAP-1	<i>Putative Histocompatibility leukocyte antigen class II-Associated Protein</i>
I2PP2A/TAF-1β	<i>Template Activating Factorβ</i>
IP3	<i>myo-inositol-1,4,5-triphosphate</i>
IP₃R	<i>IP₃ Receptor</i>
IRM	<i>Imagerie par Résonance Magnétique</i>
IRS	<i>Insulin Receptor S...</i>
JNK	<i>c-Jun amino-terminal Kinase</i>

Keap1	<i>Kelch-like ECH-Associated Protein 1</i>
KIF2	<i>member of <u>K</u>inesin super-Family 2</i>
KO	<i>Knock-Out</i>
Kog1	<i>Kontroller of Growth 1</i>
LAMP	<i>Lysosomal-Associated Membrane Protein</i>
LCMT-1	<i>Leucine Carboxylméthyltransférase</i>
LDL	<i>Low-Density Lipoprotein</i>
LIR	<i>LC3-Interacting Region</i>
LKB1	<i>serine/threonine Liver Kinase B1</i>
LRRK2	<i>Leucine-Rich Repeat Kinase 2</i>
LRS	<i>LC3 Recognition Sequence</i>
Lst8	<i>Lethal with SEC thirteen 8</i>
LTP	<i>Long Term Potentiation</i>
M6P	<i>Mannose-6-Phosphate</i>
MAP	<i>Microtubule-Associated Protein</i>
MBD	<i>Microtubule-Binding Domain</i>
MEKK3	<i>MAP/ERK Kinase Kinase 3</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
MLK3	<i>Mixed-Lineage Protein Kinase 3</i>
MPTP	<i>1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine</i>
mSin1	<i><u>m</u>ammalian Stress-activated protein kinase-<u>i</u>nteracting protein 1</i>
MTOC	<i>Microtubule Organising Centre</i>
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
MVB	<i>Multi-vesicular Body</i>
N-BAR	<i>N-terminal amphipathic helix et Bin/Amphiphysin/Rvs</i>
NAF-1	<i>Nutrient-deprivation Autophagy Factor-1</i>
NBR-1	<i>Neighbour of BRCA-1 gene</i>
NDP52	<i>Nuclear Dot Protein of 52 kDa</i>
NEDD8	<i>Neural Precursor cell Expressed, Developmentally Downregulated 8</i>
NF	<i>Neurofilament</i>
NF-κB	<i>Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
NFTs	<i>Neurofibrillary Tangles</i>
NICDS-ADRDA	<i>National Institute of Neurological et Communicative Disorders et Stroke - Alzheimer's disease et Related Disorders Association</i>
NIX/BNIP3L	<i>BNIP3-Like protein X</i>
Nrf2	<i>Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2</i>
NSF	<i>N-ethylmaleimide Sensistive Factor</i>
OKA (OA)	<i>Okadaic acid ; acide okadaïque</i>
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
ORP1L	<i>OSBP (Oxysterol-Binding Protein) Related Protein 1L</i>
OSBP	<i>Oxysterol-Binding Protein</i>
OST	<i>Oligosaccharyl-transférase</i>
p62	<i>protein of 62 kDa</i>
PA700	<i>Proteasome Activator of 700 kDa</i>
PAC	<i>Proteasome Assembly Chaperone</i>

PAQUID	Personnes Agées <i>Quid</i>
PAS	<i>Pre-autophagosomal structure</i>
PDK1	<i>3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase-1</i>
PDPK	<i>Proline-Directed Protein Kinases</i>
PE	Phosphatidyl-Ethanolamine
PEN-2	<i>Presenilin <u>E</u>nhancer-2</i>
pH	potentiel Hydrogène
PH	<i>Pleckstrin Homology</i>
PHAP-1	<i>Putative Histocompatibility antigen class II-Associated Protein</i>
PHF	<i>Paired Helicoidal Filament</i>
PI	<i>PhosphatidylInositol</i>
PI(3)P	<i>PhosphatidylInositol-3-Phosphate</i>
PiB	<i><u>P</u>ittsburg compound-B</i>
PICALM	<i>PhosphatidylInositol-binding Clathrine Assembly Protein</i>
PIK	<i>PhosphatidylInositol protein Kinase</i>
PIKK	<i>PhosphatidylInositol Kinase (PIK)-related protein Kinase</i>
PINK1	<i>PTEN Induced protein Kinase</i>
PIPES	<i>Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)</i>
PKA	<i>cAMP-dependent Protein Kinase A</i>
PKC	Protéine Kinase C
PME-1	<i>Phosphatase <u>M</u>ethylestérase</i>
PMN	<i>Pie<u>c</u>emeal autophagy of the Nucleus</i>
PMSF	<i>Phényl-Méthyl-Sulfoxyde</i>
PND	Pathologie Neurodégénérative
PP2A	Protéine Phosphatase 2A
PPP	<i>PhosphoProtein Phosphatases</i>
PR	Domaine riche en proline (<i>Prolin-rich Region</i>)
PR65	<i>Phosphatase Regulatory subunit of 65 kDa</i>
prApe1	<i>Précurseur de l'<u>A</u>pe1</i>
PRAS40	<i>Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa</i>
PRL	prolactine
PROTOR	<i><u>P</u>rotein Observed with <u>R</u>ictor</i>
PRR5	<i><u>P</u>roline-Rich protein 5</i>
PSEN/PS	Préséniline
PTEN	<i>Phosphatase et <u>T</u>ensine homologue</i>
PX	<i>Phox homology</i>
Rag	<i>Ras-related GTPase</i>
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation End Products</i>
Ragulator	<i>Régulateur des Rags et de mTORC1</i>
RE	Réticulum Endoplasmique
REDD1/2	<i>Regulated in Development et DNA damage 1</i>
Ref(2)P	<i>Refractory to Sigma P (Ref(2)P/CG10360)</i>
RGS	<i>Regulators of G-protein signaling</i>
Rictor	<i>Rapamycin <u>i</u>nsensible <u>c</u>ompanion of m<u>T</u>OR</i>
RILP	<i>Rab-Interacting Lysosomal Protein</i>

RING	<i>Really Interesting New Gene</i>
RIP	<i>Receptor Interacting Protein</i>
RNase A	<i>Ribonucléase A</i>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute medium</i>
Rubicon	<i>RUN domain protein as Beclin-1 Interacting et cystein-rich Containing</i>
SAM	<i>Substrate Adhesion Molecule</i>
SAPK	<i>Stress Activated Protein Kinase</i>
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SEPA-1	<i>Suppressor of Ectopic P granule in Autophagy mutants 1</i>
shRNA	<i>Small Hairpin Ribonucleic Acid</i>
SIRT1	<i>Sirtuine-1</i>
SLA	<i>Sclérose Latérale Amyotrophique</i>
SNAP	<i>Soluble NSF Attachment Protein</i>
SNARE	<i>Soluble N-ethyl-maleimide sensitive factor Attachment protein Receptor</i>
SNC	<i>Système Nerveux Central</i>
SOD	<i>Superoxyde Dismutase</i>
SORL1	<i>Sortiline-1</i>
SPS	<i>Ssy1, Ptr3, et Ssy5</i>
SQSTM1	<i>Sequestosome 1</i>
SRP	<i>Signal-Recognition Particle</i>
SUMO	<i>Small Ubiquitin-related Modifier</i>
SUP	<i>Système Ubiquitine Protéasome</i>
SynGAP	<i>Synaptic GTPase-Activating protein</i>
TA	<i>Température Ambiante</i>
TAF-1β	<i>Template Activating Factor-1β</i>
Tap42	<i>Type 2A phosphatase Associated Protein of 42 kDa</i>
Tau	<i>Tubulin-Associated Unit</i>
Tco89	<i>89 kDa subunit of TOR Complexe One</i>
TDP-43	<i>Transactive Response (TAR) DNA-binding Protein of 43 kDa</i>
TEMED	<i>N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine</i>
TEP	<i>Tomographie à Emission de Positons</i>
Tip41	<i>Tap42-Interacting Protein of 41 kDa</i>
TIPRL	<i>Tor signaling Pathway Regulator-Like</i>
TNF	<i>Tumour Necrosis Factor</i>
TOR	<i>Target Of Rapamycin</i>
TRAF6	<i>TNF Receptor Associated Factor 6</i>
TRRAP	<i>Transformation/transcription domain Associated Protein</i>
TSC1/2	<i>Tuberous Sclerosis Factor 1/2</i>
TSH	<i>Thyroid Stimulating Hormone</i>
UBA	<i>Ubiquitin-Associated domain</i>
UBC	<i>Ubiquitin-Conjugating enzyme ; Ubiquitin Carrier protein</i>
UBD	<i>Ubiquitin-Binding Domain</i>
ULK1/2	<i>Unc51-Like Kinase 1/2</i>
UMP1	<i>Ubiquitin-Mediated Proteolysis 1</i>
UNC51	<i>Uncoordinated 51</i>

UVRAG	<i>UltraViolet Resistance-Associated Gene</i>
VAMP	<i>Vesicle-Associated Membrane Protein</i>
VCP	<i>Valosin-Containing Protein</i>
VIH	<i>Virus de l'Immunodéficience Acquis</i>
WIPI	<i>WD40 repeat containing protein that Interacts with Phosphatidylinoside</i>
XBP-1	<i>X-box Binding Protein</i>
XMEA	<i>X-linked Myopathy with Excess of Autophagy</i>
Zf-UBP	<i>Zinc Finger in Ubiquitin specific Protease</i>
ZIP	<i>Zeta PKC Interacting Protein</i>
α-CTF	<i>α-Carboxy-Terminal Fragment</i>

INDEX DES FIGURES

Figure 1 : Occurences du terme « Autophagy » dans les publications scientifiques depuis 1965.

Source : Pubmed

Figure 2 : Principe de fonctionnement du réseau protéostatique

Figure 3 : Mécanismes d'élimination des protéines anormales et d'agrégation protéique

Figure 4 : Représentation schématique de la conjugaison de l'ubiquitine au niveau d'un résidu lysine d'une protéine substrat.

Figure 5 : Représentation schématique du protéasome 26S

Figure 6 : Représentation schématique du lysosome

Figure 7 : Voies autophagiques/lysosomales

Figure 8 : Mécanisme de la CMA.

Figure 9 : Voie CVT (*S. cerevisiae*) :

Figure 10 : Déroulement de la macroautophagie : principe général

Figure 11 : Représentation schématique de la structure des protéines TOR de la levure et de l'Homme

Figure 12 : Voie TORC1 chez la levure *S. cerevisiae*

Figure 13 : Régulation de la voie mTOR : signaux de transduction et effets :

Figure 14 : Représentation des voies de signalisation impliquant mTOR

Figure 15 : Régulation de ULK1, complexe initiateur de l'autophagie, par mTOR et l'AMPK

Figure 17 : Déroulement de l'autophagie chez la levure *S. cerevisiae* :

Figure 18 : Phosphorylation du PI en PI(3)P

Figure 19 : Formation de l'omégasome

Figure 20 : Formation du complexe Atg12-Atg5~Atg16L.

Figure 21 : Conjugaison de LC3 (Atg8) à la membrane autophagosomale selon un processus de conjugaison de type ubiquitine.

Figure 22 : Expansion du phagophore

Figure 23 : Représentation de la structure de LAMP2 (D'après Eskelinen)

Figure 24 : Représentation schématique de la formation des microtubules

Figure 25 : Structure protéique de p62/SQSTM1

Figure 26 : Schéma du fonctionnement de p62 en tant que récepteur autophagique

Figure 27 : Mécanisme de formation des agrésomes (D'après Knaevelsrud et Simonsen, 2010)

Figure 28 : Agréphagie : séquestration des agrésomes au sein des autophagosomes

Figure 29 : Pathologies humaines associées à des anomalies de l'autophagie.

Figure 30 : Caractéristiques histopathologiques de la maladie d'Alzheimer (d'après Blennow et al., 2006).

Figure 31 : Métabolisme de l'APP

Figure 32 : Hypothèse de la cascade amyloïde

Figure 33 : Epissage alternatif de l'ARNm MAPT et isoformes retrouvées dans le SNC. D'après Buée et al., 2000 et Martin et al., 2011a

Figure 34 : Sites de phosphorylation de la protéine tau. D'après Martin et al., 2011a

Figure 35 : Pathologie de tau au cours de la maladie d'Alzheimer.

Figure 36 : Modèle hypothétique de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer basé sur une perturbation primaire de la voie autophagique/lysosomale.

Figure 37 : Caractérisation des cultures primaires corticales enrichies en neurones par immunofluorescence

Figure 38 : Caractérisation de la composition des cultures primaires corticales enrichies en astrocytes.

Figure 39 : Détection *in situ* des vésicules autophagiques dans les cultures primaires neuronales dans les neurones (panel de gauche) et dans les astrocytes (panel de droite)

Figure 40 : Détection *in situ* de Beclin-1 dans les neurones et les astrocytes issus de cultures primaires corticales enrichies en neurones.

Figure 41 : Détection *in situ* des vésicules autophagiques (panel de gauche) et de Beclin-1 (panel de droite) dans les cultures primaires enrichies en astrocytes

Figure 42 : Analyse des marqueurs autophagiques (LC3 et Beclin-1) en western blot

Figure 43 : Analyse en western-blot du flux autophagique dans les cultures primaires corticales enrichies en astrocytes

Figure 44 : Analyse semi-quantitative du rapport LC3-II/LC3-I .

Figure 45: Détection *in situ* des vésicules autophagiques dans des cultures primaires corticales mixtes en microscopie confocale en conditions basales et d'induction de l'autophagie (rapamycine 500 nM) en présence ou non d'inhibiteurs du flux autophagique (bafilomycine à 100 nM ou leupeptine et pepstatine, toutes deux à 20 µM)

Figure 46 : Détection *in situ* des vésicules autophagiques dans les cultures primaires corticales mixtes en conditions de blocage du flux autophagique, en présence ou non de rapamycine à 500 nM

Figure 47: Détails de la condition contrôle : en haut à droite par « extraction » des neurones (entourés en jaune), en bas détail de la zone encadrée en rose

Figure 48 : Détail (en bas) du marquage des vésicules autophagiques dans des astrocytes (en haut, entourés en bleu) en conditions basales.

Figure 49 : Quantification du nombre d'autophagosomes par cellule en fonction de leur type (neurones, cellules non-neuronales)

Figure 50 : Comparaison des structures chimiques de la nystatine (A) et de l'amphotéricine B (B).

Figure 51 : Effet de l'AmB sur la viabilité cellulaire (test MTT) dans la lignée cellulaire COS-7.

Figure 52 : Etude de l'effet de doses croissantes d'AmB sur le clivage de la caspase-3 en western-blot

Figure 53 : Effets de l'AmB sur les autophagosomes dans les cellules de la lignée cellulaire COS-7 en immunofluorescence

Figure 54 : Influence de l'exposition des COS-7 à l'AmB sur le nombre cellulaire moyen de vésicules autophagiques

Figure 55 : Cellules COS-7 exprimant eGFP-LC3 après 12 heures d'exposition à 0,75 µg/mL d'AmB observées en microscopie confocale

Figure 56 : Aspect des cellules exposées à l'AmB en microscopie électronique à transmission.

Figure 57 : Photographies des cellules COS-7 exposées à 0,75 µg/mL d'AmB prises au microscope à contraste de phase

Figure 58 : Expression de Beclin-1 dans les COS-7 suite à leur exposition à l'AmB à 0,5 ou 0,75 µg/mL en immunofluorescence

Figure 59 : Analyse de l'effet de l'AmB à 0,5 ou 0,75 µg/mL sur les marqueurs autophagiques en western-blot.

Figure 60 : Effets de concentrations croissantes d'AmB (de 0,5 à 10 µg/mL) sur les marqueurs autophagiques dans des cultures primaires corticales mixtes

Figure 61 : Analyse semi-quantitative du signal correspondant à p62 (à droite, en vert) et établissement du rapport de LC3-II/LC3-I (à gauche, en bleu) suite à l'exposition des cellules à une gamme de doses croissantes d'AmB (de 0,5 à 10 µg/mL)

Figure 62 : Effets de l'exposition des cellules à 1 µg/mL d'AmB sur les marqueurs autophagiques dans les cultures primaires corticales mixtes en condition de privation nutritionnelle et/ou d'inhibition de l'acidification des lysosomes (bafilomycine)

Figure 63 : Variations du rapport LC3-II/LC3-I dans les cultures primaires en fonction de leur exposition ou non à l'AmB et/ou en conditions de privation nutritionnelle et de Bafilomycine A à 50 nM

Figure 64 : Détection des vésicules positives pour LC3 dans les cultures corticales primaires en présence ou non d'AMB et/ou de bafilomycine à 50 nM.

Figure 65 : Détection des vésicules positives pour LC3 dans les cultures corticales primaires en présence ou non d'AmB et/ou de bafilomycine à 50 nM en conditions de privation nutritionnelle (MEM)

Figure 66 : Détection des vésicules positives pour LC3 dans les cellules de la lignée SH-SY5Y en présence ou non d'AmB et/ou de bafilomycine à 50 nM

Figure 67 : Analyse en western-blot des effets de l'AmB sur les voies AMPK et mTOR

Figure 68 : Analyse en western-blot de l'expression des protéines impliquées dans la CMA

Figure 69 : Effets de l'AmB à 1 µg/mL sur la CMA dans les cellules de la lignée SH-SY5Y, en immunofluorescence.

Figure 70 : Effet de l'OKA sur les marqueurs de l'activité autophagiques LC3 et Beclin-1 au cours du temps .

Figure 71 : Analyse semi-quantitative de la conversion de LC3-II en LC3-I suite à l'exposition des cultures primaires corticales à deux doses d'OKA (12,5 et 25 nM) en fonction du temps

Figure 72 : Effet de l'OKA sur les molécules clé des voies de régulations autophagiques mTOR et AMPK et sur leurs substrats respectifs, P70S6K et ACC.

Figure 73 : Effets de 12,5 et 25 nM d'OKA pendant 6 heures sur les marqueurs autophagiques LC3 et p62 détectés en western-blot

Figure 74 : Analyse semi-quantitative de la conversion de LC3-II en LC3-I suite à l'exposition des cultures primaires corticales à deux doses d'OKA (12,5 et 25 nM) en conditions basales et de privation nutritionnelle (MEM)

Figure 75 : Effets de 25 nM d'OKA sur LC3 et p62 en conditions basales (CM) et en conditions de privation nutritionnelle (MEM) en présence ou non d'inhibiteurs du flux (leupeptine et pepstatine à 20 µM)

Figure 76 : Analyse semi-quantitative de la conversion de LC3-II en LC3-I suite à l'exposition des cultures primaires corticales à deux doses d'OKA (12,5 et 25 nM) en conditions basales et de privation nutritionnelle (MEM) en présence ou non d'inhibiteurs de la dégradation lysosomale (LP)

Figure 77 : Détection in situ des vésicules positives pour LC3 dans les cultures primaires corticales exposées à 25 nM d'OKA en présence ou non de 20 µM de leupeptine et de pepstatine (LP).

Figure 78 : Effet de 25 nM d'OKA sur le pourcentage de cellules autophagiques en présence ou non de 20 µM de leupeptine et de pepstatine (LP)

Figure 79 : Effets de la suppression de l'activité de la PP2A par extinction de l'expression de sa sous-unité catalytique PP2AC dans les cultures corticales primaires

Figure 80 : Analyse semi-quantitative de la conversion de LC3-II en LC3-I suite à la transfection lentivirale d'un shRNA dirigé contre PP2AC dans des cultures primaires corticales

Figure 81 : Détection in situ des vésicules positives pour LC3 suite à la transfection lentivirale d'un shRNA dirigé contre PP2AC dans des cultures primaires corticales

Figure 82 : Effet de la transfection lentivirale d'un shRNA dirigé contre PP2AC dans des cultures primaires corticales sur le pourcentage de cellules autophagiques

Figure 83 : Effet de l'OKA sur la conversion de LC3-II en LC3-I induite par 250 nM de rapamycine

Figure 84 : Effet de l'OKA sur la conversion de LC3-II en LC3-I induite par un stress du RE causé par 250 nM de tunicamycine (Tunic.).

Figure 85 : Effet de l'OKA sur la conversion de LC3-II en LC3-I induite par l'inhibition du protéasome par 5 ou 10 µM de MG132.

Figure 86 : Effet de l'inhibition de la PP2A par transfection lentivirale d'un shRNA dirigé contre PP2AC dans des cultures primaires corticales sur l'état de phosphorylation de mTOR et de l'AMPK et de leurs substrats respectifs P70S6K et ACC.

Figure 87 : Effets de l'inhibition de la PP2A sur les taux de phosphorylation de P70S6K et de l'ACC

Figure 88 : Effet de l'inhibition de la PP2A sur p62 (en rouge) en immunofluorescence.

Figure 89 : Formation de corps d'inclusions positifs (flèches) pour p62 (en rouge) et l'ubiquitine (en vert) suite à l'inhibition de la PP2A

Figure 90 : Détection des protéines ubiquitinyllées en western-blot suite à l'inhibition de la PP2A dans les cultures primaires corticales.

Figure 91 : Détection de p62 et de Tau dans des extraits protéiques résultant du fractionnement des extraits protéiques en une fraction soluble (S) et une fraction insoluble (I) dans le Triton-X-100.

Figure 92 : Détection de LC3, p62 et tau dans les extraits protéiques issues de cellules exposées ou non à 25 nM d'OKA et séparés en une fraction soluble (S) et une fraction insoluble (I).

Figure 93 : Effet de 25 nM d'OKA sur la répartition de LC3-I entre fractions soluble (S) et insoluble (I) dans le Triton-X-100.

Figure 94 : Effet de la rapamycine sur la répartition de LC3-I entre les fractions soluble et insoluble au Triton X-100 en présence ou non de 25 nM d'OKA.

Figure 95 : Influence de 250 nM de rapamycine sur la distribution de LC3-I entre les fractions soluble (S) et insoluble (I) dans le Triton X-100 (valeur normalisée par rapport au contrôle)

Figure 96 : Analyse de la phosphorylation de tau en présence de LiCl ou de rapamycine associées ou non à 25 nM d'OKA

Figure 97 : Analyse semi-quantitative de la conversion de LC3-II en LC3-I suite à l'exposition de cultures primaires corticales à 25 nM d'OKA associés ou non à 10 mM de LiCl ou 250 nM de rapamycine

Figure 98 : Analyse en western-blot de l'effet du LiCl sur l'autophagie en présence d'inhibiteurs du flux (leupeptine et pepstatine à 20 μ M ; LP)

Figure 99 : Modulation des niveaux totaux de tau suite à l'exposition de cultures primaires corticales à 25 nM d'OKA associés ou non à 10 mM de LiCl ou 250 nM de rapamycine.

Figure 100 : Déphosphorylation de tau (rapport tau-1/ T46) suite à l'exposition de cultures primaires corticales à 25 nM d'OKA associés ou non à 10 mM de LiCl ou 250 nM de rapamycine

Figure 101 : Effet de l'exposition de cultures primaires corticales à 25 nM d'OKA associés ou non à 10 mM de LiCl ou 250 nM de rapamycine sur la détection du signal lié à AT8 (AT8/T46)

Figure 102 : Analyse par western-blot des effets du lithium et de la rapamycine sur les niveaux de phosphorylation de GSK3 β et de mTOR en présence ou non de 25 nM d'OKA

Figure 103 : Interconnexions entre les voies mTOR, GSK3 β , PP2A. Implications pour la phosphorylation de la protéine tau

Figure 104 : Régulation de l'autophagie par PP2A et effets de l'OKA: hypothèses

Figure 105 : Effet de l'inducteur de l'AMPK, AICAR, à 1 et 3 mM sur les marqueurs de l'autophagie dans des cultures primaires neuronales enrichies en neurones

INDEX DES TABLEAUX

Tableau 1 : Sous-unités constitutives de la PP2A

Tableau 2 : Phénotypes liés à la suppression de l'autophagie dans différents tissus chez la souris

Tableau 3 : Composition des gels d'acrylamide

Tableau 4 : Anticorps utilisés en western-blot (WB) et en immunofluorescence (IF) et spécificités d'utilisation

Tableau 5 : Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence (IF) et en western-blotting (WB)

CODES ET UNITÉS INTERNATIONALES

Acide aminé	Code à trois lettres	Code à une lettre
<i>Alanine</i>	Ala	A
<i>Cystéine</i>	Cys	C
<i>Acide aspartique</i>	Asp	D
<i>Acide glutamique</i>	Glu	E
<i>Phénylalanine</i>	Phe	F
<i>Glycine</i>	Gly	G
<i>Histidine</i>	His	H
<i>Isoleucine</i>	Ile	I
<i>Lysine</i>	Lys	K
<i>Leucine</i>	Leu	L
<i>Méthionine</i>	Met	M
<i>Asparagine</i>	Asn	N
<i>Proline</i>	Pro	P
<i>Glutamine</i>	Gln	Q
<i>Arginine</i>	Arg	R
<i>Sérine</i>	Ser	S
<i>Thréonine</i>	Thr	T
<i>Valine</i>	Val	V
<i>Tryptophane</i>	Trp	W
<i>Tyrosine</i>	Tyr	Y

Constante

g gravité

Unités		Préfixes		
Nom	Symbole	Nom	Symbole	Valeur
Dalton	Da	femto-	f	10^{-15}
Litre	L	pico-	p	10^{-12}
Mole	M ou mol	nano-	n	10^{-9}
Gramme	g	micro-	μ	10^{-6}
Degré Celsius	°C	milli-	m	10^{-3}
Seconde	s	centi-	c	10^{-2}
Minute	min	déci-	d	10^{-1}
Heures	h	-	-	
Hertz	Hz	déca-	da	10^{+1}
Ampère	A	hecto-	h	10^{+2}
Volt	V	kilo-	k	10^{+3}
Mètre	m	méga-	M	10^{+6}

Mole par litre	M, mol/L ; mol.L-1		giga-	G	10 ⁺⁹
Gramme par litre	g/L ; g.L-1		téra-	T	10 ⁺¹²
Ångström ¹	Å				

¹ 1 Å = 1.10⁻¹⁰ m

PRÉAMBULE

L'équilibre entre anabolisme et catabolisme constitue la base même du principe de maintien de l'homéostasie cellulaire. L'activité catabolique des cellules eucaryotes a tendance à décroître avec l'âge, principal facteur de risque de survenue de pathologies neurodégénératives (PND). Dans le cas des cellules post-mitotiques telles que les neurones, ce dernier point est particulièrement crucial. Ces cellules ne subissent pas l'effet de « dilution » inhérent à la division cellulaire, ce qui les rend plus vulnérables à l'accumulation et à l'agrégation de protéines anormales et à la persistance d'organites altérés comme les mitochondries. Celles-ci peuvent alors devenir une source importante d'espèces réactives de l'oxygène (ERO). Par ailleurs, un des points communs entre la plupart des PND est la présence d'agrégats de protéines anormales intra- ou extra-cellulaires, caractéristique neuropathologique commune à la grande majorité des PND (d'où l'utilisation des termes d'agrégopathies, de protéinopathies ou encore de foldopathies (de l'anglais *to fold* : replier).

Par conséquent, la compréhension des processus de dégradation cellulaire, de leurs mécanismes de régulation et des éléments pouvant compromettre leur fonctionnement peut permettre d'apporter des explications concernant les phénomènes anormaux qui se produisent lors de la survenue de pathologies ainsi que d'œuvrer à la mise en place de stratégies thérapeutiques.

Parmi les différentes voies cataboliques existantes dans les cellules eucaryotes et plus particulièrement dans les cellules de mammifères, deux processus sont prédominants : le système ubiquitine-protéasome (SUP) et la voie de dégradation autophagique/lysosomale.

L'autophagie correspond à des mécanismes de dégradation de composants intracellulaires de différentes natures dans les lysosomes. Le terme « autophagie » regroupe plusieurs mécanismes qui diffèrent par le mode d'acheminement des substrats aux lysosomes, lieu de leur dégradation finale. Les trois voies autophagiques principales sont la macroautophagie (appelée autophagie par la suite), autophagie dépendante de chaperons protéiques (CMA : *Chaperone Mediated Autophagy*) et la microautophagie. Dans ce travail, nous nous sommes intéressés plus particulièrement à la voie majoritaire, la macroautophagie (30% de la dégradation autophagique/lysosomale) et à ses anomalies dans le cadre du Système Nerveux Central (SNC).

Dans un premier temps, seront développées les principales caractéristiques des différents processus cataboliques de la cellule eucaryote, ensuite seront détaillés les différents aspects de l'autophagie puis nous situerons ce processus dans le contexte du système nerveux central. Nous nous intéresserons enfin au fonctionnement de l'autophagie au cours de la maladie d'Alzheimer qui sera la pathologie de référence de cette étude.

Les travaux réalisés au cours de cette thèse seront divisés en trois ensembles. Le premier ensemble correspond à une étude comparative de l'autophagie entre différents types cellulaires du SNC dans un modèle de cultures primaires corticales préparées à partir de cerveaux d'embryons de rat. L'autophagie étant considérée comme un mécanisme neuroprotecteur, la seconde partie porte sur la caractérisation des propriétés pro-autophagiques de l'Amphotéricine B (AmB) dans les lignées cellulaires COS-7 et SH-SY5Y ainsi que dans des cultures corticales primaires enrichies en neurones. Plusieurs hypothèses concernant le mode d'action de cette molécule antifongique appartenant à la famille des polyènes macrolides ont été alors testées. Enfin, dans une dernière partie, nous avons mis en évidence le rôle de la Protéine Phosphatase 2A (PP2A) dans la régulation de l'autophagie neuronale. Cette étude permet d'établir un lien entre la baisse de l'activité de la PP2A observée dans les cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer et deux autres caractéristiques retrouvées au cours de cette pathologie : des anomalies de l'autophagie et la formation d'inclusions intra-neurales.

L'autophagie a été initialement découverte dans la deuxième moitié des années soixante, faisant suite à la découverte des lysosomes en 1955 (de Duve et al., 1955). Après avoir stagné pendant une quarantaine d'années, l'intérêt pour cette voie de dégradation a crû de façon exponentielle au fur et à mesure de l'avancée des connaissances des mécanismes moléculaires, de la mise en lumière de

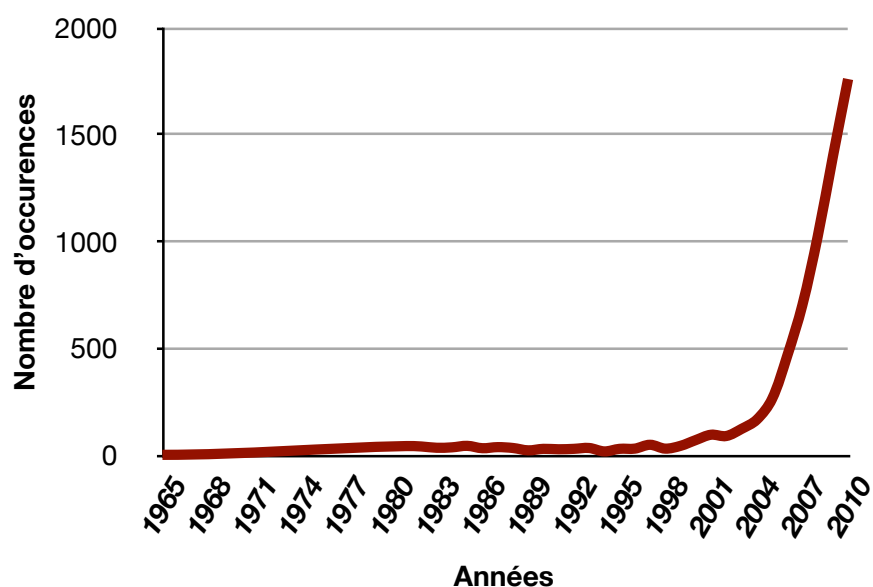


Figure 1 : Occurrences du terme « Autophagy » dans les publications scientifiques depuis 1965. Source : Pubmed

l'implication de l'autophagie dans différents aspects de la physiologie de la cellule et de ses dysfonctionnements dans un certain nombre de situations pathologiques (figure 1). Ainsi entre le début de cette thèse et son aboutissement, la compréhension de cette voie catabolique s'est considérablement améliorée et en particulier en ce qui concerne la spécificité de ce mécanisme.

Effectivement, il y a très peu de temps, la macroautophagie était systématiquement définie comme un mécanisme de dégradation « en bloc », aléatoire, de portions cytoplasmiques pouvant indifféremment contenir des constituants de différentes natures (protéines, organites, membranes, gouttelettes lipidiques...) et de ce point de vue elle était opposée à la CMA (voir plus loin), qui de par son mode de fonctionnement incarne la spécificité même.

Aujourd'hui, et depuis peu, la macroautophagie est divisée en deux composantes (Komatsu et al., 2007a) : ainsi, on distingue l'autophagie constitutive de l'autophagie induite par un stress. Dans le cas de l'autophagie constitutive, les preuves en faveur d'une spécificité de substrat s'accumulent et on a vu apparaître une nouvelle famille de protéines : les protéines adaptatrices de l'autophagie (ou « récepteurs » autophagiques) (Johansen et Lamark 2011). Concernant l'autophagie induite suite à un stress, il demeurerait un certain nombre de points restant en suspens quant à sa spécificité.

Etude bibliographique

PARTIE 1 : VOIES CATABOLIQUES DE LA CELLULE

EUCARYOTE

I. HISTORIQUE

L'autophagie a été l'une des premières voies cataboliques mise en évidence suite à la description des lysosomes en 1955 par Christian de Duve et ses collaborateurs (Appelmans et al., 1955a, 1955b, de Duve et al., 1955, de Duve et Wattiaux, 1966) (ce terme, dérivé du grec *autos* : soi-même et *phagein* : manger ; donc « se manger soi-même » a été utilisé pour la première fois en 1963 par de Duve, (de Duve et Wattiaux, 1966, Klionsky 2008)). La composition de ces organites, riches en hydrolases acides capables de dégrader, à un pH proche de cinq, un bon nombre de constituants cellulaires, a permis de les définir comme une sorte d'appareil digestif cellulaire doué d'activités lytiques, d'où le nom de lysosome (du grec *luisis* : dissoudre et *sôma* : corps). Ce terme a été également choisi comme base à une nouvelle nomenclature permettant de qualifier toutes les autres vésicules apparentées à ces organites de dégradation (de Duve et al., 1955, de Duve et Wattiaux, 1966). Christian de Duve, Albert Claude et George Emil Palade ont reçu en 1974 le prix Nobel de médecine pour leurs découvertes concernant l'organisation structurale et fonctionnelle de la cellule.

C'est à la même époque (entre 1935 et 1941) que le concept d'état dynamique des constituants cellulaires a commencé à émerger (Guggenheim, 1991, Wolf, 2004, Ciechanover, 2005), néanmoins cette théorie est restée controversée jusqu'au milieu des années 1950. Auparavant, ces constituants et en particulier les protéines, étaient considérés comme une sorte de masse statique subissant uniquement un phénomène d'usure naturelle. La découverte du lysosome a permis pour la première fois d'envisager l'existence d'un mécanisme pouvant potentiellement conduire à la protéolyse cellulaire, les protéines devenaient alors des éléments se trouvant dans un état dynamique constant de synthèse et de dégradation, cette dernière ayant lieu au sein du lysosome. Cependant, il était toujours difficile d'envisager que les protéines puissent être dégradées de manière sélective et en particulier lorsque l'on considérait la nature du mécanisme autophagique de séquestration « en bloc » de portions cytoplasmiques. L'étude de la dégradation d'enzymes impliquées dans le

métabolisme glucidique (Ashford et Porter, 1962, Deter et de Duve, 1967) a permis d'établir l'existence de différences dans la conduite des processus de dégradation en fonction de l'état métabolique cellulaire et donc d'établir la notion de contrôle de la protéolyse, elle-même impliquée dans la régulation d'un grand nombre de processus cellulaires. Au cours des années 1970, les travaux de Beaulaton et Lockshin, en 1977 montrent l'existence d'une dégradation spécifique des mitochondries au cours de la métamorphose chez les insectes (Beaulaton et Lockshin, 1977, Yang et Klionsky, 2010). Par ailleurs, la découverte plutôt paradoxale de la nécessité d'utiliser de l'énergie métabolique (ATP ; Adénosine Tri-Phosphate) afin de mener à bien la dégradation protéique dont les résidus peuvent être recyclés dans le but de produire de l'énergie, est à l'origine de l'identification des premiers constituants du SUP (Hershko et al., 1979, 1980, Ciechanover et al., 1980) dont un des acteurs clé : l'APF-1 (*ATP-dependent proteolysis factor-1*), mieux connue sous le nom d'ubiquitine (Wilkinson et al., 1980), fut le point de départ de la description de la voie protéasomique (Ciechanover, 2009).

Mais, la relation entre ces deux découvertes ne fut pas directe. Il fallut cheminer pendant encore quelques années au gré des découvertes, attribuant des fonctionnalités hypothétiques aux lysosomes telles que la capacité de choisir entre les protéines à demi-vie courte qu'ils dégradent et les protéines à demi-vie longue, rejetées dans le cytoplasme. La consommation d'énergie métabolique était alors attribuée aux processus annexes à la dégradation lysosomale telles que la liaison du substrat à la membrane lysosomale et son transport au travers de celle-ci (Ciechanover, 2005). Pour la découverte de la dégradation protéique dépendante de l'ubiquitine, Aaron Ciechanover, Avram Hershko et Irwin Rose ont reçu le prix Nobel de Chimie en 2004.

Les années 1980 sont également marquées par la découverte, dans des fibroblastes humains, de la CMA, décrite au départ en tant que mécanisme protéolytique spécifique déclenché par la privation nutritionnelle au niveau des lysosomes (Neff et al., 1981, Backer et al., 1983). Le premier substrat identifié fut la Ribonucléase A (RNase A) (Backer et al., 1983). Le caractère spécifique de cette voie fut déterminé grâce à la découverte du motif pentapeptidique KFERQ exhibé par environ 30% des protéines cytosoliques (Dice et al., 1986, Wing et al., 1991, Chiang et al., 1991, Majesky et al., 2004).

La fin des années 1990 et les années 2000 voient le retour en grâce de la macroautophagie, délaissée du fait de sa non-spécificité, avec la description de ses mécanismes moléculaires. C'est le début de « l'ère moléculaire » (Yang et Klionsky, 2010). En effet, les études moléculaires conduites

chez la levure ont permis des avancées importantes dans ce domaine (Takeshige et al., 1992, Baba et al., 1994, Thumm et al., 1994) avec la description d'Atg1 et d'Atg13 par l'équipe de Y. Ohsumi (Matsuura et al., 1997, Funakoshi et al., 1997). Dans ce sens, l'harmonisation de la nomenclature des gènes impliqués dans l'autophagie (désormais les gènes Atg pour *AuTophagy Related Gene* ou AuTophagie) par Klionsky *et al.*, en 2003 a permis une meilleure compréhension des différentes voies impliquées. Chez la levure, plus de vingt-cinq gènes Atg différents ont été décrits (Klionsky et al., 2003, Yorimitsu et Klionsky, 2005b), aujourd'hui on en dénombre trente-cinq pour cet organisme (Nazarko et al., 2011). Pour la plupart d'entre eux, des homologues ont été décrits chez les mammifères (Codogno, 2004) dont les protéines Atg5, Atg12 (Mizushima et al., 1998) et MAP-LC3 (*Microtubule-Associated Protein-Light Chain 3* ; LC3) (Kabeya et al., 2000) (cf tableau 2 en annexes). La nomenclature est moins bien respectée pour les mammifères du fait que ces gènes aient divergé et/ou qu'ils aient été identifiés avant que leur parenté avec un gène *ATG* d'origine fongique ait été établie. L'implication de la macroautophagie dans un certain nombre de pathologies d'origines diverses est désormais reconnue (Levine et Kroemer, 2008).

Parallèlement à cela, le concept d'homéostasie protéique émerge et permet l'intégration des différentes voies cataboliques en un réseau de processus physiologiques cellulaires interagissant les uns avec les autres dans le but de maintenir le protéome dans un état fonctionnel, le tout étant strictement régulé (Balch et Morimoto, 2008). Ce concept de réseau protéostatique permet d'expliquer un certain nombre d'événements survenant au cours du vieillissement physiologique et pathologique et l'apparition de maladies dont l'âge constitue le principal facteur de risque (Douglas et Dillin, 2010). Un certain nombre de découvertes dans ce domaine ont permis d'entrevoir des stratégies nouvelles concernant le traitement et/ou la prévention de désordres liées à l'accumulation de protéines anormales (Kirstein-Miles et Morimoto, 2010), caractéristique commune à un bon nombre de pathologies neurodégénératives (Ross et Poirier, 2004) et d'améliorer la compréhension du phénomène de vieillissement (Demontis et Perrimon, 2010, Haigis et Yankner, 2010).

La macroautophagie, longtemps considérée comme un mécanisme largement aspécifique a été scindée en deux versants. Ainsi, Komatsu, en 2007, a opposé l'autophagie basale, constitutive, dédiée au maintien de l'homéostasie cellulaire présentant alors une certaine sélectivité pour son substrat et une autophagie induite, en réponse à divers stress (Komatsu et al., 2007a) dont le rôle est de fournir de l'énergie à la cellule.

Le rôle de chaperons protéiques impliqués dans la prise en charge spécifique de substrats protéiques en vue de leur dégradation par l'une ou l'autre des grandes composantes protéolytiques cellulaires (c'est-à-dire par le système autophagique-lysosomal ou par le SUP) a été mis en exergue. En effet, au moins deux voies cataboliques utilisant de telles protéines fonctionnant sur ce principe ont été décrites : la dégradation protéasomale assistée par des protéines chaperonnes (ou CAP : *Chaperone-Assisted Proteasomal degradation*), la CMA .

Aujourd'hui, des progrès conséquents ont été réalisés au sujet de la spécificité de la macroautophagie conduisant à la description d'une nouvelle famille de protéines : les adaptateurs (récepteurs) autophagiques (Johansen et Lamark, 2011) dont le principal représentant est p62/SQSTM1 (protéine de 62 kDa / *Sequestosome 1*). Elles présentent un domaine de liaison à LC3 (*Light-Chain 3*), découvert simultanément et indépendamment par deux équipes conduisant à l'existence de deux dénominations pour ce domaine LIR (*LC3-Interacting Region*) ou LRS (*LC3-Recognition Sequence*) (Bjørkøy et al., 2005, Pankiv et al., 2007, Noda et al., 2008a). Ces protéines adaptatrices constituent alors le lien entre le substrat et les autophagosomes en formation qui le prennent en charge, à l'instar de Nix (qui reconnaît des protéines de la membrane mitochondriale) ou encore de p62 et de NBR-1 (*Neighbour of BRCA-1 gene*) qui, par l'intermédiaire de leur domaine de liaison à l'ubiquitine (domaine UBA ; *Ubiquitin-Associated*), permettent la dégradation spécifique de protéines ubiquitinylées par autophagie. Ce dernier point apporte également un nouvel éclairage sur la signification de l'ubiquitylation en tant que signal de dégradation protéique.

La sortie d'un numéro thématique du journal *Autophagy* au début de l'année 2011 (vol 7 : 3, 2011) (Deretic, 2011a) démontre de l'importance de ces protéines dans le processus autophagique et de la sélectivité de cette voie catabolique.

II. LE CONCEPT D'HOMÉOSTASIE PROTÉIQUE

A. Protéostasie : principe de fonctionnement

La plupart des notions ayant trait à la physiologie sont basées sur la notion d'homéostasie, du grec *homoios* : égal, semblable à ; et de *stasis* : état. En 1865, Claude Bernard élabore le concept de « maintien des conditions de vie dans le milieu intérieur », ce milieu intérieur (milieu qui baigne les cellules) est caractérisé par des grandeurs physiologiques qui doivent rester constantes afin

d'assurer la survie de l'organisme. Ces travaux précèdent ceux publiés en 1929 par Walter Cannon (Cooper, 2008, Smith, 2008) qui utilise pour la première fois le terme « homéostasie » et le définit en comparant les êtres vivants à « un système ouvert présentant de nombreuses relations avec l'environnement. Les modifications de l'environnement déclenchent des réactions dans le système ou l'affectent directement, aboutissant à des perturbations internes du système (...) » (*in* Encyclopædia Universalis).

L'homéostasie protéique cellulaire, également retrouvée sous le terme de « protéostasie » (Balch et Morimoto, 2008) correspond au maintien de l'intégrité du protéome, (ensemble des protéines cellulaires), compartiment extrêmement dynamique. Le maintien de l'homéostasie protéique est sous la dépendance d'un réseau complexe et intégré de mécanismes qui gèrent les protéines tout au long de leur existence dans la cellule, depuis leur synthèse jusqu'à leur dégradation (Douglas et Dillin, 2010) (figure 2). L'ensemble des mécanismes impliqués dans le maintien de la protéostasie correspond au réseau protéostatique (Balch et Morimoto, 2008) dont le fonctionnement est intimement lié aux voies impliquées dans la détection de stress susceptibles d'endommager le protéome (détection des cassures de l'ADN, du stress oxydatif...).

En effet, *in vitro*, une protéine recombinante purifiée avec une séquence d'acides aminés (aa) donnée et une thermodynamique définie, acquiert plus aisément une structure tertiaire stable de moindre énergie par rapport à la même protéine, synthétisée dans la cellule, dans un micro-environnement physico-chimique donné qui influence ce processus de repliement. Ainsi la protéine n'acquerra pas d'elle-même la structure tertiaire optimale et nécessite l'intervention de facteurs facilitants comme les chaperons moléculaires (Hutt et al., 2009).

D'autre part, il est primordial pour la cellule de pouvoir analyser la composition de l'environnement entourant les protéines et de faire la différence entre des valeurs physiologiques (valeurs de consigne) et des valeurs délétères pour la cellule. Par exemple, les ERO, à un niveau modéré, font partie intégrante de voies de signalisation en modulant l'activité de certaines protéines *via* des modifications post-traductionnelles de type rédox (oxydation/réduction de groupements thiols de résidus cystéine), néanmoins, un niveau élevé de ces molécules hautement réactives peut endommager les protéines mais aussi les lipides et les acides nucléiques causant un stress de type oxydatif (Scherz-Shouval et al., 2007b, Scherz-Shouval et Elazar, 2011).

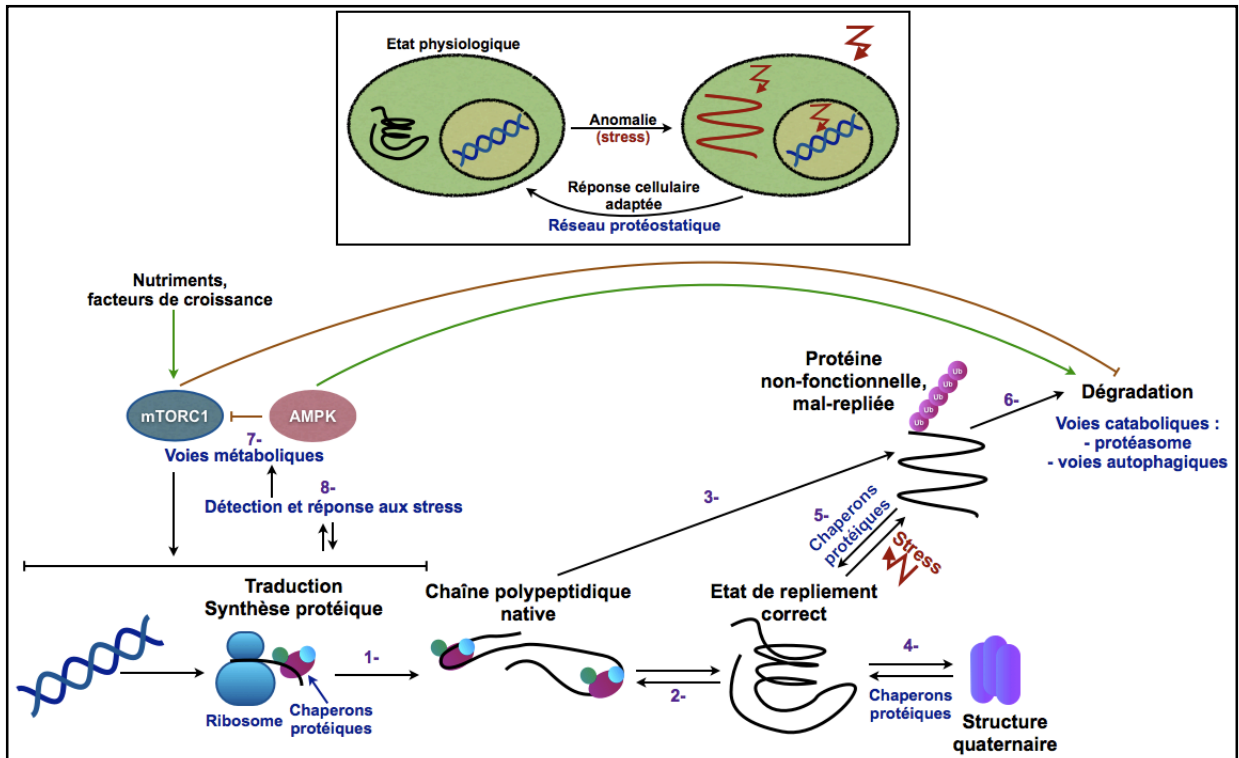


Figure 2 : Principe de fonctionnement du réseau protéostatique

Cadre : Des stress de différentes nature peuvent affecter les composants cellulaires (ADN, protéines) et compromettre l'intégrité de la cellule. Les éléments du réseau protéostatique permettent le contrôle de la qualité des protéines, la détection des stress et la mise en place de réponses cellulaires adaptées permettant un retour à un état physiologique. Les éléments du réseau protéostatique interviennent à toutes les étapes de l'existence d'une protéine depuis sa synthèse (1-), puis l'acquisition de sa structure tri-dimensionnelle où interviennent les acteurs du contrôle qualité protéique au sein du cytosol et du RE (2- et 3-). En cas de repliement incorrect (3-), l'intervention de chaperons et d'enzymes de repliement permettent de revenir à un état de repliement correct. La protéine subit en permanence des changements extensifs dans sa structure (modifications post-traductionnelles, interactions protéiques ; 4-) qui affectent leur biologie en mettant en jeu dans des mécanismes d'activation/désactivation (Powers et al., 2009). Des stress protéotoxiques peuvent altérer les protéines (5-) et les rendre anormales. Si un retour à une conformation correcte n'est pas possible alors la protéine sera éliminée par les voies cataboliques (6-). Interviennent dans le réseau protéostatique les voies métaboliques (mTORC1 et AMPK) (7-) responsables du « choix » entre synthèse et dégradation protéique ainsi que les voies permettant de mettre en place une réponse adaptative aux stress (8-).

Le réseau protéostatique comprend tous les processus de transcription et de traduction (et les acteurs de leur régulation) dont le métabolisme des ARN, les processus d'acquisition de la structure protéique tertiaire, de modifications post-traductionnelles, les molécules intervenant dans la régulation des interactions protéiques (acquisition de la structure quaternaire), les mécanismes associés au transport et à la localisation des protéines dans un domaine sub-cellulaire donné et enfin toutes les voies impliquées dans le catabolisme protéique (Balch et Morimoto, 2008, Morimoto, 2008, Tyedmers et al., 2010).

Le maintien de la protéostasie dépend largement des voies de détection de l'état nutritionnel de la cellule (voies métaboliques) et donc majoritairement des voies insuline/facteurs de croissance - mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) et de l'AMPK (5'-AMP (*Adenosine MonoPhosphate*) Kinase), qui contrôlent l'état énergétique de la cellule, (Haigis et Yankner, 2010), l'orientent vers la

synthèse protéique ou l'activation des voies cataboliques et peuvent déterminer le destin cellulaire. Ces voies permettent la mise en place de réponses adaptées. Si la disponibilité énergétique est insuffisante, la cellule est engagée dans une voie de mort.

Il résulte de ces données que le réseau protéostatique ne correspond pas à un schéma de régulation linéaire intervenant de façon chronologique. Il s'agit en réalité d'un ensemble de sous-réseaux avec des rôles différents dans la physiologie cellulaire reliés entre eux par des facteurs protéiques centraux dont la fonction interfère sur ces différents sous-réseaux permettant un couplage des réponses (Kroemer et al., 2010).

La capacité de maintien de l'homéostasie protéique est une fonction inverse au temps (Douglas et al., 2010, Haigis et Yankner, 2010). Cela apporte un éclairage différent sur la survenue, à l'âge adulte, de pathologies liées à des désordres homéostatiques cellulaires. Les profils de déclenchement des diverses voies de réponses aux stress qui se mettent en place au cours du vieillissement suivent une ligne qui a été conservée avec l'évolution. Les modes d'activation de la réponse cellulaire aux stress constituent donc des caractéristiques phylogénétiquement semblables (Haigis et Yankner, 2010).

B. Protéostasie et vieillissement

La capacité des cellules à maintenir leur homéostasie décline avec l'âge. En effet, avec le temps, un certain nombre de fonctions cellulaires voient leur activité décliner, comme c'est le cas du SUP (Keller et al., 2002, Keller et al., 2004, Ding et al., 2007, Vernace et al., 2007), de la CMA (Zhang et al., 2008), de l'expression de protéines impliquées dans la réponse au stress comme la sirtuine SIRT-1 (Westerheide et al., 2009), qui est également considérée comme un facteur de longévité, et de l'autophagie (Cuervo et Dice, 2000a, Cuervo et Dice, 2000c, del Roso et al., 2003, Arias et Cuervo, 2010). Ces altérations conduisent, à l'échelle de l'organisme, à un dysfonctionnement progressif et à la faillite des différentes fonctions physiologiques. Ce déclin conduit irrémédiablement à la mort de l'organisme. Plusieurs théories ont été avancées pour expliquer les causes du vieillissement, à l'exemple la théorie du stress oxydatif (Harman, 1956, Muller et al., 2007, Ugarte et al., 2010cw) dont le postulat repose sur le fait que les ERO produits par la chaîne respiratoire mitochondriale endommagent les macromolécules cellulaires (qui peuvent s'accumuler) altérant leur fonction, causant alors les manifestations biologiques liées au vieillissement. A cette position s'ajoutent au moins deux autres théories cherchant à expliquer l'origine du vieillissement

dont une théorie dite métabolique. La source de ce principe remonte aux expériences de McCay et al., (McCay et al., 1935) montrant l'effet positif de la restriction calorique sur la longévité des organismes (Guarente, 2005, Colman et al., 2009, Morselli et al., 2010a). Une théorie « génétique » a été également établie, elle est basée sur le fait que le patrimoine génétique puisse être responsable de la programmation de la longévité cellulaire et que des mutations touchant des gènes dits « de longévité » affectent le vieillissement d'un individu (Austad, 2010, Hawkes, 2010, Magwire et al., 2010). Cette théorie peut être illustrée par les souris porteuses d'une mutation leur permettant d'accroître leur existence (Brown-Borg et al., 1996; Bartke et al., 2001), il s'agit des souris naines « Ames », « Snell » et « Laron » qui ne répondent pas à certains facteurs de croissance (mutations du gène de l'hormone de croissance, de la prolactine et de la TSH (*Thyroid Stimulating Hormone*) (Snell, 1929). A la base de toutes ces théories, on retrouve un principe de base commun résidant dans le fait que les organismes et les cellules qui les composent vivent dans un environnement source permanente de stress. Les cellules possèdent des systèmes adaptés de lutte contre ces stress (principalement les chaperons moléculaires et les voies cataboliques et de détoxification des ERO), et à l'inverse, des voies qui facilitent la survenue de stress car consommatrices d'énergie (voies anaboliques) et qui nécessitent la production d'ERO.

Le fonctionnement du réseau protéostatique est sous la dépendance des voies cellulaires de détection de stress comme par exemple les voies métaboliques et de réponse aux nutriments. Ces voies ont été hautement conservées au cours de l'évolution à l'image de la voie TOR (*Target of Rapamycin*), cette kinase étant retrouvée de façon extrêmement bien conservée chez tous les organismes eucaryotes. Le point commun à toutes les théories cherchant à expliquer les causes du vieillissement est qu'elles sont toutes basées sur des modifications des voies membres du réseau protéostatique que ce soit au niveau des voies de réponse au stress, de la signalisation par l'insuline et les facteurs de croissance (voies IRS/Akt/mTOR) (Blagosklonny, 2010), de l'activité des sirtuines et de leurs substrats ou de celles de détoxification des ERO (SOD (Superoxyde Dismutase), recyclage des mitochondries, élimination des macromolécules altérées...) (Salmon et al., 2010jc).

Les rats soumis à des restrictions alimentaires modérées (dont la valeur nutritionnelle était mesurée en calories) ont une longévité accrue en comparaison avec des animaux nourris *ad libitum* (McCay et al., 1935). Cette observation est le point de départ de travaux portant sur les liens entre nutrition, métabolisme, vieillissement et longévité. Ce lien entre restriction calorique et longévité a été confirmé dans des modèles cellulaires (Morselli et al., 2010a) ou animaux tels que le nématode *Caenorhabditis elegans* (Hansen et al., 2008) ou la mouche *Drosophila melanogaster* (Rogina et

Helfand, 2004), et même chez les mammifères (singe Rhésus) (Colman et al., 2009) où un lien direct a été établi entre la valeur calorique de leur régime alimentaire, le fonctionnement des voies métaboliques, la qualité du vieillissement et la longévité.

Différentes approches ont permis de montrer qu'en augmentant la qualité du réseau protéostatique ou en limitant le déclin de certaines de ses composantes avec l'âge, on retardait le vieillissement et la survenue de pathologies liées à l'âge étaient diminuées (Zhang et Cuervo, 2008; Pierce et al., 2010). Ces données peuvent être illustrées par les travaux d'Alavez et al., en 2011 en utilisant *C. elegans* en tant que modèle biologique. Cette équipe a montré que les composés utilisés pour le marquage des fibres amyloïdes, comme la thioflavine T, avaient un rôle protecteur en accroissant la longévité de l'animal et en améliorant leur état de santé au cours du vieillissement et réduisait les agrégats protéiques chez des animaux mutés modélisant des pathologies dégénératives. Ces composés agiraient sur les voies de réponse au stress et sur certains membres du réseau protéostatique (chaperons moléculaires, autophagie, voie protéasomale et les facteurs de transcription HSF-1 et SKN1) et induiraient une réponse similaire à celle observée en cas d'induction de la réponse au stress (Alavez et al., 2011). L'inhibition de la voie mTOR présente des effets bénéfiques dans un modèle animal de la maladie de Huntington (Ravikumar et al., 2004). L'activation de SIRT1 présente une action protectrice contre la neurodégénérescence dans des modèles cellulaires et animaux (Araki et al., 2004). Plus généralement, l'augmentation de l'expression de SIRT1 chez la souris aurait un effet protecteur contre les pathologies ayant l'âge pour facteur de risque majeur : diabète, pathologies cardio-vasculaires, PND, un certain nombre de cancers (Herranz et Serrano, 2010) et accroîtrait la longévité. Il est suggéré que cet effet passe par l'induction de l'autophagie (Salminen et Kaarniranta, 2009, Morselli et al., 2010b), cependant SIRT1 compte parmi ses substrats nombre d'acteurs importants du réseau protéostatique et son effet est probablement plus global (Chung et al., 2010).

Les polyphénols, molécules retrouvées dans certains végétaux et aliments, tels que le resvératrol², la quercétine, la curcumine et les catéchines sont connues pour leurs propriétés anti-oxydantes et anti-inflammatoires. Ces molécules sont des inducteurs des sirtuines ayant pour substrats NF-κB, le facteur de transcription FOXO3 (*Forkhead box class O*), p53...(Chung et al.,

² Le resvératrol fait partie des éléments entrant en compte dans l'explication du phénomène dit du paradoxe français faisant référence au régime du Sud-Ouest de la France se composant de vin rouge et de graisses animales saturées associé à une faible mortalité due aux maladies cardio-vasculaires. En effet, il existe une corrélation positive entre régime alimentaire riche en acides gras saturés et mortalité (Renaud et de Lorgeril, 1992, Kaeberlein et Rabinovitch, 2006).

2010). Un rôle potentiellement important de SIRT1 a été identifié dans la régulation de l'autophagie puisque son inhibition empêche l'induction de l'autophagie par une privation nutritionnelle et que des souris mutées pour *Sirt1*^{-/-} présentent un phénotype proche des souris pour lesquelles l'autophagie a été abolie. De plus, une augmentation de l'activité des sirtuines pourrait mimer les effets de la restriction calorique (Lee et al., 2008). Le resvératrol, molécule issue du raisin et retrouvée dans le vin rouge est un inducteur connu de l'autophagie. Mais ces données ne représentent pas un consensus, en effet, le resvératrol pourrait inhiber l'autophagie à travers l'induction de la protéine p70S6K (Armour et al., 2009). L'utilisation de cette molécule dans des modèles cellulaires de pathologies neurodégénératives s'est révélée bénéfique (Albani et al., 2010).

C. Interconnexions entre les voies cataboliques cellulaires

Le SUP et les voies autophagiques présentent une fonction complémentaire au sein de la cellule eucaryote puisque la première prend en charge le catabolisme des protéines à demi-vie courte et la seconde permet la dégradation de protéines à demi-vie plus longue, d'agrégats (que le protéasome ne peut pas dégrader) d'organites, de lipides...

Compte-tenu des effets potentiels des protéines anormales présentes dans la cellule, les différents systèmes cataboliques représentent plusieurs lignes de défense. En conditions physiologiques, toutes fonctionnent avec une activité basale. En période de stress, en fonction de l'intensité et de la durée du stress considéré, une régulation différentielle des mécanismes de dégradation se mettent en place afin d'adapter au mieux la réponse cellulaire. Ainsi, la CMA peut être induite directement par un stress oxydatif et dans ce cas la macroautophagie basale est alors inhibée (Kiffin et al., 2004; Underwood et al., 2010). En cas de stress nutritionnel, la macroautophagie, de plus grande capacité sera activée en premier. Si ce stress persiste, alors il y aura activation de la CMA (Massey et al., 2008). Dans le contexte de l'expression d'une protéine anormale ayant propension à s'agréger, la CMA et le SUP peuvent être rapidement débordés et l'agrèphagie (autophagie spécifique d'agrégats protéiques et de protéines mal repliées) représentera alors le dernier recours (Martinez-Vicente et Cuervo, 2007).

D'un point de vue global, une inhibition du protéasome induit une activation compensatoire de l'autophagie (Rideout et al., 2004; Pandey et al., 2007a; Rubinsztein, 2007). Les travaux de Pandey *et al.*, mettent en évidence le rôle de HDAC6 (Histone Déacétylase 6), reliant le SUP à la macroautophagie (Pandey et al., 2007a, b). L'inhibition du protéasome conduit à une activation de

l'autophagie due à l'accumulation de protéines ubiquitinyliées et de protéines anormales dans la cellule, constituant alors une alternative à cette perte de fonction. Malgré tout la réciproque n'est pas vraie. Ainsi, l'inhibition de l'autophagie compromet la dégradation de ses substrats par le protéasome comme le présente une étude menée en 2009 par Korolchuk et al (Korolchuk et al., 2009). L'inhibition de l'autophagie favorise la formation d'agrégats protéiques, or le protéasome, tout comme la CMA, nécessitent que les protéines substrats soient dépliées en vue de leur dégradation. De plus, l'étroitesse du pore du protéasome ne permet pas la prise en charge de substrats de taille aussi importante que ceux de la macroautophagie.

D. Mécanismes de formation des inclusions neuronales caractéristiques des pathologies neurodégénératives

Les inclusions de protéines agrégées sont une caractéristique commune à la plupart des pathologies neurodégénératives (PND) (cf tableau 2, annexes). La formation de ces inclusions est sélective et concerne majoritairement les protéines pathologiques (Rajan et al., 2001).

Ces protéines pathologiques, en particulier dans le cas des PND génétiquement transmissibles sont nativement mal-conformées constituant un risque constant au cours de la vie (Ross et Poirier, 2004). Dans ce cas l'induction de l'agrégation est un processus relié au temps et aux facteurs de risques liés à la maladie qui contribuent à augmenter la concentration de ces protéines jusqu'à déborder les systèmes de contrôle-qualité (figure 3). Pour les formes sporadiques, les protéines impliquées acquièrent leur propension à s'agréger principalement par des modifications post-traductionnelles covalentes comme par exemple l' α -synucléine (oxydation, nitration), la protéine tau (phosphorylation, glycation, oxydation ...) et la SOD1 (oxydation) (Bosco et al., 2010, Martin et al., 2011a) ou encore des clivages, associés à l'avancée en âge et aux facteurs de risques environnementaux et génétiques. Ces protéines peuvent former des oligomères, considérés comme les formes les plus toxiques, puis des protofibrilles qui s'associent entre-elles formant des agrégats de type amyloïde (figure 4). Au sein de ces agrégats, les protéines forment des feuillets β reliés entre eux par des liaisons hydrogène. Les inclusions, étape finale du processus d'agrégation, sont considérées comme protectrices dans le sens où leur nature amorphe et insoluble annulerait la toxicité des oligomères et des protofibrilles (Ross et Poirier, 2004, Levine et Kroemer, 2009, Douglas et Dillin, 2010, Martin et al., 2011a).

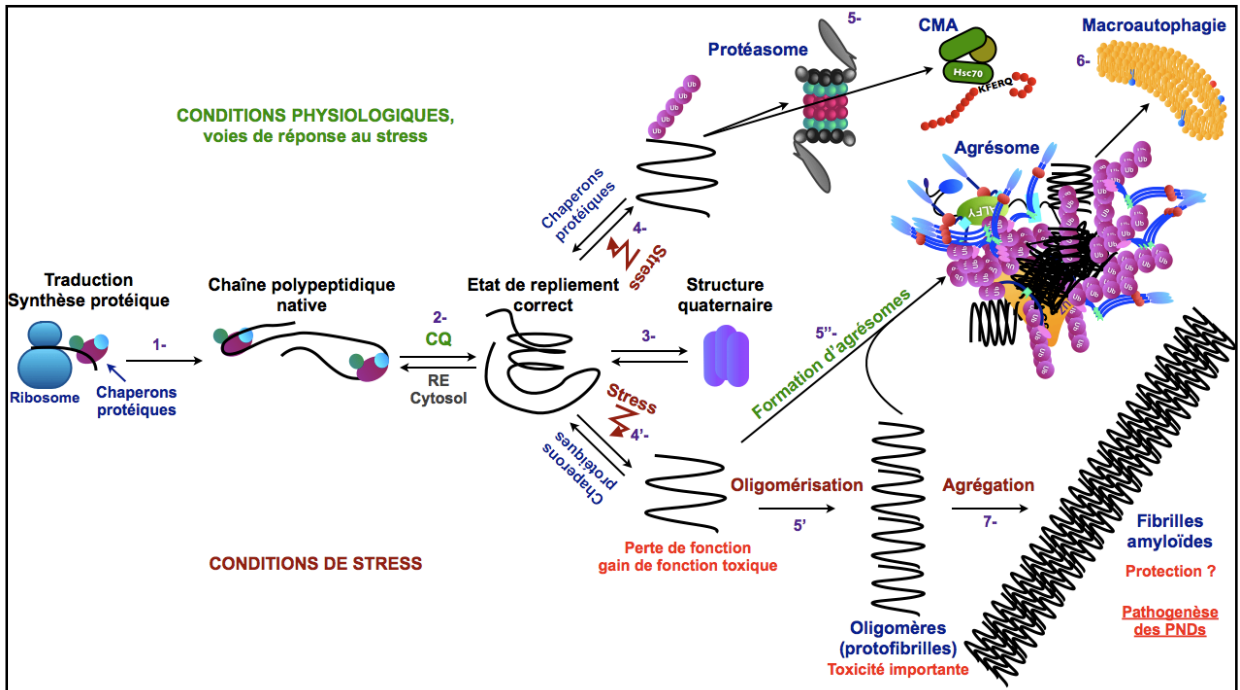


Figure 3 : Mécanismes d'élimination des protéines anormales et d'agrégation protéique

Dès leur synthèse (1), les protéines sont prises en charge par les chaperons moléculaires qui les aident à acquérir une structure tertiaire correcte (2). Ces chaperons participent également au contrôle de la qualité (CQ) des protéines. Les protéines changent constamment de conformation (modifications post-traductionnelles, formation de complexes (structure quaternaire (3), donc le CQ doit être efficace de manière permanente. Des modifications aléatoires peuvent survenir, fortement favorisées par des stress de type protéotoxique (4) compromettant la conformation protéique. Les chaperons moléculaires interviennent encore à ce stade afin de les aider à retrouver un état physiologique. En cas d'impossibilité de retour en arrière, les protéines sont prises en charge par les voies cataboliques (SUP, CMA principalement) (5).

La mauvaise conformation d'une protéine peut induire une perte de fonction ou, à l'inverse, lui conférer un gain de fonction toxique (4'). Ces mal-conformations, de même que certaines modifications post-traductionnelles covalentes peuvent favoriser l'oligomérisation de ces protéines pathologiques (5'). Ces oligomères correspondraient aux formes les plus délétères pour la cellule. Protéines anormales et oligomères peuvent être ubiquitinylés, séquestrés dans les agrésomes (5'') et dégradés par agréphagie (6). Le pore du protéasome est trop étroit pour prendre en charge ce type d'agrégats, et la CMA n'est pas compétente pour ces substrats. En cas de submersion des voies de dégradation, les oligomères (ou protofibrilles) s'assemblent en fibrilles de type amyloïde, ce qui est considéré comme une forme de mécanisme protecteur (7). Des anomalies au niveau des chaperons et/ou des voies cataboliques favorisent la formation de protéines toxiques et sont considérées comme à la base de la pathogenèse de la plupart des PND.

III. LE SYSTÈME UBIQUITINE-PROTÉASOME

A. UBIQUITINYLATION ET SYSTÈMES «UBIQUITIN-LIKE» (UBL)

Le système ubiquitine-protéasome (SUP), est une voie catabolique dépendante de l'énergie sous forme d'ATP, présentant une spécificité de substrat. Le SUP prend en charge principalement la dégradation de protéines à demi-vie courte. Le SUP est également capable de dégrader des complexes protéiques ainsi que des grosses protéines membranaires (Rubinsztein et al., 2005), mais quels que soient les substrats, ils devront nécessairement perdre leur structure tertiaire avant d'être catabolisés. Les protéines substrats de cette voie sont généralement des molécules importantes de voies de signalisation (ex : p53) ou de transduction de signal nécessitant une dégradation rapide (demi-vie courte), par conséquent l'activité du protéasome est particulièrement bien régulée. Le protéasome est une structure extrêmement bien conservée au cours de l'évolution depuis les procaryotes jusqu'aux eucaryotes supérieurs.

La reconnaissance du substrat par le protéasome se fait grâce à une modification post-traductionnelle spécifique au niveau de la protéine ciblée : l'ubiquitylation³, qui correspond à la liaison covalente d'un ou de plusieurs exemplaires d'une petite protéine globulaire de 76 aa (8,5 kDa) : l'ubiquitine. La dégradation, dépendante de l'ATP, a lieu au sein du protéasome 26S (Nandi et al., 2006). Le protéasome est un complexe protéique en forme de tonneau composé par une unité centrale (*core particle*), responsable de la dégradation, et par une ou plusieurs sous-unité(s) régulatrice(s) (*regulatory particle*).

³ Il est à noter qu'il existe une dégradation protéasomale indépendante de l'ubiquitine (Tsvetkov et al., 2010).

Le marquage de multiples protéines par l'ubiquitine joue un rôle de nombreux processus cellulaires (stabilisation protéique, progression dans le cycle cellulaire, transcription génique, transport de récepteurs, réponse immune, infections virales, réparation de l'ADN...) (Ikeda et Dikic, 2008). Dans un grand nombre de cas, l'ubiquitinylation permet de signaler que la protéine ciblée doit être dégradée par le protéasome.

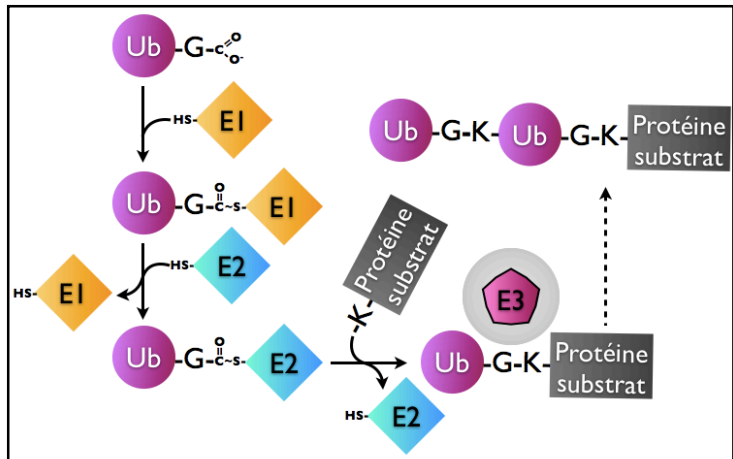


Figure 4 : Représentation schématique de la conjugaison de l'ubiquitine au niveau d'un résidu lysine d'une protéine substrat. L'ubiquitine (Ub) est conjuguée par une liaison thioester à une enzyme E1, puis échangée avec une enzyme de conjugaison E2 et enfin attachée spécifiquement à une protéine substrat grâce à une ubiquitine-ligase (E3) par une liaison peptidique.

La première réaction consiste initialement en l'adénylation de la glycine carboxy-terminale de l'ubiquitine puis en la formation d'une liaison thioester entre ce résidu glycine et une cystéine du site catalytique de l'enzyme E1 (*ubiquitin activating enzyme* ; activation de l'ubiquitine). L'ubiquitine est étre transférée à l'enzyme E2 ou UBC (*Ubiquitin-Conjugating enzyme*, enzyme de conjugaison de l'ubiquitine ou *Ubiquitin Carrier protein*, protéine transporteur d'ubiquitine) par une réaction de *trans*-estérification permettant la mise en place d'une liaison thioester entre la glycine carboxy-terminale de l'ubiquitine et un résidu cystéine du site catalytique de E2. Enfin, l'ubiquitine est liée par une liaison isopeptidique, généralement à un groupe amine situé en position ϵ d'une lysine interne de la protéine cible, grâce à l'enzyme E3 (*ubiquitin-ligase*) qui favorise le transfert de l'ubiquitine au substrat protéique à partir de l'enzyme E2 (figure 4). Les ubiquitine-ligases (E3), très variées, sont responsables de la sélection des protéines substrats (Schwartz et Hochstrasser, 2003, Ikeda et Dikic, 2008).

L'ubiquitinylation est un processus réversible. Le détachement de l'ubiquitine de son substrat est un processus catalysé par des enzymes spécifiques, les DUBs (*Deubiquitination enzyme* ou *Deubiquitinylase*). La dé-ubiquitinylation a lieu au cours de la dégradation du substrat ubiquitinylé par le protéasome grâce à une sous-unité protéique appartenant à la particule régulatrice 19S et est un pré-requis pour l'insertion du substrat dans la chambre catalytique. La première étape de l'ubiquitinylation correspond à la greffe d'un exemplaire de l'ubiquitine à la protéine cible. La deuxième étape consiste en la multimérisation de l'ubiquitine fixée à la protéine substrat par conjugaison d'autres résidus ubiquitine sur celle-ci. En effet, la séquence polypeptidique de

l'ubiquitine contient sept résidus lysines (en position 6, 11, 27, 31, 33, 48 et 63) qui constituent le site de la liaison peptidique avec l'ubiquitine suivante dans les polymères. Les chaînes de polyubiquitine liées au niveau de la lysine (K) 48 sont considérées comme la forme canonique car ce furent les premières chaînes identifiées en tant que marqueurs pour la dégradation par le SUP (Ikeda et Dikic, 2008). En fonction de la lysine engagée dans la liaison au substrat, la conformation de la chaîne de poly-ubiquitine est modifiée (par exemple, une chaîne d'ubiquitines liées en K63 a une conformation plus ouverte qu'une chaîne comportant des résidus ubiquitine liés en K48). Par conséquent, les protéines en charge de la reconnaissance de ces chaînes (protéines de liaison à l'ubiquitine comportant un domaine UBA et/ou un domaine UBL (*Ubiquitin-like*) ne n'ont pas la même affinité pour tel ou tel type de chaîne et donc prendre en charge les protéines ubiquitinylées de manière différentielle.

Une protéine polyubiquitinylée en K48 est dégradée par le protéasome, les chaînes en K48 ont aussi un rôle dans la stabilisation de protéines, alors qu'une chaîne en K63 destinerait la protéine cible à être dégradée par macroautophagie (Wooten et al., 2006). L'ubiquitinylation est nécessaire également pour la formation des agrésomes (voir [Partie 2-IV-3-d](#)), qui seront ensuite adressés pour la dégradation autophagique (Kawaguchi et al., 2003). La greffe d'une seule ubiquitine (ou mono-ubiquitinylation) peut constituer un type de signal par exemple dans le cadre de la réparation de l'ADN, ou dans le transport de récepteurs (Finley, 2009).

D'autres protéines subissent un processus de conjugaison semblable à l'ubiquitinylation grâce à l'intervention d'enzymes jouant un rôle similaire à E1, E2 et éventuellement E3 : ce sont des protéines et des mécanismes de conjugaison dits *ubiquitin-like*. Parmi les protéines conjuguées de cette manière, deux sont indispensables pour le déroulement de l'autophagie : Atg12 et les homologues de la protéine Atg8 de la levure *Saccharomyces cerevisiae* (voir [Partie 2-II-B-6-a](#)). Ainsi, lors de la formation autophagosomale, Atg12 est conjuguée à Atg5 et Atg8 est liée à un lipide membranaire : la phosphatidyl-éthanolamine (PE) (Mizushima et al., 1998; Ichimura et al., 2000; Kuma et al., 2002). Au cours de ces deux conjugaisons, interviennent des enzymes avec des rôles similaires à E1, E2 et E3 dont l'enzyme Atg7 (*E1-like*), est commune aux deux voies. Par ailleurs, le complexe résultant de la conjugaison d'Atg12 à Atg5 joue le rôle de ligase pour la phase finale de la liaison d'Atg8 à la PE de la membrane de l'autophagosome en formation (Noda et al., 2008).

B. DÉGRADATION DES SUBSTRATS : LE PROTÉASOME

26S

Le protéasome 26S est un complexe protéique de très grande taille (environ 2,5 MDa). Il est classiquement comparé à un tonneau, composé d'une partie centrale : le cœur catalytique 20S responsable de l'activité protéolytique et surmonté à l'une de ses extrémités (ou à chacune d'entre-elles) par une (des) sous-unité(s) régulatrice(s) 19S. Celles-ci reconnaissent la protéine substrat, la déplient et la transfèrent à l'intérieur de la chambre catalytique où elles seront dégradées (figure 5). Le protéasome 20S est intrinsèquement fonctionnel et peut interagir avec des régulateurs autres que les particules régulatrices 19S. Il existe des sous-unités alternatives utilisées lors de l'assemblage du protéasome 20S, comme par exemple la particule 11S ou PA28 (*Proteasome Activator of 28 kDa*), donc il n'y a pas un mais des protéasomes (Rechsteiner et Hill, 2005; Ramos et Dohmen, 2008; Baugh et al., 2009).

Le protéasome 26S est responsable de la plus grande majorité de la protéolyse non-lysosomale. Cette protéase appartient à la famille des protéases cytosoliques dépendantes de l'ATP de type AAA (*ATPases Associated with diverse cellular Activities*) (Wang et al., 2010).

La sous-unité catalytique du protéasome 26S correspond au corps du tonneau : sa structure tertiaire est composée de quatre anneaux protéiques empilés donnant une structure en forme de cylindre. Ces anneaux protéiques sont eux-mêmes constitués par l'assemblage ordonné de sept sous-unités (α et β) uniques mais homologues (figure 5). Les sites catalytiques se situent à l'intérieur de la structure en anneau constituant ainsi la chambre catalytique du protéasome. De cette manière, l'activité protéasique est isolée et cela permet de la contrôler et d'éviter la

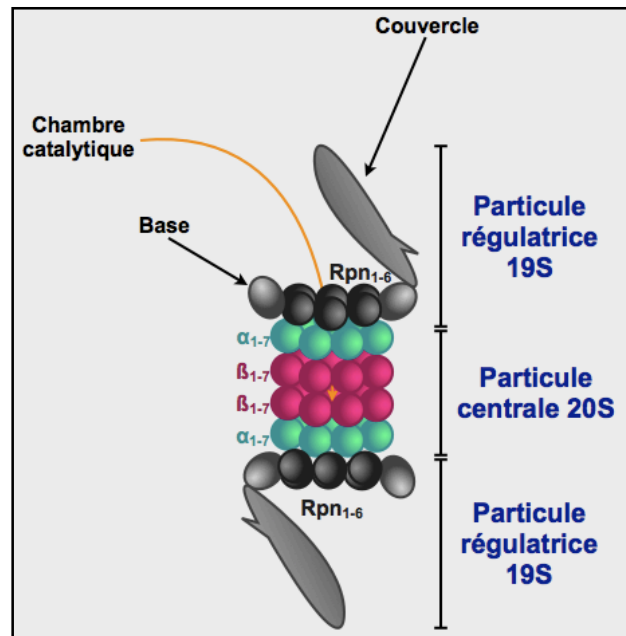


Figure 5 : Représentation schématique du protéasome 26S. Le protéasome 26S est composé d'une particule centrale 20S qui contient l'activité catalytique et d'une particule régulatrice subdivisée en une base surmontée d'un « couvercle » qui permet l'ouverture de la chambre catalytique et la reconnaissance du substrat ubiquitinylé.

dégradation « accidentelle » de protéines cellulaires⁴ (Baumeister et al., 1998, Bedford et al., 2009, Wong et Cuervo, 2010).

Les anneaux α du protéasome 20S forment un pore étroit par lequel le substrat atteint la chambre catalytique. Lorsque le protéasome 20S n'est pas assemblé aux sous-unités régulatrices 19S, les extrémités amino-terminales des sous-unités α forment une barrière empêchant l'accès au cœur catalytique. Certains signaux particuliers ainsi que la fixation de la sous-unité régulatrice 19S provoquent un changement de conformation au niveau de ces sous-unités induisant alors l'ouverture du pore du protéasome (Shabek et al., 2009, Bedford et al., 2009, 2010).

Les sous-unités régulatrices 19S (ou PA700 ou particules régulatrices) correspondent au(x) couvercle(s) du tonneau et sont constituées par de nombreuses sous-unités. Elles présentent une structure annulaire, la base, formée par l'assemblage de six sous-unités Rpt1-6 possédant la fonction AAA-ATPase (Glickman et al., 1998) qui s'ajuste sur la particule 20S (Bedford et al., 2010). Rpn10, Rpn13 et Rpn1 jouent le rôle de récepteurs pour l'ubiquitine et permettent la fixation du substrat ubiquitylé au niveau du protéasome par leur capacité de se lier aux protéines portant un domaine UBL (Finley, 2009).

Bien que la particule protéasomique 20S puisse dégrader certaines protéines de façon indépendante, la plupart du temps l'activité catabolique de cette dernière nécessite la présence et la fonction de la particule régulatrice 19S qui permet la dé-ubiquitylation et le dépliement des protéines substrats et ce de manière dépendante de l'ATP.

IV. LES VOIES LYSOSOMALES

A. Le lysosome

Les lysosomes sont souvent représentés comme le système digestif cellulaire. Le système lysosomal correspond à l'ensemble des compartiments acides, mis en communication (trafic vésiculaire) contenant des niveaux variables d'hydrolases acides. Il est constitué par les vésicules de

⁴ Le principe de compartimentalisation de la composante active de ce système catabolique est également retrouvé dans la structure de la voie autophagique/lysosomale pour laquelle les enzymes hydrolytiques sont séquestrées à l'intérieur d'un organite particulier, le lysosome. De plus, ces enzymes nécessitent un environnement spécifique (pH luminal acide) pour pouvoir fonctionner.

transport dérivant du réseau *trans*-golgien contenant les hydrolases néo-synthétisées, les endosomes tardifs, les amphisomes et autolysosomes, les lysosomes, les corps résiduels contenant du matériel non digestible (céroïde, lipofuscine...). Le transport et la fusion des vésicules appartenant au système lysosomal sont régulés par de petites protéines G (GTPases) monomériques, les protéines Rab.

Les voies cataboliques lysosomales peuvent être divisées en deux sous-groupes : d'une part l'hétérophagie (voies endosomales) qui capture et dégrade des composants situés à l'extérieur de la cellule, et d'autre part l'autophagie qui permet la dégradation de composés intracellulaires. La fonction catabolique des lysosomes peut être complétée par celle d'organites apparentés tels que les mélanosomes ou des granules lytiques des cellules appartenant au CMH de classe II (Complexe Majeur d'Histo-compatibilité). La dichotomie entre voies endosomales et autophagiques doit être nuancée du fait que les vésicules autophagiques et les endosomes peuvent fusionner ensemble au cours de leur maturation et que la voie autophagique puisse être détournée par des organismes pathogènes tels que des bactéries (*Shigella*, *Légionelles*) ou des virus (coronavirus,...).

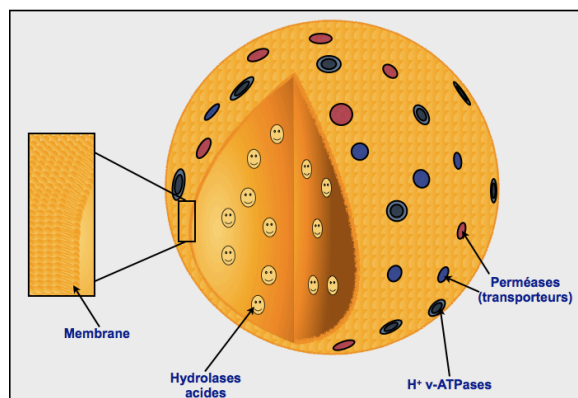


Figure 6 : Représentation schématique du lysosome

Les lysosomes présentent la particularité de posséder une lumière très acide (pH compris entre 3,5 et 5), cette acidité étant nécessaire au fonctionnement des hydrolases qu'ils contiennent (figure 6). Le maintien de l'acidité lumineuse lysosomale est assuré par des pompes à protons vacuolaires dépendantes de l'ATP (H^+ v-ATPases).

Des travaux par approche protéomique ont permis d'identifier la plupart des protéines lysosomales (Journet et Ferro, 2004; Callahan et al., 2009; Schröder et al., 2010). Deux classes de protéines sont importantes pour le fonctionnement des lysosomes. Premièrement, les hydrolases acides, responsables de la capacité lytique lysosomales, elles sont également impliquées dans la dégradation de la matrice extracellulaire, dans la maturation de certaines pro-protéines en protéines actives et sont impliquées dans l'initiation de l'apoptose ; plus de cinquante enzymes de cette catégorie ont été identifiées. Ensuite, les protéines *trans*-membranaires intégrales lysosomales, environ vingt-cinq chez les mammifères, présentant des fonctions diverses dont l'acidification de la

lumière lysosomale (pompes à protons v-ATPases), la fusion vésiculaire (protéines SNARE) ou encore le relargage des produits résultants de la dégradation dans le cytosol (perméases).

La grande majorité des protéines de la lumière lysosomale sont synthétisées, glycosylées et acquièrent leur structure tri-dimensionnelle dans le réticulum endoplasmique (RE) depuis lequel elles sont ensuite transférées vers l'appareil de Golgi. Elles sont alors marquées par l'ajout de mannose-6-phosphate (M6P) permettant leur capture par un récepteur. Il existe deux types de récepteurs au M6P : l'un dépendant des cations et l'autre, indépendant, tous les deux ubiquitaires. Les vésicules contenant ces protéines quittent le réseau *trans*-golgien vers le lysosome et rejoignent la voie endosomale. Les protéines peuvent également être acheminées vers le lysosome à travers des mécanismes d'endocytose depuis la membrane plasmique (Saftig et Klumperman, 2009). Dans le cas des protéines intégrales de la membrane lysosomale, les processus d'acheminement au lysosome sont moins clairs.

Les lysosomes contiennent plus de quatre-vingts hydrolases acides (qui permettent la dégradation de macromolécules de diverses natures : protéines, lipides...) dont une grande quantité de protéases parmi lesquelles les cathepsines elles-mêmes subdivisées en groupes en fonction de l'acide aminé du site actif. Ainsi, on trouve les cathepsines à cystéine : B, C, F, H, K, L, N, O, S, T, U, W et X, les cathepsines à aspartate : D et E et les cathepsines à sérine : A et G (Yamashima et Oikawa, 2009). Ces hydrolases, actives sur des gammes de pH acides larges, dégradent la plupart des protéines adressées aux lysosomes. Néanmoins, certaines modifications post-traductionnelles, d'origine chimique ou enzymatique, survenant au cours du vieillissement ou en conditions pathologiques, peuvent rendre les protéines qui les portent plus résistantes à la dégradation et promouvoir l'agrégation de protéines partiellement dégradées et de lipides tels que la lipofushine au sein des corps résiduels (Nixon et al., 2000).

Des anomalies des protéines lysosomales et en particulier des protéines associées à la membrane ou *trans*-membranaires intégrales sont à l'origine d'une grande variété de pathologies dont des maladies dites de surcharge comme par exemple la maladie de Pompe (glycogénose de type 2) qui fait suite à une mutation sur le gène codant l' α -1,4-glucosidase. Ces anomalies peuvent être impliquées dans la tumorigenèse (mélanome, cancer du sein ; Journet et Ferro, 2004) ainsi que des pathologies neurodégénératives comme la maladie de Niemann-Pick de type C ou encore la maladie d'Alzheimer (Callahan et al., 2009).

B. Les voies d'endocytose (Hétérophagie)

L'endocytose (*endon* : en dedans *cytos* : la cellule ; ou hétérophagie) correspond aux processus conduisant à l'internalisation de substances d'origine extracellulaire. Il existe différentes voies d'endocytose dont le point commun réside dans l'internalisation du matériel cible par invagination de la membrane plasmique aboutissant à la formation de vésicules appelées endosomes (endocytose dépendante de la clathrine, phagocytose, macro- et micropinocytoses et potocytose). Les endosomes nouvellement formés (ou endosomes précoces) deviennent matures par des processus de fusion avec d'autres vésicules appartenant à la voie endo/lysosomale pour donner des endosomes tardifs dont la composition luminale et membranaire est distincte des précédents (Rab7, LAMP ; *Lysosomal-Associated Membrane Protein*) avant leur fusion terminale avec les lysosomes afin de dégrader leur contenu.

L'endocytose participe à l'homéostasie cellulaire en internalisant des portions extracellulaires potentiellement sources de nutriments, à la réponse immunitaire par la phagocytose d'organismes pathogènes, dans la neurotransmission (endocytose de récepteurs aux neurotransmetteurs, par exemple le récepteur au GABA (*Gamma AminoButyrate type A* ; Kittler et al., 2000), la communication intercellulaire et la transduction du signal (Nixon et al., 2000).

D'autres mécanismes cellulaires sont liés à l'activité lysosomale dont la phagocytose. Ces mécanismes sont apparentés à l'autophagie avec certains composants moléculaires (LAMP) et mécanistiques (fusion de vésicules avec les lysosomes) communs.

C. L'autophagie

L'autophagie est un terme recouvrant différentes voies cataboliques lysosomales dont le point commun est la prise en charge de substrats d'origine intracellulaire (figure 7). Ces différentes voies sont : la macroautophagie, majoritaire, la microautophagie et la CMA.

Les voies autophagiques déclenchées en réponse à un stress conduisent généralement à la survie cellulaire, bien que dans certaines conditions, par exemple au cours de la métamorphose des insectes, il a été décrit une mort cellulaire autophagique (Di Bartolomeo et al., 2010) définie et classée en tant que mort cellulaire programmée de type II (Kroemer et al., 2009).

1. La microautophagie

Principalement décrit chez les eucaryotes inférieurs (levures), ce processus catabolique correspond à l'internalisation directe par la vacuole de portions cytoplasmiques et d'organites (ex : peroxysomes, mitochondries) dans la lumière de laquelle ils seront dégradés. Le déroulement de la microautophagie correspond au bourgeonnement d'une vésicule à l'intérieur de la lumière vacuolaire, grâce à laquelle sont invaginées et internalisées des portions cytoplasmiques contenant les substrats. Ceci modifie la composition moléculaire de la membrane vacuolaire (déplacement des protéines) et la vacuole émet des structures tubulaires dépourvues de protéines séquestrant le matériel à dégrader. Ce mécanisme nécessite le maintien du potentiel membranaire vacuolaire et la participation de GTPases (Cuervo, 2004).

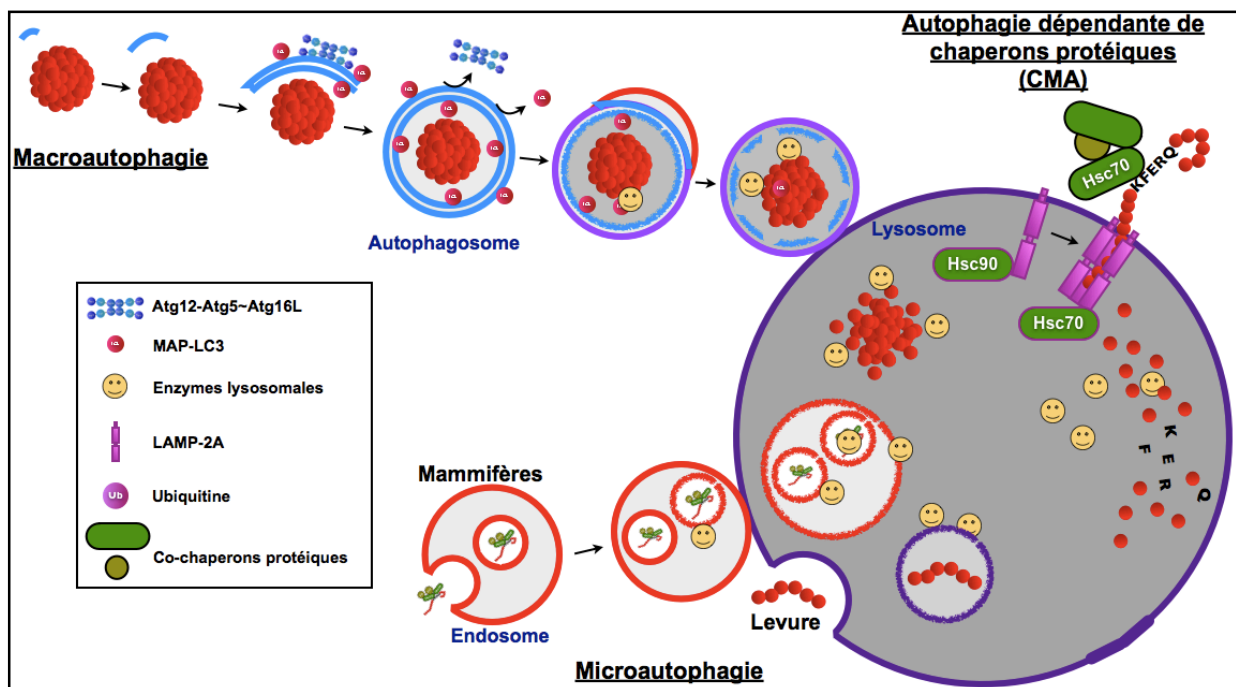


Figure 7 : Voies autophagiques/lysosomales

En fonction du mode d'acheminement du substrat au lysosome en vue de sa dégradation, on distingue différents types d'autophagie. L'autophagie assistée par des chaperons protéiques (CMA) correspond à la prise en charge d'une protéine exhibant un motif « KFERQ » ou « KFERQ-like » par un complexe de chaperons protéiques comprenant entre autres Hsc70 et à sa translocation dans le lysosome suite à l'intervention de LAMP-2A, protéine de la membrane lysosomale qui sert ici de récepteur. La microautophagie correspond à l'internalisation directe du substrat par invagination de la membrane lysosomale (levure) ou par la membrane endosomale (mammifères). Au cours de la macroautophagie, le substrat (organite, protéine...) est séquestré dans un organe spécifique : l'autophagosome qui subit ensuite un processus de maturation par fusion avec des vésicules de la voie endo-lysosomale ; la fusion terminale ayant lieu avec le lysosome. Il est à noter que la voie CVT, spécifique à la levure, n'est pas représentée ici.

Pour la levure, le mécanisme de la microautophagie a pu être reconstitué *in vitro*, cependant, les voies moléculaires concernant ce type d'autophagie sont très mal comprises. La régulation de la microautophagie fait intervenir la voie de signalisation TOR et les protéines vacuolaires EGO (*Exit*

from rapamycin induced Growth Arrest) (Dubouloz et al., 2005). Plusieurs sous-types de microautophagie sont décrits chez les eucaryotes inférieurs comme la *Piecemeal autophagy of the nucleus* (PMN) qui constitue une sorte de « grignotage » de portions nucléaires non-essentiels par la vacuole en conditions de privation nutritionnelle nécessitant l'intervention de la machinerie moléculaire macroautophagique (Kvam et Goldfarb, 2007, Kraft et al., 2009, Krick et al., 2009). On peut citer aussi la micropexophagie qui correspond à la dégradation spécifique des peroxisomes par microautophagie (Farré et Subramani, 2004).

Sur le plan physiologique, la fusion de vésicules telles que les autophagosomes augmente la surface membranaire vacuolaire. La microphagie jouerait alors un rôle dans la régulation de la taille de la vacuole. En dégradant des constituants pouvant être anormaux, la microautophagie participe également au maintien de l'homéostasie cellulaire.

Jusqu'à aujourd'hui, ce processus était décrit chez la levure. Néanmoins, contrairement à la CMA et à la macroautophagie, la microautophagie n'a jamais été réellement décrite chez les mammifères, chez qui elle était supposée exister (Sahu et al., 2011). Cette supposition reposait sur l'existence de gènes communs entre ces deux familles d'organismes et sur la description de processus morphologiquement ressemblant à la microautophagie chez les mammifères (Santambrogio et Cuervo, 2011).

Très récemment, un processus dont le déroulement est très proche de celui de la microautophagie fongique a été décrit dans des cellules de mammifères (Sahu et al., 2011, Shpilka et Elazar, 2011). De façon surprenante, il a lieu non pas dans les lysosomes mais au niveau d'endosomes tardifs. Cette nouvelle forme de microautophagie est indépendante des acteurs cruciaux appartenant aux autres types d'autophagie - macroautophagie et CMA - c'est-à-dire des protéines Atg5 ou Atg7 et de LAMP-2A, respectivement. Ce type d'autophagie, très proche du mécanisme de formation des endosomes multivésiculaires (MVBs) a été nommé e-microautophagie pour microautophagie endosomale (Santambrogio et Cuervo, 2011). Il est suggéré qu'au cours de l'évolution, le mécanisme de la microautophagie ait été transféré aux endosomes afin de maximiser la dégradation par les enzymes lysosomales. L'e-microautophagie présente quelques points communs à la fois avec la macroautophagie dans la mesure où les substrats peuvent être prélevés en bloc dans le cytoplasme et avec la microautophagie de par le processus d'internalisation du substrat (Santambrogio et Cuervo, 2011). Paradoxalement, l'e-microautophagie est mécaniquement proche de la CMA puisqu'elle prend en charge la dégradation de protéines exhibant le motif

KFERQ par l'intermédiaire du chaperon Hsc70 qui est alors recruté par la phosphatidylsérine du feuillet cytosolique de la membrane endosomale (Sahu et al., 2011, Shpilka et Elazar, 2011). Contrairement à la CMA, le substrat protéique n'aura pas besoin d'être déplié pour être dégradé par la e-microautophagie.

2. L'autophagie assistée par des chaperons protéiques

L'autophagie assistée par des chaperons protéiques, ou CMA, est un mécanisme protéolytique spécifique concernant environ 30% des protéines solubles cytosoliques et nucléaires. Le principe de la CMA est basé sur la reconnaissance d'un motif consensus composé de cinq acides aminés (aa), le motif KFERQ, par un chaperon constitutif : Hsc70 (*Heat Shock Cognate protein of 70 kDa*) (Agarraberes et Dice, 2001).

Une fois liée à la protéine « cible », Hsc70 forme un complexe avec d'autres chaperons moléculaires : Hsp 40 (*Heat Shock Protein of 40 kDa*), Hsp 90 (*Heat Shock Protein of 90 kDa*), Hip (*Hsc 70-Interacting Protein*), Hop (*Hsc70-Hsp90 organizing protein*) et Bag1 (*Bcl-2 Associated athanogene 1 protein*). L'ensemble migre vers la membrane lysosomale où est localisée une protéine particulière : LAMP-2A, issue de l'épissage alternatif du produit du gène LAMP2. Elle permet la translocation de la protéine substrat dans la lumière lysosomale (Majeski et Dice, 2004) (figure 8). LAMP-2A, protéine *trans*-membranaire de type I, est très mobile au niveau de la membrane lysosomale, et participe à la formation de différents complexes. Sous forme monomérique, LAMP-2A constitue le récepteur des substrats de la CMA, pris en charge un à un, dépliés puis transloqués. Pour que le substrat puisse être transloqué, LAMP-2A doit être multimérisée. L'existence de ce complexe est transitoire, il se dissocie juste après la translocation du substrat au travers de la membrane lysosomale (Bandyopadhyay et Cuervo, 2008).

La CMA a été décrite au départ en tant que mécanisme protéolytique spécifique déclenché par la privation nutritionnelle (Backer et Dice, 1986). La CMA est un mécanisme constitutif mais son activité est maximale lorsque la cellule est soumise à des stress qui endommagent les protéines tels que le stress oxydatif (Kiffin et al., 2004), la privation prolongée de nutriments ou encore l'exposition à des substances toxiques (Arias et Cuervo, 2010). La CMA peut également être induite par des protéines anormalement conformées, ayant subi une troncation anormale (Wong et al., 2008)... Compte-tenu du mode de prise en charge du substrat par la CMA, les agrégats protéiques

ne pourront pas être catabolisés par cette voie. La CMA est un mécanisme saturable dont l'étape limitante est la fixation du substrat au récepteur lysosomal LAMP-2A (Hsc70 étant en excès). Lorsque la CMA est active, les niveaux lysosomaux de Hsc70 et de LAMP-2A sont augmentés.

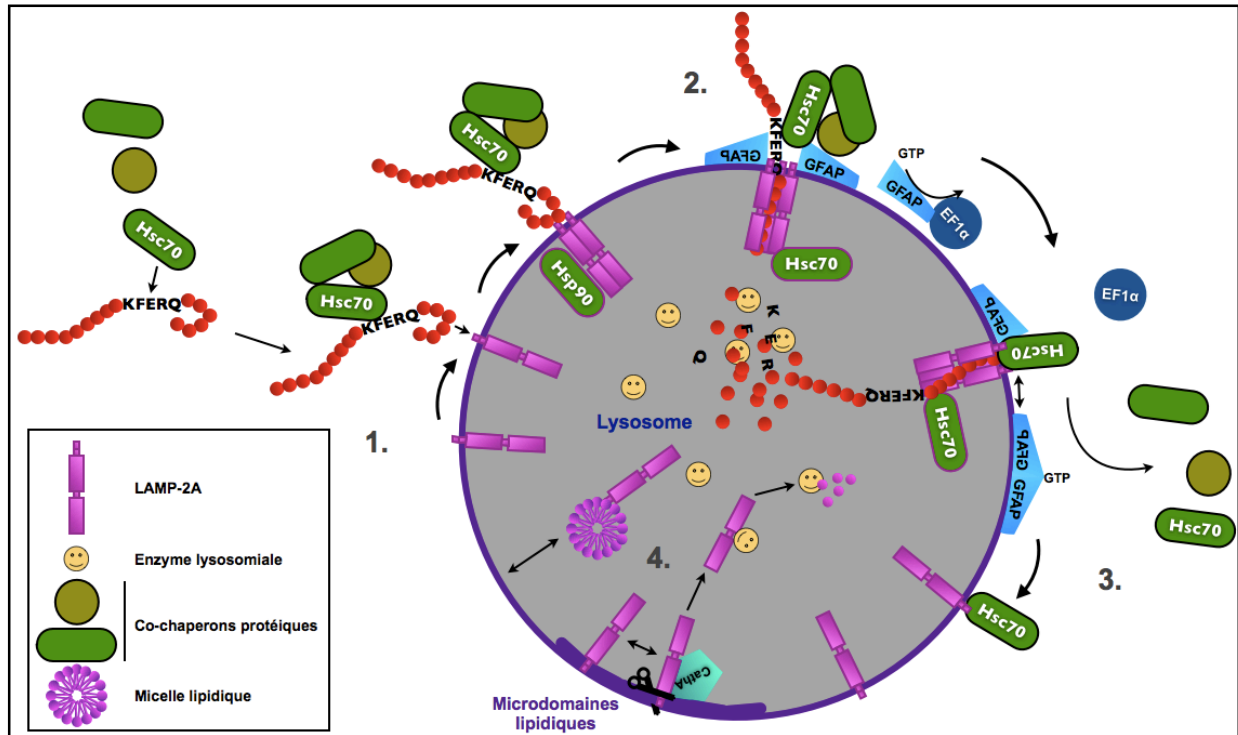


Figure 8 : Mécanisme de la CMA.

1. Le motif KFERQ ou KFERQ-like exposé par un substrat protéique est reconnu par Hsc70 qui forme ensuite un complexe avec des co-chaperons protéiques. L'ensemble est acheminé vers le récepteur lysosomal LAMP-2A. Celui-ci subit alors un processus d'assemblage faisant intervenir la forme lysosomale de Hsp90.
2. Le complexe de translocation issu de la multimérisation de LAMP-2A permet l'internalisation du substrat protéique ayant perdu sa structure tri-dimensionnelle. Celle-ci est facilitée par ly-Hsc70 dans le lysosome où le substrat sera dégradé par les hydrolases acides. Le complexe de translocation est stabilisé temporairement par une sous-population de GFAP localisée à la membrane lysosomale. Une deuxième population, liée à EF1 α , est libérée par fixation au GTP, conduisant à la formation de dimères de GFAP annulant la stabilisation du complexe de translocation.
3. Désassemblage du complexe LAMP-2A suite à l'internalisation du substrat faisant intervenir Hsc70.
4. Régulation de la CMA à travers celle de la protéine LAMP-2A : quand l'activité CMA est basse, LAMP-2A est internalisée dans le lysosome où elle est préservée de la dégradation par association avec des micelles lipidiques. LAMP-2A peut également être relocalisée au niveau de microdomaines lipidiques de la membrane lysosomale enrichis en cathepsine A. Cette enzyme clive LAMP-2A au niveau de la jonction entre portions intra-lysosomale et trans-membranaire, induisant sa dégradation subséquente par les enzymes résidentes du lysosome. En cas d'augmentation de l'activité de la CMA, LAMP-2A est expulsée des microdomaines lipidiques. La fraction intra-lysosomale est ré-adressée à la membrane. La régulation de LAMP-2A par synthèse de novo n'a lieu qu'en cas d'induction importante (Arias et Cuervo, 2010).

L'activité de ce type d'autophagie est régulée par trois mécanismes résultant dans la modulation des niveaux membranaires de LAMP-2A impliquant différents processus de relocalisation et multimérisation : LAMP-2A, sous forme monomérique, est relocalisée au sein de micro-domaines

lipidiques enrichis en cholestérol et en glycosphingolipides (*rafts*). Lorsque l'activité de la CMA est requise, LAMP-2A est exclue de ces *rafts* et est retenue dans des zones membranaires plus fluides où la multimérisation peut avoir lieu. Ces micro-domaines sont enrichis en cathepsine A où la jonction entre domaine *trans*-membranaire et région luminale de LAMP-2A est clivée par la cette enzyme (Cuervo et al., 2003, Kaushik et al., 2006). LAMP-2A ainsi tronquée sera ensuite dégradée par les hydrolases lysosomales. La dynamique de LAMP-2A au sein de la membrane lysosomale est également dépendante du GTP et de la GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) dont deux sous-populations sont localisées à la membrane lysosomale (Bandyopadhyay et al., 2010).

En présence de GTP, un partenaire d'interaction de la GFAP, EF1 α (*Elongation Factor 1 α*) est relarguée de la membrane lysosomale conduisant à l'auto-assemblage de la GFAP et à la neutralisation de sa fonction stabilisatrice du complexe de translocation de la CMA (Arias et Cuervo, 2010, Bandyopadhyay et al., 2010). LAMP-2A peut également être internalisée dans la lumière lysosomale où elle est associée à des micelles lipidiques la préservant de la dégradation. Elle pourra ainsi être ré-adressée à la membrane en cas d'activation de la CMA (Cuervo et Dice, 2000). En cas de stress oxydatif modéré, il a été montré qu'une synthèse *de novo* de LAMP-2A pouvait survenir (Kiffin et al., 2004) néanmoins, dans la plupart des cas, cette synthèse n'est pas requise (Arias et Cuervo, 2010).

Le substrat se lie à la queue cytosolique du récepteur lorsqu'il est sous forme monomérique (Massey et al., 2006). Hsp90 favorise l'assemblage du complexe de translocation de la CMA en stabilisant LAMP-2A au cours de la multimérisation. Le substrat est ensuite déplié puis entre dans le lysosome où il est dégradé par les enzymes résidentes de la lumière lysosomale. L'action de Hsc70 et de Hsp90 dans la dynamique d'assemblage/désassemblage des complexes contenant LAMP-2A est indépendante du complexe de translocation (figure 8).

3. La macroautophagie (cf Partie 2)

D. La voie CVT (*Cytoplasm to Vacuole Targeting*) : transport de protéines à la vacuole

Contrairement à l'autophagie, la voie CVT est une voie biosynthétique constitutive, spécifique à la levure. Ce processus permet le transport à la vacuole d'enzymes résidentes synthétisées dans le

cytosol en conditions nutritionnelles favorables séquestrées à l'intérieur d'une vésicule (Baba et al., 1997)⁵ (figure 9) de structure proche de l'autophagosome. La voie CVT fait appel à un grand nombre de protéines communes à l'autophagie (protéines Atg ; voir tableau 1 en annexe, protéines représentées en gris) et à des protéines spécifiques. A ce jour, trois substrats de la voie CVT sont connus : l'aminopeptidase 1 (Ape1) (Klionsky et al., 1992; Scott et al., 1997), l' α -mannosidase-1 (Ams1) (Hutchins et Klionsky, 2001), et l'aspartyl-aminopeptidase 4 (Ape4) (Yuga et al., 2011) (figure 9).

La protéine Ape1 est synthétisée dans le cytosol par des ribosomes libres sous la forme d'un propeptide prApe1. La forme mature mApe1 résulte du clivage de 45 aa amino-terminaux de prApe1 par la protéinase A vacuolaire Pep4. Un signal d'adressage à la vacuole est retrouvé dans la ce segment. Dès sa synthèse, prApe1 forme des homo-dodécamères de 750 kDa (Kim et al., 1997) qui s'assemblent ensuite en structures extrêmement ordonnées, les complexes Ape1 (Shintani et al., 2002). A travers une liaison entre la partie propeptidique de prApe1 et Atg19 (au niveau de son domaine *coiled-coil* ; CC), se forment les complexes CVT (Scott et al., 2001). Auparavant, Atg19 a pu se lier avec Ams1, une protéine vacuolaire qui profite du transport d'Ape1 pour être adressée à la vacuole par la voie CVT. Au sein des complexes CVT, Ape4 interagit également avec Atg19. Cette dernière s'associe ensuite à Atg11.

Atg11 appartient à la famille des protéines *myosin-like*. Elle présente une partie centrale avec des séquences CC constituant la zone d'interaction avec Atg1, Atg17 et Atg20 pour Atg11. La partie C-terminale permet son interaction avec le complexe CVT (Reggiori et al., 2005, Monastyrska et al., 2006). Une fois le complexe CVT lié à Atg11, celle-ci peut se dimériser (Yorimitsu et Klionsky, 2005), interagir de manière directe ou non avec les filaments d'actine (Monastyrska et al., 2006) et permettre le transport de ce chargement en direction de la structure pré-autophagosomale (SPA ou PAS ; *Pre-Autophagosomal Structure* ou *Phagophore assembly Site*). Cette interaction avec l'actine est dépendante du complexe Arp2/3 (*Actin-Related Protein 2/3*), hautement conservé chez les eucaryotes, et jouant le rôle de site de nucléation des filaments d'actine. Ce complexe est également impliqué dans le trafic d'Atg9, une protéine *trans*-membranaire hautement dynamique *a priori* responsable de l'apport de lipides pour la constitution de la membrane des vésicules CVT (Monastyrska et al., 2008).

⁵ La machinerie de formation de la vésicule CVT est commune avec celle de formation de l'autophagosome. Ici ne sont développés que les points caractéristiques de la voie CVT.

Atg11 est importante pour le recrutement des protéines de la SPA⁶ constituant la machinerie de formation de la vésicule CVT. Par exemple, Atg20 est une protéine endosomale fonctionnant uniquement au cours de la voie CVT dont la relocalisation à la SPA est conditionnée par la présence d'Atg11 et du complexe CVT (Yorimitsu et Klionsky, 2005). Ce complexe sera ensuite échangé entre Atg11 et la protéine Atg8, conjuguée selon un processus *ubiquitin-like* à la PE de la membrane d'isolement (intervention des protéines Atg7 et Atg3). Cette liaison spécifique permet l'exclusion de composants cytosoliques non spécifiques de la voie CVT et la fermeture de la membrane d'isolement sur elle-même donnant alors naissance à une vésicule de la voie CVT. Celle-ci, contenant un substrat spécifique, est beaucoup plus petite qu'un autophagosome (300 à 900 nm), puisqu'elle a un diamètre moyen de 150 nm (Monastyrska et al., 2008). La vésicule CVT fusionne ensuite avec la vacuole et y délivrer son contenu. La prApe1 est donc clivée pour donner la forme mature catalytiquement active, Ape1.

Deux études récentes mettent en évidence d'une part l'existence d'une autre protéine réceptrice pour le chargement CVT, la protéine Atg34 qui se lie spécifiquement à Ams1 à travers un domaine spécifique, le domaine ABD (*Ams1 Binding Domain*) qu'elle possède en commun avec Atg19 (Suzuki et al., 2010, Watanabe et al., 2010). Comme Atg19, Atg34 peut interagir avec Atg8.

Dans le cas d'une induction de l'autophagie, donc en conditions nutritionnelles pauvres, Atg11 et Atg19 ne seraient pas indispensables à la formation de la SPA autophagosomale. De plus, chez des mutants Atg11, le complexe contenant Ape1 ne peut être adressé à la SPA par macroautophagie (Shintani et al., 2002).

⁶ Le terme de structure pré-autophagosomale (SPA) est utilisé à la fois pour la voie CVT et pour l'autophagie. Atg11 est nécessaire pour sa formation au cours de la CVT et est facultative pour l'organisation de la SPA « autophagique ».

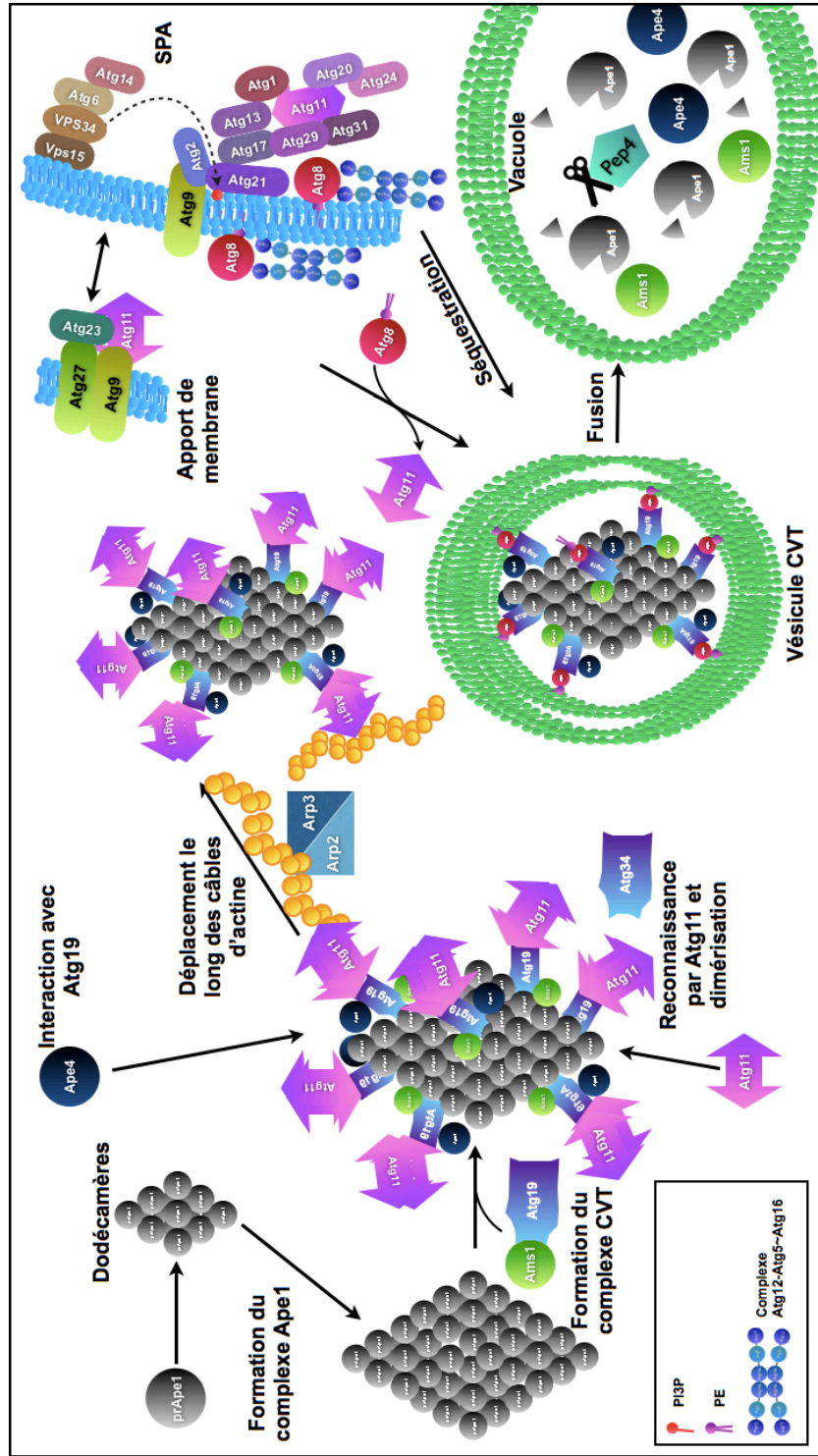


Figure 9 : Voie CVT (*S. cerevisiae*) :
 Juste après sa synthèse, le zymogène prApe1 s'organise en homodécamères, ceux-ci s'assemblent pour former les complexes Ape1 au niveau desquels viennent se lier l'Ams1 et Atg19. Ape4 interagit aussi avec Atg19. Atg11 se lie à Atg19 permettant ainsi le transport des complexes CVT ainsi formés le long des câbles d'actine pour les rapprocher de la SPA en formation, à proximité de la vacuole. Les complexes CVT, grâce à l'échange d'Atg11 avec Atg8-PE au niveau d'Atg19, sont séquestrés au sein d'une vésicule dite CVT qui fusionne avec la vacuole pour y délivrer son contenu et permettre l'activation Pep4 dépendante d'Ape1 et l'adressage de la SPA (pour l'organisation de la SPA, cf *Partie 2-II-B-1-a*).

PARTIE 2 : LA MACROAUTOPHAGIE

I. PRINCIPE GÉNÉRAL

Il s'agit du mécanisme autophagique majoritaire et également le plus étudié. La macroautophagie est, par ailleurs, un processus extrêmement bien conservé de la levure aux protozoaires, des insectes aux mammifères en passant par les végétaux et les vers⁷ (Hughes et Rusten, 2007; Kourtis et Tavernarakis, 2009). En effet, on retrouvera chez tous ces organismes des acteurs protéiques, un déroulement et un mécanisme moléculaire similaires. De ce fait, ce type d'autophagie est considéré comme un phénomène très ancien (origine très probablement antérieure à l'apoptose par exemple). L'autophagie est directement dépendante, contrairement à la CMA, du trafic vésiculaire. C'est une voie constitutive existant à un niveau basal dans tous les types cellulaires possédant un système lysosomal fonctionnel. Elle a lieu afin de maintenir l'homéostasie cellulaire en assurant la dégradation et le recyclage de composants cytoplasmiques de natures diverses (protéines, organites, lipides, bactéries, virus...). Les niveaux d'autophagie basale ne sont pas équivalents d'un type cellulaire à l'autre (Mizushima et Kuma, 2008). En outre, l'autophagie peut être induite suite à la survenue de stress de différentes origines. Elle est également contrôlée par la signalisation hormonale (l'autophagie est induite par le glucagon et inhibée par l'insuline), par les cytokines ou par des facteurs de croissance (l'autophagie induite dépend donc surtout du métabolisme).

Suite à une signalisation favorable au déroulement de l'autophagie, des acteurs moléculaires spécifiques, particulièrement bien conservés au cours de l'évolution, sont recrutés de manière séquentielle et conduisent à la nucléation et à l'expansion d'une membrane dite d'isolement. Cette membrane, en forme de croissant, est également appelée phagophore chez les mammifères (Gordon et Seglen, 1988), et son origine demeure incertaine (voir [Partie 2-II-B-6-b](#)). Elle s'allonge selon un plan de courbure particulier, pendant une étape dite d'expansion, et se referme sur elle-même autour d'une portion cytoplasmique contenant le(s) substrat(s) à dégrader. La vésicule ainsi obtenue prend

⁷ L'autophagie est cependant phylogénétiquement plus récente que le protéasome puisque contrairement à ce dernier, elle n'existe pas dans les organismes procaryotes.

le nom d'autophagosome également retrouvée sous le nom de vacuole autophagique immature (AVi)⁸. Compte-tenu de son processus de formation, l'autophagosome est pluristratifié (multimembranaire) (figure 10)⁹. Son diamètre est généralement compris entre 300 et 900 nm chez la levure et 0,5 et 1,5 µm dans les cellules de mammifères (Mizushima et al., 2002).

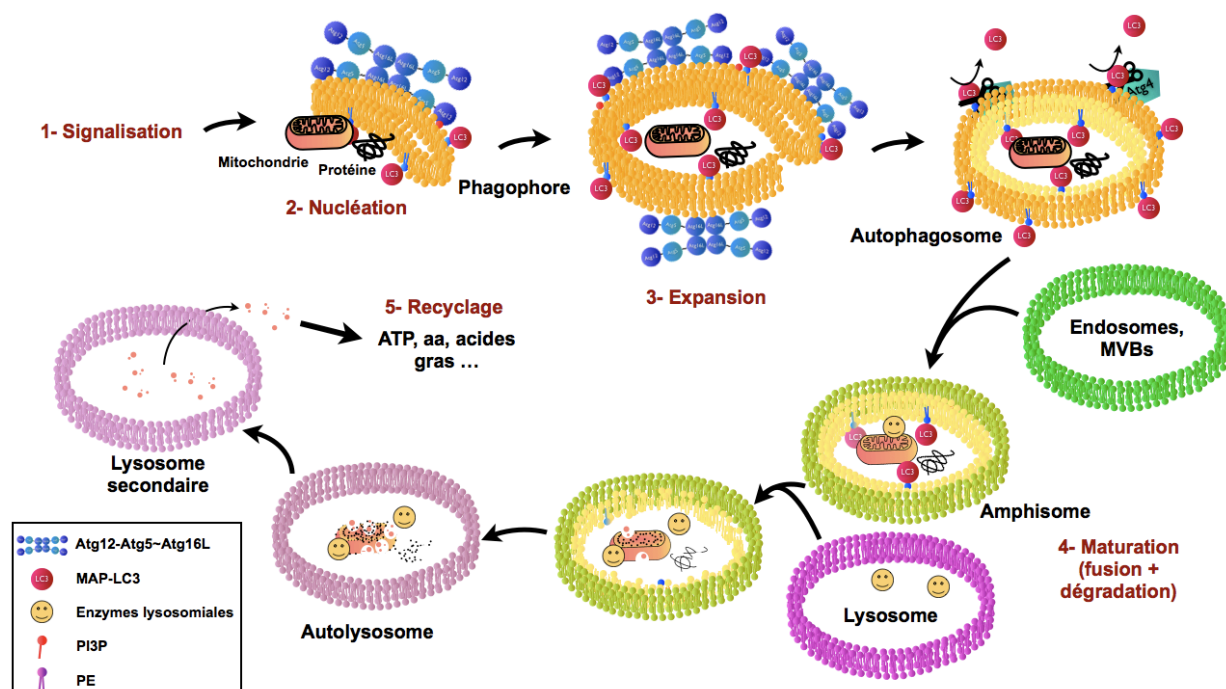


Figure 10 : Déroulement de la macroautophagie : principe général

Suite à une signalisation inductrice de l'autophagie (1-), une structure membranaire se forme dans le cytoplasme de la cellule (membrane d'isolement ou phagophore) (2-) puis s'allonge (3-) pour se refermer sur elle-même formant un organite particulier à double-membrane : l'autophagosome. Au cours de cette étape, deux processus de conjugaison de type ubiquitine interviennent permettant l'association à la membrane du complexe Atg12-Atg5-Atg16L qui se détachera dès la fermeture du phagophore, et la liaison entre la protéine LC3 et un résidu phosphatidyl-éthanolamine (PE) de la membrane autophagosomale. Après formation de l'autophagosome, la portion de LC3-II liée à la membrane externe sera retirée par un clivage catalytique dû à l'enzyme Atg4.

L'autophagosome devient mature (4-) par plusieurs étapes de fusion avec des vésicules de la voie endo/lysosomale (la fusion terminale avec le lysosome constituant une étape obligatoire). Sa lumière s'acidifie et acquiert les hydrolases acides nécessaires à la dégradation de son contenu (membrane interne et matériel séquestré). Il deviendra, à terme, un lysosome secondaire. Les produits de dégradation seront sécrétés dans le cytoplasme par des perméases et recyclés pour fournir de l'énergie sous forme d'ATP, des acides aminés et des acides gras qui pourront être réutilisés pour une synthèse de novo de constituants cellulaires (5-).

Pendant l'étape de maturation, cette vésicule fusionne avec des vésicules appartenant au compartiment endosomal (Gordon et Seglen, 1988; Gordon et al., 1992). Les vésicules autophagiques fusionnent obligatoirement avec des lysosomes afin d'acquérir le matériel nécessaire à la dégradation de son contenu (pompes à protons vacuolaires permettant l'acidification de sa lumière, hydrolases acides...). Les vésicules résultant de la fusion entre autophagosomes et

⁸ Les dénominations AVi, Avi/d et AVd sont des termes avant tout utilisés en microscopie électronique et découlant de l'aspect ultrastructural des vésicules autophagiques (Eskelinen, 2005)

⁹ Chez la levure, l'autophagosome possède toujours deux membranes et est formé en un site unique, la SPA. Chez les mammifères, l'autophagosome peut être pluristratifié et se former en diverses localisations.

endosomes prennent le nom d'amphisomes (résultat de la fusion entre autophagosome et endosomes) (Gordon et Seglen, 1988) ou AVi/d puis deviennent des autolysosomes (ou autophagolysosomes ; AVd, *degradative Autophagic Vesicle*) par fusion avec les lysosomes (Eskelinen, 2005; 2008). L'autolysosome (ou autophagolysosome) est uni-membranaire car la (les) membrane(s) interne(s) est (sont) dégradée(s) par les enzymes hydrolytiques résidentes du lysosome (Yoshimori, 2002).

La dernière étape du déroulement de l'autophagie chevauche avec l'étape de maturation du fait de l'obtention progressive du matériel enzymatique catabolique. Elle consiste en la dégradation du matériel séquestré par les enzymes hydrolytiques d'origine lysosomale ainsi que de la (des) membrane(s) interne(s) de l'autolysosome qui deviendra alors un lysosome secondaire. Les petites molécules résultant de la dégradation des substrats de l'autophagie, (aa, acides gras ...) seront relarguées dans le cytosol par l'intermédiaire de perméases et réutilisées par la cellule pour la synthèse de nouveaux constituants cellulaires ou pour produire de l'énergie.

L'autophagie est un processus relativement rapide, par exemple, la séquestration spécifique d'une mitochondrie est un événement qui se produit dans un laps de temps de l'ordre de sept minutes (Rodriguez-Enriquez et al., 2006).

II. MÉCANISMES MOLÉCULAIRES

Nous suivrons un ordre chronologique en divisant plus ou moins arbitrairement le processus autophagique en cinq étapes : une étape de signalisation, autorisant la conduite du processus ; une étape de formation d'une structure appelée omégasome et qui sert de patron pour la mise en place de la membrane autophagosomale au cours de l'étape suivante ; la nucléation et l'expansion de la membrane d'isolement ; la maturation de l'autophagosome comprenant les différentes phases de fusion avec des vésicules du système lysosomal ; et enfin la dégradation du contenu autolysosomal.

A. La signalisation autophagique

Les voies de signalisation conduisant au déclenchement de l'autophagie sont nombreuses et souvent interconnectées. Elles ont la plupart du temps un lien direct ou indirect avec la disponibilité des nutriments et d'énergie (sous forme d'ATP) disponibles. L'une des voies majeures pour la

signalisation autophagique est une voie inhibitrice dont la molécule clé chez la levure est la protéine kinase TOR (*Target of Rapamycin*) et son homologue mTOR (*mammalian Target of Rapamycin*) chez les mammifères (Noda et Ohsumi, 1998; Yoshimori, 2004). Cette protéine kinase constitue le centre névralgique des voies métaboliques et par conséquent joue le rôle de détecteur de l'état métabolique cellulaire (Cardenas et al., 1999; Jacinto et Hall, 2003). TOR est active en conditions métaboliques physiologiques et la carence en un ou plusieurs éléments nutritionnels (glucose, aa,...) conduit généralement à son inactivation. Certaines protéines signalisatrices interviennent à différents niveaux du déroulement autophagique comme c'est le cas du complexe comprenant obligatoirement les protéines Atg6/Beclin-1 (*Bcl-2-interacting protein 1*) (Aita et al., 1999) et hVPS34 (*human Vacuolar Protein Sorting 34*), une Phosphatidylinositol 3-Phosphate Kinase de classe III (PI3K(III)) (Kihara et al., 2001) auquel se rajoutent des protéines dont les fonctions seront limitées à certaines étapes du processus autophagique et conditionnent le site et la fonction du complexe (Sun et al., 2009).

1. La voie TOR/mTOR et inhibition de l'autophagie

a. Structure

La protéine TOR est une sérine/thréonine kinase appartenant à la famille protéique PIKK (*Phosphatidylinositol Kinase (PIK)-related protein Kinase*), elle-même régulée par phosphorylation. TOR possède à son extrémité amino-terminale des motifs répétés non-identiques HEAT (du nom des protéines possédant ces motifs riches en leucine : Huntingtine, Facteur d'Elongation 3, protéine phosphatase 2A et TOR), correspondant à des paires d'hélices α antiparallèles (Andrade et Bork, 1995; Andrade et al., 2001). Les motifs HEAT fonctionneraient en tant que domaines d'interaction protéine-protéine et sont regroupées en deux séries. Ils sont suivis d'un domaine FAT (FRAP, ATM, TTRAP) en position interne, puis, à l'extrémité carboxy-terminale de TOR, se trouve une séquence FRB (*FPR1-Rapamycin Binding site*) suivie par le domaine catalytique présentant des homologies avec des kinases phosphorylant des lipides (PIK, Phosphatidylinositol Kinase : PI3K et PI4K) comme tous les membres de la famille protéique PIKK (ATM, ATR...). La dernière séquence, FATC (FRAP, ATM, TRRAP C-terminal), est essentielle pour l'activité kinase, et est également commune aux autres membres de la famille PIKK, fonctionnant en tandem avec le motif FAT et indispensable pour la fonction de la protéine (Dames, 2005) (figure 11).

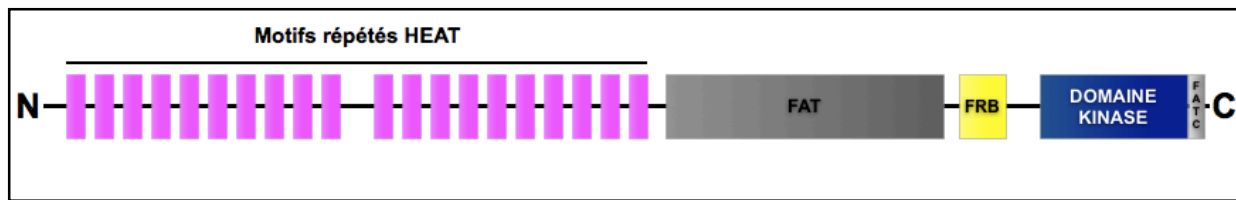


Figure 11 : Représentation schématique de la structure des protéines TOR de la levure et de l'Homme. En rose sont représentés les motifs répétés HEAT, en position amino-terminale. La partie C-terminale est typique des PIKK avec un domaine FAT suivi du domaine kinase présentant une forte homologie avec celui des lipide-kinases PI3K et PI4K et enfin le domaine FATC. Entre les domaines FAT et kinase est intercalé le domaine FRB permettant l'interaction de TOR avec le complexe inhibiteur formé par FKBP-12 et la rapamycine.

b. TOR et autophagie chez la levure

S. cerevisiae exprime deux homologues de TOR : TOR1 et TOR2 (Heitman et al., 1991). Alors que TOR1 peut prendre part dans deux complexes protéiques de signalisation TORC1 et TORC2 (*TOR Complex*) qui régulent des fonctions cellulaires distinctes, la fonction de TOR2 est restreinte au complexe TORC2 (Pattingre et al., 2008). TORC1, est sensible à un antibiotique de la famille des macrolides d'origine fongique produit par *Streptomyces hygroscopicus* découvert dans le sol de l'île de Pâques (*Rapa Nui* en langue locale) et utilisé en tant qu'immunosuppresseur : la rapamycine (ou sirolimus®) (Sehgal et al., 1975; Vézina et al., 1975), ce qui n'est pas le cas de TORC2 (Loewith et al., 2002; Jacinto et al., 2004).

Outre TOR, le complexe TORC1 comprend les protéines Tco89 (*89 kDa subunit of TOR Complexe One*), Lst8 (*Lethal with SEC thirteen 8*) et Kog1 (*Kontroller of Growth 1*) (Loewith et al., 2002). Le mécanisme d'inhibition du complexe TORC1 est bien conservé au cours de l'évolution (Cutler et al., 1999). Le complexe formé par la liaison de la rapamycine à son récepteur cellulaire, une peptidyl-prolyl isomérase, FKBP12 (*FK506-Binding Protein of 12 kDa*), se fixe à TORC1 et l'inactive mimant ainsi la réponse cellulaire à une privation nutritionnelle. L'inhibition de l'activité de TORC1 conduit à une diminution de la synthèse protéique et de la biogenèse ribosomale, au tri et au recyclage de perméases, à un changement spécifique de la transcription génique pour adapter la cellule à ce type de stress, arrêter le cycle cellulaire au niveau G1/S et faire entrer la cellule en G0 (Zaragoza et al., 1998; Cardenas et al., 1999; Jacinto et Hall, 2003) et inhiber l'autophagie (Noda et Ohsumi, 1998) (figure 12).

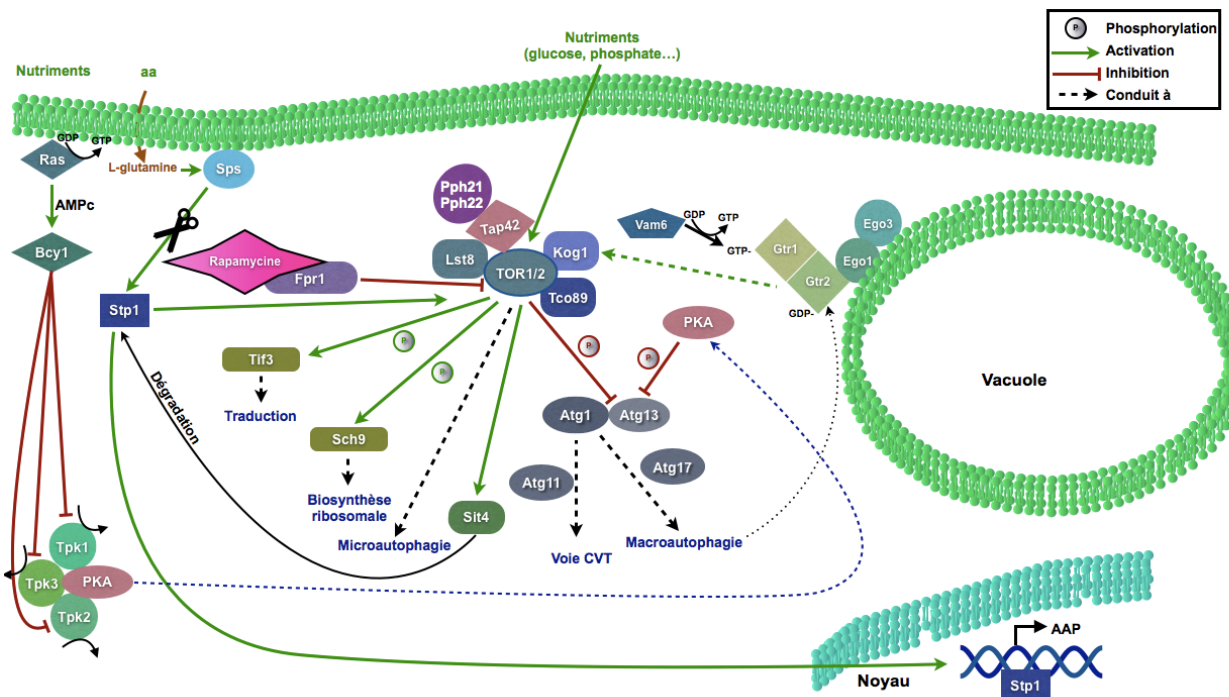


Figure 12 : Voie TORC1 chez la levure *S. cerevisiae*

Peu de données sont disponibles concernant les modalités d'induction du complexe TORC1, formé par TOR1 (ou 2), Kog1, Lst8 et Tco89, par les nutriments, à l'exception de la voie SPS. TORC1 est inhibée par le complexe formé par la rapamycine et Fpr1. L'activation de TORC1 en présence de nutriments conduit à l'activation de la traduction, de la biosynthèse ribosomale, à la conduite de la voie CVT et à l'inhibition de la macroautophagie. Suite à l'induction de cette dernière par la rapamycine, le retour à des conditions physiologiques normales dépend du fonctionnement du complexe EGO au niveau de la membrane vacuolaire. La voie Ras/PKA, également sensible à la présence de nutriments est inhibitrice de la macroautophagie et fonctionne principalement en parallèle avec TORC1 malgré l'existence de trans-régulations.

Par ailleurs, la localisation sub-cellulaire des complexes TORC est cruciale pour mener à bien leurs fonctions (Rohde et al., 2008). Il a en effet été montré que TORC1 pouvait se lier aux membranes des vacuoles de la voie sécrétoire ainsi qu'au niveau de domaines particuliers de la membrane plasmique, moduler la polymérisation de l'actine et agir sur certains acteurs de la voie endosomale (Aronova et al., 2007). TORC1 est également retrouvé dans le noyau où, en s'associant avec la région promotrice dédiée, il permet la synthèse d'ARN ribosomal 35S (Li et al., 2006).

Chez la levure, très peu de données sont disponibles quant aux voies de signalisation situées entre le signal lié aux nutriments et l'activité de TOR, néanmoins, il se pourrait que certaines catégories de nutriments puissent directement agir sur TORC1. En ce sens, la glutamine affecte l'activité de TORC1 à travers l'action d'un complexe multi-protéique situé au niveau de la membrane plasmique, le complexe SPS, constitué de trois protéines à l'origine de son nom : Ssy1, Ptr3, et Ssy5 (Shin et al., 2009). En fonction de la composition du milieu extracellulaire en aa, ce complexe agit sur la maturation par clivage protéolytique d'un facteur de transcription, Stp1 qui peut alors être transloqué dans le noyau où il induit la transcription d'un gène codant pour une

perméase spécifique des aa, AAP (*Amino Acid Permease*) (figure 12). Cette activation a lieu lorsque les cellules sont placées dans un milieu riche en aa, alors la protéine Ssy5 intervient dans le clivage d'un motif de rétention cytoplasmique situé en position amino-terminale dans la séquence de Stp1. La protéine Stp1 participe à la transmission du signal TORC1. TORC1 peut également moduler la voie SPS par l'intermédiaire de la protéine phosphatase Sit4, l'homologue de la protéine phosphatase 6, PP6, chez les mammifères et qui permet la dégradation de Stp1 en localisation nucléaire de manière indépendante du SUP.

Le complexe EGO est localisé au niveau de la membrane vacuolaire. Il est constitué par Ego1 et Ego3 associées aux petites protéines G Gtr1 et Gtr2 (homologues des protéines Rag). Ce complexe restaure l'activité de TOR après une induction de l'autophagie par une privation nutritionnelle ou suite à l'action de la rapamycine. La fusion des autophagosomes avec la vacuole cause une augmentation de la surface membranaire et du volume vacuolaire, le complexe EGO conduit donc à l'induction la microautophagie qui permet de retrouver la structure vacuolaire initiale (Dubouloz et al., 2005).

Parallèlement à la voie TORC1, chez la levure il existe une seconde voie de signalisation qui a des effets indépendants et additifs par rapport à cette dernière sur l'inhibition de l'autophagie. Il s'agit de la voie Ras/AMPC (Adénosine MonoPhosphate cyclique)/PKA (*cAMP-dependent Protein Kinase A*) également dépendante de la disponibilité des nutriments (Schmelzle et al., 2004; He et Klionsky, 2009; Mizushima, 2010). Les voies TORC1 et Ras/AMPC/PKA sont en fait interconnectées avec des effets complémentaires sur le contrôle de la croissance cellulaire et du métabolisme, néanmoins, elles agissent toutes les deux, en parallèle, sur l'autophagie.

Ras1 et Ras2, deux protéines appartenant à la famille des petites protéines G sont, en présence de nutriments, activées par un facteur d'échange GDP/GTP et activer à leur tour une adénylate cyclase et donc la production d'AMPC. Bcy1 est une protéine inhibitrice des sous-unités catalytiques de la PKA (produits de gènes à effets redondants), Tpk1, Tpk2 et Tpk3. La fixation de l'AMPC à Bcy1 entraîne sa dissociation de la PKA qui est alors activée. Parmi les substrats de la PKA figure Atg1, une des protéines essentielles pour l'initiation de l'autophagie (Budovskaya et al., 2004; 2005; Deminoff et Herman, 2007). La phosphorylation d'Atg1 par la PKA a un effet inhibiteur sur la fonction de cette protéine (He et Klionsky, 2009; Mizushima, 2010).

2. Voies d'inhibition de l'autophagie dans les cellules de mammifères

Chez les mammifères, où il n'existe qu'une forme unique de mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), l'autophagie est modulée par des signaux de différentes origines parmi lesquels, la signalisation hormonale (insuline,...), la signalisation par les facteurs de croissance et celle due à des variations des niveaux d'énergie et de nutriments (ATP, aa, glucose, oxygène...) (figure 13). mTOR est la kinase centrale, commune à toute ces voies, qui, comme chez la levure a une influence négative sur la signalisation autophagique. Cette protéine constitue le centre de commande des voies métaboliques et, en conséquence, intègre et coordonne toutes les voies en rapport avec l'état métabolique cellulaire dont la voie autophagique fait partie (figure 14).

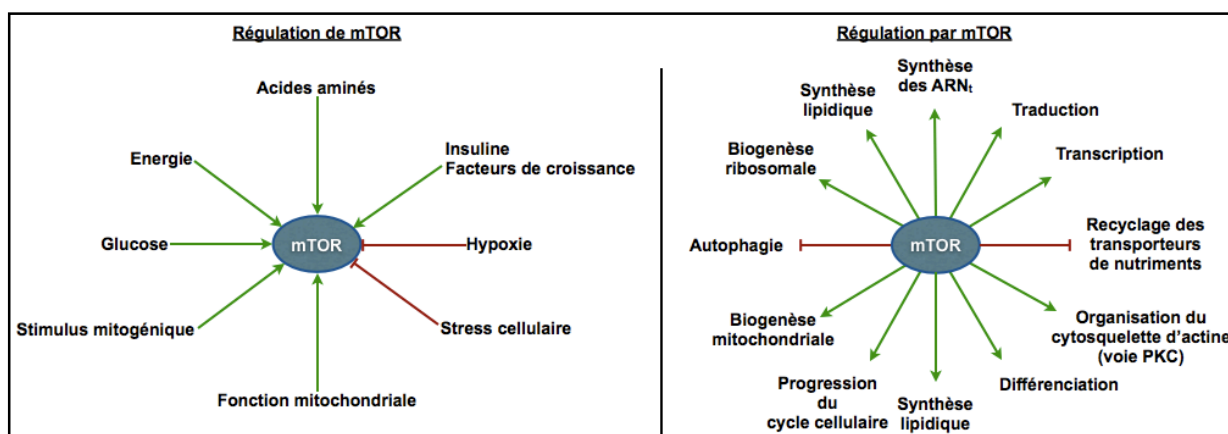


Figure 13 : Régulation de la voie mTOR : signaux de transduction et effets :

La voie mTOR est une voie de détection de l'état métabolique de la cellule lui permettant de réagir en conséquence. Ainsi, lorsque les niveaux de nutriments sont acceptables, mTOR est activée et permet l'induction des voies anaboliques et l'inhibition des processus cataboliques régulant ainsi la croissance et la taille cellulaires. A l'inverse, en conditions défavorables (stress), la signalisation mTOR est inhibée permettant ainsi l'activation des voies cataboliques. Il est à noter que la voie mTOR et celle de l'AMPK sont interdépendantes. D'une part, elles ont des effets parfaitement opposés et d'autre part, l'activation de l'une entraîne l'inhibition de l'autre.

Le complexe mTORC1, sensible à la rapamycine comprend mTOR, l'homologue mammalien de LST8, mLST8 ou GβL (*G-protein β-subunit-Like protein*), l'homologue de Kog1, Raptor (*Regulatory Associated protein of mTOR*), et deux régulateurs négatifs : PRAS40 (*Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDa*) (Sancak et al., 2007) et DEPTOR (*DEP-domain containing mTOR-interacting protein*) (Peterson et al., 2009). Ce complexe est impliqué dans la synthèse ribosomale, protéique, la régulation du cycle cellulaire, l'inhibition de l'autophagie... (figure 13) (Laplante et Sabatini, 2009).

Le complexe mTORC2, comprend GβL, mTOR, mSIN1 (*mammalian Stress-activated protein kinase-interacting protein 1*), PRR5/Protor (*Proline-Rich protein 5 / Protein Observed with Rictor*) et la protéine Rictor (*Rapamycin insensible companion of mTOR*) régule le cytosquelette d'actine et

certains aspects du métabolisme cellulaire (Jacinto et al., 2004), module la voie Akt/PKB par phosphorylation activatrice (Sarbassov et al., 2005a). Bien que considérée comme étant insensible à la rapamycine et aux nutriments, l'activité de mTORC2 est affectée par une exposition prolongée des cellules à la rapamycine (Sarbassov et al., 2006; Zeng et al., 2007).

a. Voies des récepteurs à l'insuline

mTORC1 est activée par les substrats du récepteur à l'insuline et aux facteurs de croissance conduisant, par l'intermédiaire d'une PI3K de classe I, au recrutement à la membrane plasmique et à l'activation subséquente d'Akt/PKB (Protéine Kinase B) par sa liaison au PI(3,4,5)P₃ alors produit. Cette activation peut-être inhibée par la PTEN (*Phosphatase et Tensine homologue*) (Arico et al., 2001) jouant un rôle antagoniste à celui de la PI3K(I). PI3K(I) et PTEN sont impliquées dans la sensibilité différentielle aux stress de certaines lignées cellulaires cancéreuses issues de mammifères (Homme, souris). Ainsi, dans la lignée cellulaire issue d'un astrocytome humain U87-MG, nulle pour PTEN, la voie apoptotique liée à l'activité du facteur de transcription FOXO1 n'est pas induite suite à la privation de sérum. Lorsqu'il est phosphorylé par la voie Akt, FOXO1 est séquestré dans le cytoplasme et ne peut activer la transcription de gènes inducteurs de l'apoptose (Kalaany et Sabatini, 2009).

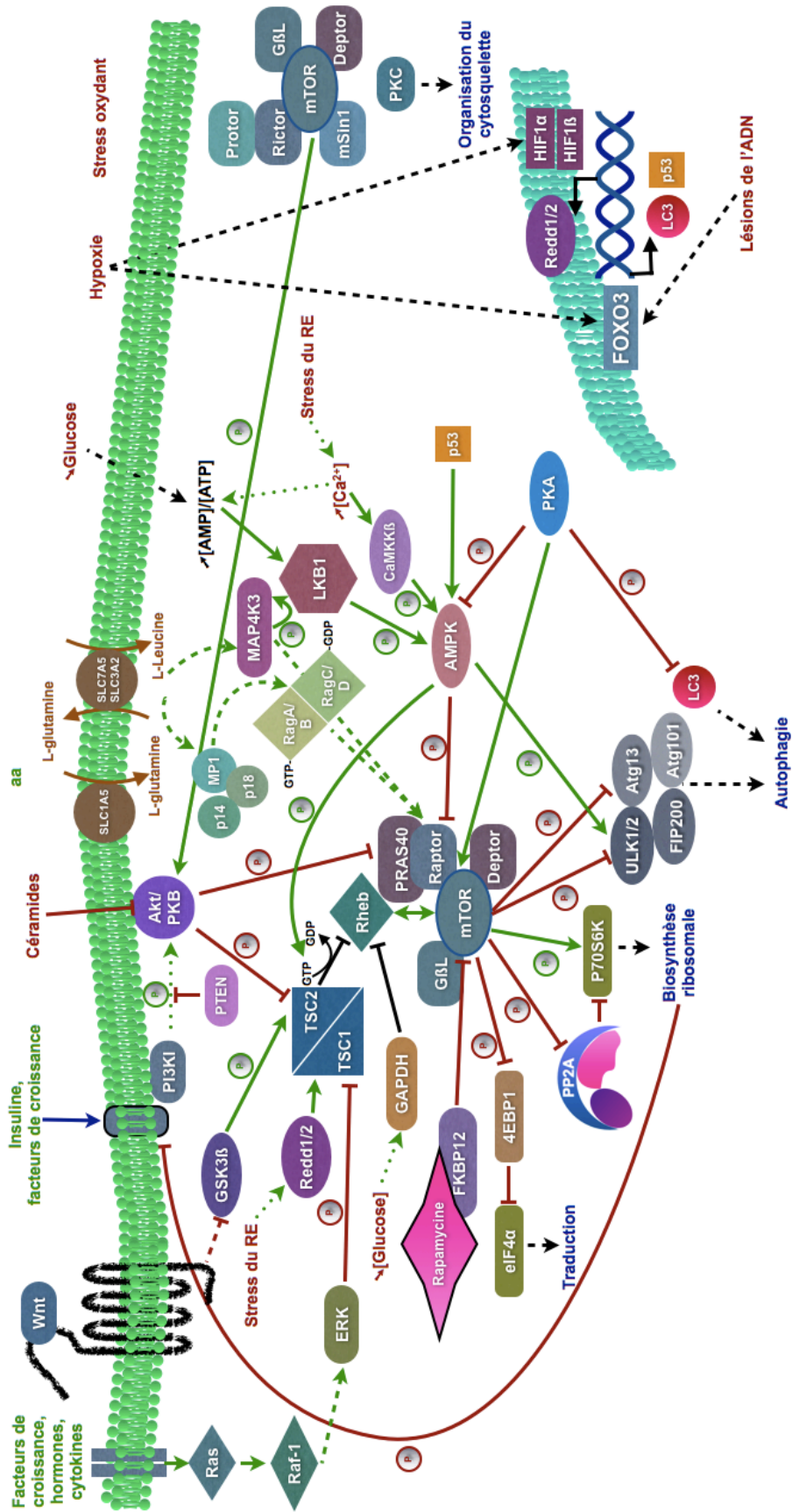


Figure 14 : Représentation des voies de signalisation impliquant mTOR. mTOR joue le rôle de détecteur de l'état métabolique cellulaire comme le reflètent les différents stimuli à l'origine de la modulation de l'activité du complexe mTORC1 dont elle est le membre cléf (voir le texte).

L'activation d'Akt provoque celle de mTOR en inhibant le complexe physique et fonctionnel formé par TSC1 (ou hamartine) et TSC2 (ou tubérine) (*Tuberous Sclerosis Factor*) en phosphorylant TSC2. TSC1/TSC2 agit comme une GAP (*GTPase Activating Protein*) pour la petite protéine G, Rheb (*Ras Homologue Enriched in Brain*), et est activé par l'hypoxie ou certains stress. Rheb liée au GTP (pouvant être activée par la présence de nutriments) régule positivement mTOR en interagissant directement avec elle (Sarbasov et al., 2005b; Inoki et Guan, 2006).

mTOR ainsi activée, inhibe l'induction du processus autophagique en phosphorylant et séquestrant le complexe formé par ULK1 (*Unc-51 (Uncoordinated-51) Like Kinase*), mAtg13 et FIP200 (*Focal adhesion kinase family Interacting Protein of 200 kDa*), homologues, respectivement, de Atg1, Atg13 et Atg17 (voir plus loin).

b. Régulation de mTOR par les acides aminés

La voie mTOR est indirectement sensible de façon stéréospécifique aux concentrations cellulaires de L-glutamine, régulées grâce à deux transporteurs : SLC1A5, de haute affinité et dépendant du sodium, permettant l'entrée de L-glutamine dans la cellule et le transporteur formé par l'hétérodimérisation de SLC7A5 avec SLC3A2 à l'origine d'un échange entre des aa essentiels (qui agissent positivement sur la voie mTORC1). La L-glutamine constitue le facteur limitant (Nicklin et al., 2009; Cohen et Hall, 2009). Cette régulation fait intervenir les petites GTPases de la famille Rag (*Ras-related GTPases*) qui interagissent directement et spécifiquement avec le complexe mTORC1 (Kim et al., 2008; Sancak et al., 2008; Sancak et Sabatini, 2009) et plus précisément avec Raptor (Sancak et al., 2008). Les protéines Rag retrouvées chez la drosophile (Rag A et RagC) et dans les cellules mammaliennes où Rag A et B d'une part et Rag C et D d'autre part sont respectivement les orthologues des protéines Gtr1 et Gtr2 de la levure. Elles présentent la particularité de fonctionner sous la forme d'hétérodimères indifféremment constitués de Rag A ou B et de Rag C ou D. Rag A/B sont actifs sous la forme liée au GTP tandis que Rag C/D le sont lorsqu'ils sont couplés au GDP, en outre le rôle de Rag A/B est dominant sur celui de Rag C/D et la liaison de ces hétérodimères à Raptor est dépendante du nucléotide lié à Rag A/B (Li et Guan, 2009). Leur interaction avec Raptor, dépendante de la liaison de Rag A ou B au GTP, n'active pas l'activité kinase de mTOR mais permet un changement de localisation sub-cellulaire du complexe mTORC1 au niveau d'un compartiment endo-membranaire positif pour Rab7 (Sancak et al., 2008). En effet, grâce à un complexe hétéro-trimérique appelé Ragulator (Régulateur des Rags et de mTORC1) et composé des petites protéines MP1, p14 et p18, dans lequel p18 constitue une plateforme d'ancrage à la membrane lysosomale (Nada et al., 2009), les dimères Rag sont associés

à la membrane lysosomale et y permettent la redistribution de mTORC1 en présence d'aa. Cette dernière donnée est confirmée par le fait qu'une altération du trafic intracellulaire par sous- ou sur-expression des petites GTPases impliquées dans ce processus provoque une absence de l'induction de mTORC1 en réponse aux aa (Flinn et al., 2010; Li et al., 2010).

La localisation de mTOR à la membrane lysosomale permettrait à ce complexe d'être activé par Rheb qui résiderait à ce niveau bien que cela ne soit pas encore clairement démontré (Sancak et al., 2010). Cette voie est parallèle à la voie de l'insuline et des facteurs de croissance (Kim et al., 2008; Sancak et al., 2008). La protéine MAP4K3, également connue sous le nom de GLK (*Germinal centre-Like Kinase*) a également été impliquée dans la régulation de mTOR par les aa et Yan et al. ont suggéré que cette action prendrait place en amont des petites GTPases Rag (Yan et al., 2010). En présence d'aa, MAP4K3 est activée par une *trans*-autophosphorylation en sérine 170, la suppression de Rag C/D bloquant cette signalisation ce qui n'exclut pas la possibilité d'un fonctionnement en deux voies parallèles (Selvaraj et Thomas, 2010). Cependant, les étapes de détection des aa conduisant à l'activation de MAP4K3 et celle située entre MAP4K3 et mTORC1 ne sont pas bien identifiées (Avruch et al., 2009; Yan et al., 2010).

La PI3K de classe III hVPS34 a été impliquée dans la voie de détection des niveaux d'aa liée au complexe mTORC1, indépendamment de son rôle dans la formation des autophagosomes, puisque sa suppression empêche l'activation de mTOR (Byfield et al., 2005; Nobukuni et al., 2005). Cette fonction de hVPS34 est dépendante du calcium et de sa liaison à la calmoduline (Gulati et al., 2008).

c. Hypoxie

L'hypoxie est un stress inducteur de l'autophagie à travers l'inhibition de mTOR par deux moyens.

HIF1 (*Hypoxia Inducible Factor 1*) est un facteur de transcription constitué de deux sous-unités : une sous-unité α , instable et dépendante des niveaux d'oxygène et une sous-unité β , plus stable et indépendante de l'oxygène. En présence d'oxygène, HIF1 α est hydroxylée, ce qui permet sa prise en charge par un complexe ubiquitine-ligase (dont la protéine VHL (Von Hippel-Lindau) est une sous-unité), son ubiquitinylation et sa dégradation par le SUP. En absence d'oxygène, HIF1 α est stable, le complexe se fixe sur les séquences promotrices de gènes comportant un élément de réponse à l'hypoxie (HRE, *Hypoxia Response Element*) et induit leur transcription. Parmi ces gènes figurent REDD1/RTP801 (*Regulated in Development and DNA Damage*) et REDD2. La protéine

REDD1 agit en amont de TSC1/TSC2 et conduit à l'inhibition de mTOR (Brugarolas et al., 2004; Reiling et Hafen, 2004). Un stress hypoxique va également engendrer l'inhibition de mTOR par l'activation de l'AMPK (**Partie 2-II-B-2-d**). REDD1 régule aussi mTOR négativement en réponse à un stress du RE ou à un stress oxydatif (Jin et al., 2009). En outre, une autre étude montre qu'il existerait une troisième voie liant l'hypoxie à l'inhibition de mTOR, indépendante à la fois de HIF1 et de l'AMPK (Arsham et al., 2003).

Les voies mTOR et AMPK sont exactement opposées dans la signalisation métabolique. Alors que l'une est active en présence de nutriments, l'autre est stimulée par leur absence. Ainsi, la diminution du niveau d'ATP disponible, l'absence de nutriments et l'hypoxie conduisent à l'activation de l'AMPK qui, en retour, va directement inhiber mTOR. Cependant, il existe des moyens directs d'inhiber mTOR en absence de nutriments sans passer par l'AMPK comme dans le cas de l'hypoxie. C'est également le cas, par exemple de la privation en glucose. En effet, Lee et al., ont proposé qu'un faible influx de glucose provoquerait l'inhibition de Rheb et donc de mTOR (indépendamment de TSC1/TSC2) par la GAPDH (Glycéraldéhyde-3-Phosphate Deshydrogénase) (Lee et al., 2009). En fait, cette seconde voie serait le reflet de la concentration cellulaire en glucose¹⁰ (en tant que molécule) alors que l'activation de l'AMPK suite à une privation glucidique serait plus en rapport avec le statut énergétique de la cellule puisqu'une telle privation induit la réduction du rapport [AMP]/[ATP] (Jung et al., 2010).

d. Voie de l'AMPK et modulation de la voie mTOR

L'AMPK est une sérine/thréonine kinase sensible aux niveaux d'AMP et d'ATP cellulaires. Cette enzyme est constituée de trois sous-unités : une sous-unité catalytique α et deux sous-unités régulatrices β et γ . Lorsque les rapports [AMP]/[ATP] ou [ADP]/[ATP] augmentent, l'AMPK est activée par phosphorylation de la sous-unité α au niveau du résidu thréonine 172 par le biais du complexe LKB1/STRAD/Mo-25 (*Liver Kinase B1*) (Shaw et al., 2004). Elle agit en tant que point de contrôle métabolique de la cellule, arrêtant la croissance cellulaire et supprimant les processus biosynthétiques consommateurs d'énergie sous forme d'ATP si la quantité d'énergie disponible n'est pas suffisante (Shaw, 2009).

En réponse à une hypoxie ou à une privation nutritionnelle, l'AMPK, activée par LKB1, agit directement négativement sur la voie mTOR de deux manières distinctes (**figure 15**) :

¹⁰ GAPDH sous forme non liée au glycéraldéhyde-3-phosphate (en cas d'absence de glucose) est un partenaire de liaison de Rheb, la formation de ce complexe étant inhibitrice pour la fonction de mTORC1.

- elle active le complexe TSC1/TSC2 par phosphorylation de TSC2. Ce complexe alors actif stimule l'échange du GTP lié à Rheb par du GDP levant par conséquent l'activation de mTORC1 ;

- en phosphorylant négativement Raptor, composant du complexe mTORC1.

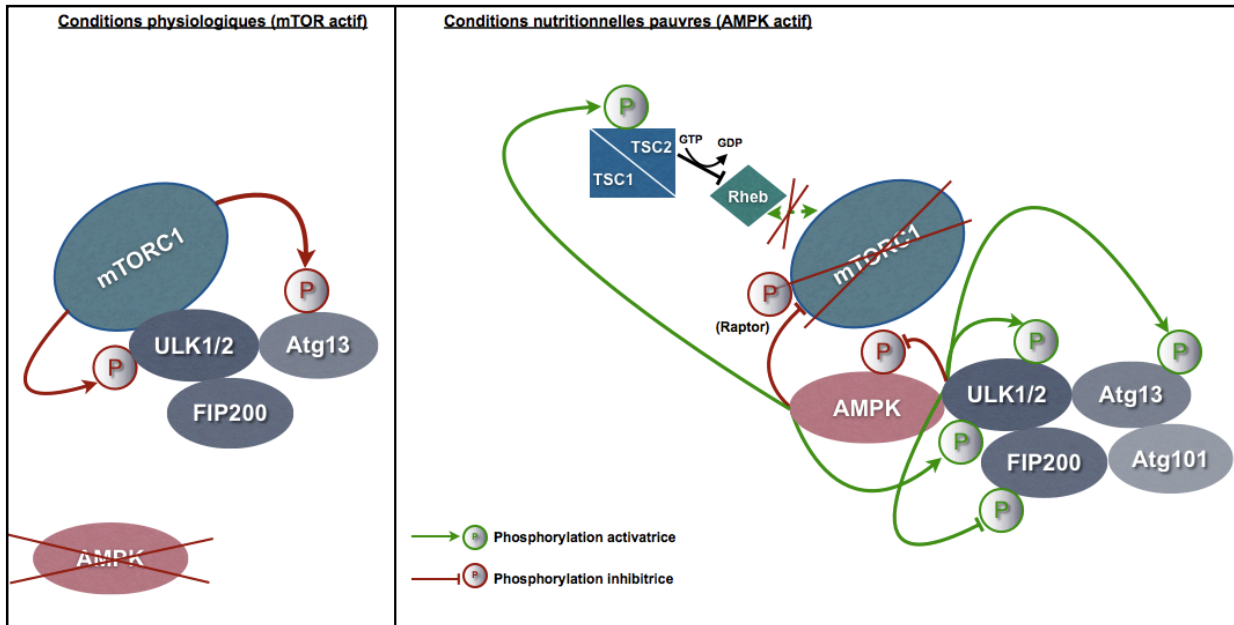


Figure 15 : Régulation de ULK1, complexe initiateur de l'autophagie, par mTOR et l'AMPK

En conditions riches en nutriments, mTORC1, actif, phosphoryle et séquestre le complexe ULK1-FIP200-Atg13-Atg101 (formé indépendamment de l'activité de mTOR). Lorsque la cellule est carencée, AMPK est alors activée, conduisant à l'inhibition de mTORC1 par phosphorylation de TSC2 et de Raptor. L'AMPK va aussi s'associer à ULK1 et la phosphoryler. ULK1 est une sérine/thréonine kinase qui, active, s'auto-phosphoryle et agit également sur les autres membres du complexe initiateur de l'autophagie Atg13 et FIP200 ainsi que l'AMPK (rétrocontrôle négatif).

L'AMPK a une action positive sur l'autophagie (Meley et al., 2006), non seulement par inhibition de la voie mTOR mais en agissant également directement sur la protéine initiateur ULK1 (Lee et al., 2010) et en la phosphorylant (Egan et al., 2011a; b; Kim et al., 2011; Shang et al., 2011; Shang et Wang, 2011). En présence de nutriments, mTORC1 phosphoryle et séquestre le complexe ULK1-mAtg13-FIP200 d'une part, et empêche l'interaction de ULK1 avec l'AMPK d'autre part. L'activation de l'AMPK en conditions nutritionnelles pauvres va à l'inverse conduire à l'activation du complexe ULK1-mAtg13-FIP200 et à l'inhibition de mTORC1 (Zhao et Klionsky, 2011) (figure 15). En dépit de ce consensus, il demeure des points de divergence notamment au sujet de l'identité des sites de phosphorylation au niveau de ULK1 et sur le déroulement séquentiel des événements (Hardie, 2011; Roach, 2011). En retour, il existerait une boucle de régulation directe exercée par ULK1 qui a la capacité de phosphoryler les trois sous-unités α , β , et γ de l'AMPK et ainsi moduler négativement son activité. Cependant, le contexte de cette rétroaction n'est pas encore élucidé étant donné que ces phosphorylations peuvent avoir lieu indépendamment de l'association de ULK1 en complexe avec mAtg13, et FIP200 (Löffler et al., 2011).

L'activité de l'AMPK n'est pas modulée par les concentrations en aa, il reste donc à savoir comment réagit ce système en cas de carence en aa. Kim et al., ont proposé que cette action de l'AMPK à la fois sur mTORC1 et sur l'autophagie puisse constituer un niveau de régulation supplémentaire, un peu à la manière d'un potentiomètre en permettant d'intégrer les différents signaux liés à la présence de différents nutriments (aa, glucose) (Kim et al., 2011). Ceci est en concordance avec des données concernant l'effet de l'AMPK sur la dégradation protéasomique en fonction des conditions de disponibilité énergétique (Viana et al., 2008).

En outre, il a été montré, dans des cultures primaires d'hépatocytes, dans des cultures de MEFs et chez *C. elegans* que l'activité de l'AMPK était aussi indispensable que Unc-51/ULK1 pour la mitophagie puisqu'en absence de l'expression de l'une ou de l'autre de ces protéines, on assiste à l'accumulation de p62, une protéine adaptatrice de l'autophagie (Bjørkøy et al., 2005), et de mitochondries (Egan et al., 2011b). Malheureusement, cette étude n'apporte pas d'information sur les niveaux globaux d'activité autophagique et donc ne permet pas d'affirmer s'ils sont affectés ou non par la perte de l'expression de l'AMPK. En revanche, le fait que la mitophagie soit dépendante de l'activité de l'AMPK sous-entend que l'AMPK joue un rôle dans l'autophagie basale et que dans ce cas, l'activité autophagique constitutive pourrait résulter de la balance entre l'activité de deux voies antagonistes, celle de l'AMPK et celle de mTORC1.

e. Influence de la voie des MAPK sur l'autophagie

Cette voie est impliquée dans la régulation de l'autophagie par le biais, d'une part des protéines ERK1 et ERK2 (*Extracellular signal-Regulated protein Kinase*), et d'autre part au travers d'une voie impliquant la protéine p38^{MAPK} (Botti et al., 2006; Corcelle et al., 2007).

Suite au couplage de Ras au GTP (modulé par la disponibilité en aa) activant Raf-1 puis MEK et enfin ERK, il y a stimulation de la protéine GAIP (*Gai activating protein*, appartenant à la famille des RGS : *Regulators of G-protein signaling*) par phosphorylation de sa sérine 151 agissant ainsi contre l'effet inhibiteur de l'autophagie de la protéine G trimérique α_3 couplée au GTP par hydrolyse du GTP en GDP (Ogier-Denis et al., 2000; Pattingre et al., 2003; Ellington et al., 2006). A l'opposé, en présence d'aa dans les cellules de la lignée tumorale humaine HT-29 (cancer du colon), les ERK inhibent le complexe TSC1/TSC2 par phosphorylation et par conséquent stimuler la voie mTOR (Ogier-Denis et al., 1995). Dans ce cas la voie de signalisation ne passe pas par Raf-1, mais par une interconnection entre la PI3K(I) et Ras (Ogier-Denis et al., 2000; Pattingre et al., 2003).

La voie de la p38^{MAPK} est activée par l'insuline ainsi qu'en réponse à un choc osmotique dans les hépatocytes de rats, cela conduisant au final à une inhibition de la dégradation protéique par autophagie au niveau d'une étape impliquant les microtubules (Dahl et al., 2001; 2003; Schliess et al., 2004). Cette voie est également activée par la protéine Src, *via* la modulation positive d'intégrines, sensibles à un gonflement osmotique lié au transport dépendant du sodium de certains aa comme la glutamine (Schliess et al., 2004). A l'inverse, dans des modèles cellulaires et animaux de la maladie d'Alexander, une leucodystrophie causée par une mutation de la GFAP (Orphanet n°58, OMIM n°203450), l'accumulation de GFAP mutante conduit à l'activation de la p38^{MAPK} par la protéine MLK3 (*Mixed-Lineage Protein Kinase 3*), à l'inhibition de la voie mTOR et à l'autophagie (Tang et al., 2008a; b). Les voies MAPK/p38^{MAPK} ont en effet été impliquées dans l'inhibition de la maturation autophagique dans des cellules cancéreuses (Corcelle et al., 2007).

f. Régulation de l'autophagie par le calcium

L'augmentation de la concentration calcique intracytoplasmique constitue un signal inducteur de l'autophagie (Høyer-Hansen et al., 2007; Grotemeier et al., 2010). Cette action passerait par l'activation de la CaMKK β (*Calmodulin-dependent Kinase Kinase β*) qui va directement phosphoryler l'AMPK (Høyer-Hansen et al., 2007; Høyer-Hansen et Jäättelä, 2007). Cependant, il a également été montré que la voie mTOR pouvait être directement affectée par l'augmentation de calcium cytosolique indépendamment de l'AMPK (Grotemeier et al., 2010) et que cette inactivation, bien que partielle était suffisante pour induire l'autophagie. Les signaux calciques cytoplasmiques ne sont pas les seuls à même d'influencer l'induction de l'autophagie. En effet, une diminution des concentrations calciques mitochondriales due à une diminution du transfert des ions Ca²⁺ depuis le RE diminue la production d'ATP et provoque donc l'activation de l'AMPK et l'induction de l'autophagie (Decuypere et al., 2010). Les calpaïnes, des protéases à cystéines cytoplasmiques dépendantes du calcium sont nécessaires pour la conduite de l'autophagie (Demarchi et al., 2006; 2007) et constitueraient donc un mode de régulation de l'autophagie dépendant du calcium.

Une étude réalisée en 2008 montre que l'induction de l'autophagie provoquait une accumulation de Ca²⁺ dans les compartiments autophagiques et que celle-ci favorisait les processus de fusion des autophagosomes et des amphisomes avec les MVBs et avec les lysosomes (Fader et al., 2008) impliquant la signalisation calcique dans des processus en aval de la signalisation autophagique.

Le lithium, un inhibiteur de la GSK3 β (*Glycogen-Synthetase Kinase 3 β*), induit l'autophagie par une voie indépendante de la GSK3 β , en inhibant l'inositol monophosphatase (Sarkar et al., 2005; Sarkar et Rubinsztein, 2006). Cette enzyme est responsable de l'hydrolyse de l'inositol monophosphate en inositol libre, requis pour la voie de signalisation du phosphoinositol. Ainsi, l'action du lithium conduit à la diminution des niveaux de myo-inositol-1,4,5-triphosphate (IP3), ce qui est permissif pour la conduite de l'autophagie. En effet, lorsque des cellules sont exposées à l'IP3 alors, l'activité autophagique est réduite (Sarkar et al., 2005; Sarkar et Rubinsztein, 2006). Le récepteur à l'IP3 est un complexe protéique membranaire fonctionnant en tant que canal calcique, permettant la mobilisation des ions Ca²⁺ vers le cytoplasme depuis le RE principalement. Il est impliqué dans le contrôle de l'apoptose et interagit avec quelques protéines actrices de cette voie comme Bcl-2, Bcl XL, le cytochrome c ou encore Akt. La fonction canal de ce récepteur est requise pour la suppression de l'autophagie, mais les flux d'ions calciques résultant de son fonctionnement ne semblent pas jouer de rôle dans la régulation de l'autophagie (Khan et Joseph, 2010). Sous forme active, le récepteur à l'IP3 forme un complexe avec Bcl-2 et Beclin-1 (cf **Partie2-II-B-4**). A ce niveau intervient une petite protéine intégrale (15 kDa) de la membrane du RE : NAF-1 (*Nutrient-deprivation Autophagy Factor-1*) qui fonctionne en tant que co-facteur de Bcl-2 et est nécessaire pour l'association inhibitrice de l'autophagie existant entre Bcl-2 et Beclin-1 (Chang et al., 2010). Les antagonistes de l'IP3R comme la xestospongine B provoquent la dissociation de Beclin-1 du complexe IP3R et peut ainsi se lier à hVPS34 (Criollo et al., 2007; Vicencio et al., 2009).

L'autophagie peut donc être induite par des substances telles que le lithium (Sarkar et al., 2005; Sarkar et Rubinsztein, 2006) et le tréhalose (Sarkar et al., 2008; Sarkar et Rubinsztein, 2008) de façon indépendante de mTOR.

g. p53, un agent double dans la régulation autophagique

Des données contradictoires ont été rapportées concernant l'implication de p53 dans l'autophagie. Certains travaux ont montré un effet inducteur et d'autres un effet répresseur de p53 sur l'autophagie (Levine et Abrams, 2008). Des études récentes ont permis d'expliquer en partie cette apparente contradiction : p53 joue un rôle double et ce, en fonction de sa position dans la cellule. Dans le noyau, p53 permettrait, de par son rôle de facteur de transcription, l'expression de gènes impliqués dans l'autophagie alors que p53 cytoplasmique serait un puissant inhibiteur de cette voie catabolique. Ainsi, des travaux de mutations conditionnelles ont permis de confirmer cette théorie (Tasdemir et al., 2008a; b). p53 régulerait aussi l'autophagie indirectement en agissant sur la transcription d'un gène codant une protéine lysosomale : DRAM (*Damage-Related*

Autophagy Modulator) suite à des lésions de l'ADN (Criollo et al., 2009; Eisenberg-Lerner et al., 2009; Lorin et al., 2010).

mTOR agirait en tant que régulateur négatif de p73 (une protéine proche de p53) alors que p53 peut agir en amont de cette kinase en activant l'AMPK (Rosenbluth et Pietsenpol, 2009). En outre, alors que p53 agit différemment sur l'autophagie selon le contexte cellulaire et sa localisation, il apparaît que p73 agirait positivement sur l'autophagie peut-être par le biais d'une activité nucléaire et ce, indépendamment d'une action sur la protéine DRAM (O'Prey et al., 2009). Des analyses de « signature de gènes » mettent en avant le fait que p73 puisse réguler l'expression de gènes dont les produits jouent un rôle direct dans l'autophagie tels que ATG5, ATG7 et UVRAG (Rosenbluth et al., 2008). Enfin, l'abolition de l'expression de p73 (par shRNA) induit une augmentation de l'expression de UVRAG.

3. TORC1 et phosphatases

a. TORC1, Tap42 et phosphatases chez la levure

TORC1 agit sur différentes fonctions cellulaires et donc représente un carrefour d'où partent, en parallèle, plusieurs voies de signalisation. Chez la levure, la voie dépendante de TORC1 régulant l'autophagie fait intervenir des protéines phosphatases de type 2A, Pph21/Pph22, des protéines phosphatases proches de la PP2A (proche de PP4 chez les métazoaires), Sit4 et leurs régulateurs Tap42 et Rrd1 (Di Como et Arndt, 1996) ainsi que le modulateur de Tap42, Tip41 (*Tap42-Interacting Protein of 41 kDa*) (Jacinto et al., 2001). Les relations entre TOR et ces phosphatases n'est pas à sens unique et ne va pas avoir les mêmes effets selon les substrats situés en aval des phosphatases et les phosphatases elles-mêmes.

D'après le modèle proposé par Yan et al. en 2006 (figure 16), lorsque TORC1, situé au niveau membranaire est actif, Tap42 lui est associée sous forme phosphorylée (la liaison de Tap42 à TORC1 serait un pré-requis pour sa phosphorylation) et les protéines phosphatases régulées par Tap42 seraient alliées à ce complexe (Yan et al., 2006). Suite à l'inhibition de TORC1 par la rapamycine ou par la privation de nutriments, les complexes Tap42-phosphatases se dissocient de TORC1, ceci ayant pour conséquence l'activation de ces phosphatases. Tap42 serait alors déphosphorylée par l'action de la PP2A provoquant en retour la dissociation de Tap42 et des phosphatases associées qui seraient alors inactivées (Di Como et Jiang, 2006; Yan et al., 2006). Avant cette date, Tap42 était considérée comme ayant un rôle négatif sur l'activité des phosphatases

et son antagoniste, Tip41 un rôle activateur et amplificateur (Jacinto et al., 2001). Ce modèle présente l'avantage d'expliquer les effets rapides de l'inhibition de TORC1 par la rapamycine.

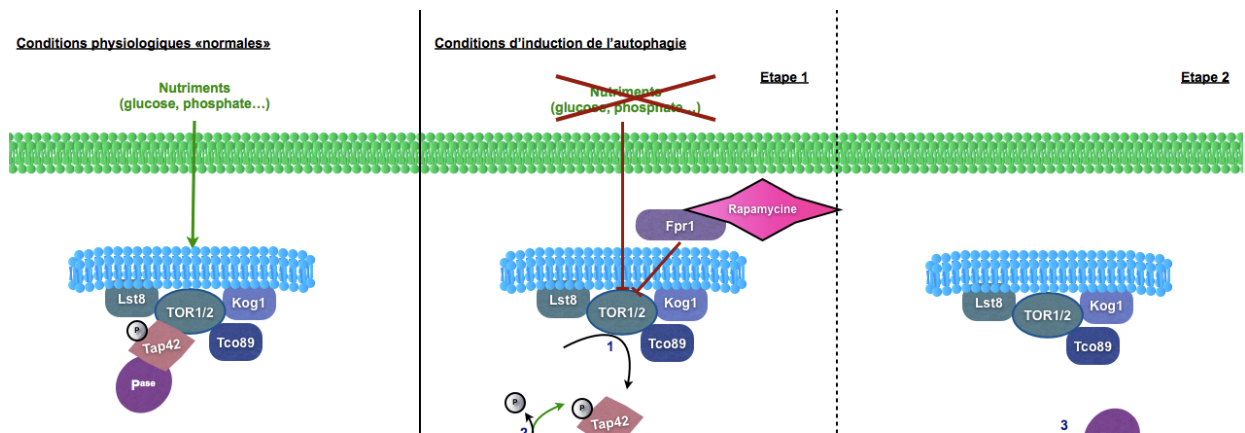


Figure 16 : Régulation des phosphatases par TORC1 et Tap42 chez la levure
 Le complexe TORC1, en position membranaire est actif en présence de nutriments (panel de gauche). Il interagit directement avec Tap42, complexée avec une phosphatase (Pase, Pph21/22 ou Sit4) et la phosphoryle. Les phosphatases sont ainsi inactives. En cas de carence en azote (2ème panel, étape 1) ou suite à l'action de la rapamycine, TORC1 est inactivée provoquant le détachement du complexe phospho-Tap42-phosphatase (1). Il en résulte l'activation des phosphatases qui à leur tour déphosphorylent Tap42 (2) ce qui entraîne la dissociation et la désactivation du complexe Tap42- phosphatases (3, 2ème panel, étape 2). D'après Yan et al., 2006, DiComo et al., 2006.

Chez la levure, l'autophagie est inactivée lorsque PP2A est active mais les substrats impliqués ne sont pas identifiés. Cette action serait spécifique de la PP2A (Pph21 et Pph22), et dépendante de Tap42 puisque l'inactivation de cette protéine induit l'autophagie. De plus Sit4, n'aurait aucun effet à ce niveau, bien qu'une étude précédente montre qu'en absence de Sit4, le niveau d'activité autophagique induite par la rapamycine est diminué de 45% (Schmelzle et al., 2004). Par ailleurs, Tip41, le modulateur de Tap42 antagoniserait l'effet de cette dernière (Yorimitsu et al., 2009). Cependant, il s'agit d'un modèle utilisant des souches cellulaires où les gènes d'intérêt sont délétés. Le rôle des phosphatases présenté ici nécessite d'être clarifié puisque selon le modèle présenté plus haut, la régulation des phosphatases par Tap42 est temporelle.

b. Interconnexions entre mTORC1, PP2A et PP6

Dans les cellules de mammifères, la modulation des protéines phosphatases par mTORC1 est conservée mais les types de modulation (positive ou négative) peuvent différer.

Les protéines Pph21 et Pph22 sont des homologues de la sous unité catalytique de la PP2A mammalienne, PP2AC. Sit4 est l'homologue de la protéine phosphatase 6, PP6 et l'homologue de Tap42 est $\alpha 4$, une protéine régulatrice capable de se lier à PP2AC et à PP6.

i. Structure et fonction de la PP2A

Chez les mammifères, PP2A est la sérine/thréonine phosphatase majoritaire dans la plupart des types cellulaires. Sa sous-unité catalytique C (PP2AC) représente à elle seule près 1% des protéines totales du tissu cérébral (Liu et al., 2005). PP2A est une holoenzyme hétérotrimérique conservée, formée par l'association d'une sous-unité régulatrice A, ou PR65 (*Phosphatase Regulatory subunit of 65 kDa*), (coordonnant l'assemblage des autres sous-unités), et d'une sous-unité catalytique C (36 kDa ; A et C forment un premier dimère) associées à une sous-unité structurale B (Kremmer et al., 1997; Westermarck et Hahn, 2008) (forme « ABC »). PP2AC appartient à la famille PPP (*Phosphoprotein Phosphatases*) qui comprend également PP4 et PP6 avec lesquelles elle présente des homologies de séquence. Les sous-unités A et C sont chacune codées par deux gènes très proches (PP2A A α et A β et PP2AC α et PP2AC β) et ont donc chacune deux isoformes (Hemmings et al., 1990; Zhou et al., 2003). Concernant la sous-unité B, quatre familles composées de deux à quatre gènes ont été identifiées jusqu'à présent : B/PR55/PPP2R2, B'/PR61/PPP2R5, B''/PR72/PPP2R3 et B'''/PR93/PR110 présentant plusieurs variants obtenus par épissage alternatif (Janssens et al., 2008) (tableau 2).

Sous-unités	Protéines	Variants
A	PP2A-A/PR65/PPP2R1	α, β
C	PP2AC/PPP2C	α, β
B	B/B55/PR55/PPP2R2	$\alpha, \beta, \gamma, \delta$
	B'/B56/PR61/PPP2R5	$\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$
	B''/PR72/PPP2R3	PR48, PR59, PR72, PR130
	B'''	PR93/SG2NA, P110/Striatine

Tableau 1: Sous-unités constitutives de la PP2A

B''/PR72/PPP2R3 et B'''/

PR93/PR110 présentant plusieurs variants obtenus par épissage alternatif (Janssens et al., 2008) (tableau 2).

Les sous-unités B régulent la localisation de la PP2A et sa spécificité de substrat¹¹ (Eichhorn et al., 2009). La sous-unité A, en forme de croissant, contient quinze répétitions HEAT (Groves et al., 1999) permettant son interaction avec les sous-unités B et C (répétitions HEAT carboxy-terminales) (Ruediger et al., 1992; 1999; Strack et al., 2002; Westermarck et Hahn, 2008). PR65 régule la composition de l'hétérotrimère PP2A alors que des modifications post-traductionnelles au niveau de la sous-unité catalytique modulent l'assemblage du complexe (Longin et al., 2007).

Ainsi, il existe une grande variété de combinaisons possibles avec des fonctions, des localisations et des substrats spécifiques. En outre, il existe une forme alternative de la PP2A consistant en l'association de la sous-unité catalytique avec $\alpha 4$, l'homologue mammalien de Tap42

¹¹ Il existe des protéines additionnelles pouvant remplacer la sous-unité B

(Chen et al., 1998; Inui et al., 1998; Nanahoshi et al., 1998; Prickett et Brautigan, 2006). Cette forme atypique de la PP2A présente une activité enzymatique différente de la forme « classique » avec par exemple aucun effet sur P70S6K et 4E-BP1 contrairement à la forme ABC (effet spécifique du substrat ; Nanahoshi et al., 1998). Un homologue de Tip41 a également été identifié simultanément par deux équipes. TIPRL (*Tor signaling Pathway Regulator-Like*) peut se lier, indépendamment de $\alpha 4$ à la sous-unité catalytique de la PP2A mais aussi à celles de PP4 et de PP6, TIPRL jouant un rôle de régulateur négatif de l'activité phosphatase de la PP2AC (McConnell et al., 2007, Smetana et Zanchin, 2007).

L'activité de la PP2A est régulée par des modifications post-traductionnelles de type phosphorylation (Y304 et Y307) et par carboxyméthylation (Leu 309). Ainsi, la phosphorylation en Tyr307 inhibe l'activité phosphatase de la PP2A (Longin et al., 2007; Perrotti et Neviani, 2008) et contrôle négativement l'association de la PP2A avec les sous-unités régulatrices B'/PR61 et B/PR55. La carboxyméthylation, catalysée par LCMT (Leucine Carboxylméthyltransférase 1) ; (De Baere et al., 1999) inversée par l'action de la PME-1 (Phosphatase Méthylestérase-1 ; Lee et al., 1996) est quant à elle requise pour l'activité de la protéine. La double modification (phosphorylation en Tyr307 - méthylation en Leu309) est requise pour la formation du complexe PP2AC/ $\alpha 4$ (Virshup et Shenolikar, 2009).

Outre les modifications post-traductionnelles, PP2A peut être physiologiquement inactivée par des protéines inhibitrices endogènes I1PP2A/PHAP-1 (*Putative Histocompatibility leukocyte antigen class II-Associated protein*)/Mapmoduline et I2PP2A/PHAP-II/SET/TAF-1 β (*Template Activating Factor 1 β*) par association non-compétitive à l'extrémité amino-terminale de la PP2AC (Millward et al., 1999; Tanimukai et al., 2004; Chen et al., 2008).

ii. Régulation de la PP2A par la voie mTOR

Plusieurs études montrent que l'activité de la PP2A, chez les mammifères, est sous la dépendance de la voie mTOR (Peterson et al., 1999; Janssens et Goris, 2001; Hartley et Cooper, 2002; Bishop et al., 2006; Meske et al., 2008; Park et al., 2008). La rapamycine, inhibiteur de mTOR, induit une augmentation de l'activité de la PP2A (Hartley et Cooper, 2002; Meske et al., 2008) et PP2A peut être directement phosphorylée par mTOR *in vitro* (Peterson et al., 1999). p70S6K et 4E-BP1 font partie des substrats de la PP2A (Peterson et al., 1999; Hartley et Cooper, 2002; Cho et al., 2006). Aussi, certains auteurs suggèrent que l'action de mTOR sur P70S6K puisse être aussi indirecte à travers l'inhibition de la PP2A (Peterson et al., 1999; Gingras et al., 1998;

Hartley et Cooper, 2002; Beevers et al., 2009). L'inhibition de la PP2A par mTOR permettrait un rétrocontrôle sur d'autres voies comme la voie des MAPKs (Harwood et al., 2008).

En absence d'aa, une forme spécifique de la PP2A contenant la sous-unité régulatrice PR61 ϵ (B') déphosphoryle le site régulateur de la protéine MAP4K3 empêchant l'activation de mTORC1 qui s'ensuit (Yan et al., 2010). Ce cas particulier montre qu'il est possible que PP2A agisse en amont de mTOR. PP2A a été impliquée dans la modulation de la voie Ras-Raf-1-MEK ERK1/2 par les aa (Pattingre et al., 2003) conférant une action pro-autophagique à cette enzyme. L'action pro-autophagique de la PP2A a également été mise en évidence dans des hépatocytes de rats où l'autophagie est supprimée par des inhibiteurs de la PP2A (acide okadaïque, calyculine A ; Holen et al., 1992; 1993; Gordon et al., 1993; 1995) bien que le mode d'action de cette phosphatase ne soit pas élucidé. Il a été suggéré que cet effet puisse être lié aux interactions existantes entre PP2A et le cytosquelette (Gordon et al., 1993; Blankson et al., 1995). Cependant, une autre étude tend à montrer que l'acide okadaïque puisse moduler positivement l'autophagie dans des cellules neuronales (Yoon et al., 2008).

B. Déroulement : de la formation du phagophore à la dégradation du substrat

1. Autophagie chez la levure

i. Complexe Atg1-Atg13-Atg17 et initiation de l'autophagie

Une des premières protéines ayant un rôle dans le déclenchement de l'autophagie est la protéine Atg13 (figure 17). Cette phosphoprotéine est un substrat direct de TOR en conditions nutritionnelles « normales ». L'état de phosphorylation d'Atg13 joue sur son affinité pour la protéine Atg1, une sérine/thréonine kinase qui est pratiquement inactive lorsqu'elle est dissociée d'Atg13 (Kamada et al., 2010; Kamada, 2010). Lors d'une privation nutritionnelle, Atg13 est rapidement déphosphorylée, ce qui entraîne la formation d'un complexe Atg1-Atg13 et l'activation de Atg1 (Kamada et al., 2010; Kamada, 2010). Une troisième protéine, Atg17 est impliquée à ce stade et ce, uniquement en conditions nutritionnelles pauvres.

La protéine Atg1 possède deux fonctions distinctes (Sekito et al., 2009; Mizushima, 2010) : elle joue un rôle primordial dans l'organisation de la SPA d'une part en recrutant les autres protéines

Atg à ce niveau et ceci indépendamment de son activité kinase. Enfin, elle intervient dans la formation autophagosomale grâce à son activité de protéine kinase et régulerait ainsi la dynamique du recrutement de protéines telles que Atg9.

Le complexe Atg1-Atg13 peut d'interagir avec d'autres protéines autophagiques : Vac8 (voie CVT), Atg11, Atg17, Atg20, Atg24, Atg29, et Atg31 (Kabeya et al., 2000; 2005; Kawamata et al., 2008; Sekito et al., 2009). Atg13 permet l'association entre Atg1 et Atg17. L'absence d'Atg17 compromet presque l'ensemble des événements autophagiques élevant Atg17 au rang de protéine située à la base de la machinerie autophagique (Suzuki et Ohsumi, 2007). L'association d'Atg13 à Atg17, est également dépendante de l'état de phosphorylation d'Atg13 (Yang et Klionsky, 2010; 2010).

Un complexe ternaire Atg17-Atg29-Atg31 existe en conditions nutritionnelles normales et son recrutement au niveau de la SPA pour former un complexe pentamérique avec Atg1-Atg13 a lieu suite à l'induction de l'autophagie (Kabeya et al., 2009; Mizushima, 2010) indépendamment de l'activité kinase d'Atg1.

Les complexes Atg1-Atg13 d'une part et Atg17-Atg29-Atg31 d'autre part sont tous deux indispensables pour la mise en place de la SPA. Atg17 est nécessaire au recrutement de protéines à la SPA de même que Atg11 l'est, en conditions d'induction de la voie CVT (Shintani et Klionsky, 2004). Donc Atg17, comme Atg11 pour la voie CVT, serait une protéine adaptatrice qui permettrait le recrutement au niveau du complexe Atg1-Atg13 et jouerait le rôle de centre organisateur.

b. Organisation de la SPA

Une fois le complexe pentamérique Atg1-Atg13/Atg17-Atg29-Atg31 formé, les différentes protéines Atg nécessaires à la formation de l'autophagosome sont recrutées au niveau de la SPA (figure 17). Atg20 et Atg24 interagissent directement avec Atg17 (He et Klionsky, 2009). Ensuite Atg9 s'associe à Atg17 et cela de manière dépendante de Atg1 et de son activité kinase (Sekito et al., 2009). En conditions de croissance normales, son précurseur, pAtg9 est localisé sous forme de structures péri-vacuolaires discrètes (Noda et al., 2000). Atg9 et Atg27 sont les deux seules protéines Atg *trans*-membranaires intégrales identifiées parmi les protéines essentielles pour l'autophagie (Yen et al., 2007; Yen et Klionsky, 2007). Atg9 existe sous forme d'un stock cytoplasmique dynamique dans des régions proches des mitochondries et au niveau de la membrane externe mitochondriale (Reggiori et al., 2004). Lors d'une privation, Atg9 est co-localisée avec les complexes contenant Atg1 au niveau de la SPA mais n'est pas retrouvée dans les autophagosomes

(Kim et Klionsky, 2000; Reggiori et al., 2005). Cette protéine est recrutée de façon dynamique selon des cycles d'association/dissociation entre la SPA et des structures punctiformes mobiles où elle forme un complexe hétérotrimérique avec Atg27 et Atg23, chacune des protéines du complexe étant nécessaire pour le trafic des deux autres (Legakis et al., 2007).

Du fait de sa nature *trans*-membranaire, Atg9 participerait au recrutement de lipides indispensables pour la formation et l'expansion de la membrane d'isolement (Reggiori et al., 2005). Cette dynamique de recrutement d'Atg9 est dépendante d'Atg1 mais aussi de la protéine Atg2, fonctionnant au sein d'un complexe formé avec Atg18, puisqu'en absence de l'activité kinase de Atg1 ou en cas de délétion de Atg2, Atg9 s'accumule au niveau de la SPA (Obara et al., 2008). Des travaux récents montrent l'existence, chez la levure, d'organites tubulo-vésiculaires distincts (Sekito et al., 2009), dérivés de la voie sécrétoire (une sorte d'endosome spécialisé), et appelés réservoirs à Atg9. Ceux-ci fourniraient tout ou partie des membranes nécessaires à l'établissement de l'autophagosome. Ces réservoirs seraient recrutés en groupes suite à un signal inducteur de l'autophagie et localisés près du site de formation de la SPA (Mari et Reggiori, 2010).

Suite à l'induction de la kinase Atg1 le complexe comprenant Vps34 (PI3K(III)), son « ancre » membranaire Vps15 ainsi que Atg6 ou complexe VPS34-I est recruté par le biais d'Atg14 (Kihara et al., 2001). Ce complexe catalyse la formation de PI(3)P, ce qui est supposé être à l'origine de la formation de la SPA.

Atg18 et Atg21 sont deux protéines homologues présentant un domaine de liaison au PI(3)P et des répétitions WD40. Les protéines possédant ce type de motif ont généralement des fonctions importantes dans la signalisation cellulaire, les domaines WD40 leur permettant d'agir comme des plateformes de recrutement protéique. Le domaine FTTG de liaison au phosphoinositides, (PI(3,5)P₂ et PI(3)P) leur permet d'interagir avec des structures membranaires. Les membranes autophagosomales sont ainsi enrichies en PI(3)P et cette propriété permet le recrutement d'Atg18 ou d'Atg21 à ce niveau. Atg21 fonctionne de façon prépondérante au cours de la voie CVT mais elle pourra être recrutée au cours de l'autophagie pour compenser l'absence d'Atg18 (Nair et al., 2010).

En conditions nutritionnelles normales, le PI(3)P est retrouvé au niveau des endosomes et de la membrane vacuolaire, le PI(3,5)P₂ est également présent dans la membrane vacuolaire et Atg18 participe au transport rétrograde des endosomes vers l'appareil de Golgi (Nair et al., 2010). Elle est aussi impliquée dans la régulation de la morphologie de cet organite (Dove et al., 2004; Efe et al.,

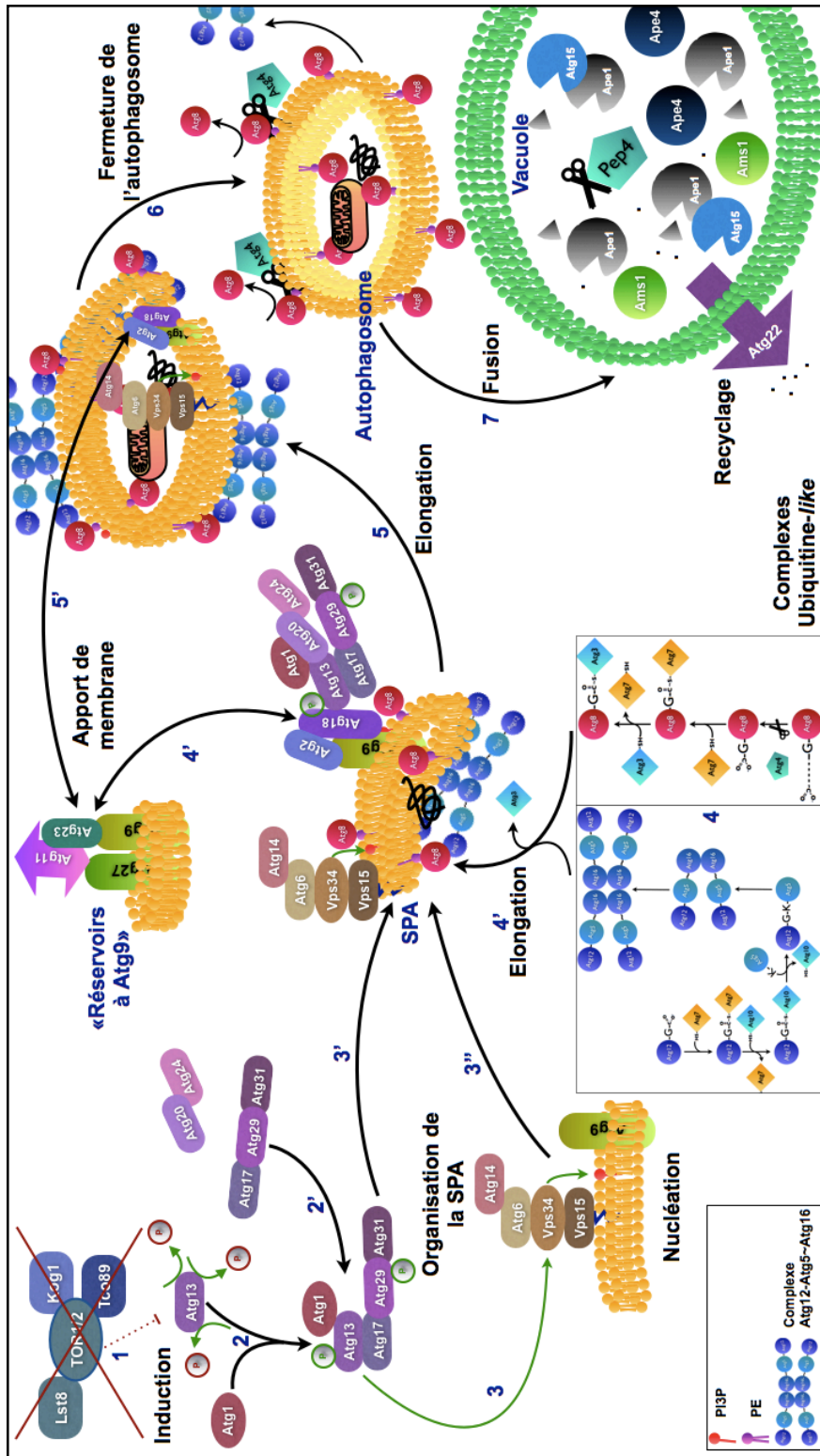
2007; Jin et al., 2008). Il existe également un contingent d'Atg18 libre qui est constitutivement complexé à Atg2. En conditions d'induction de l'autophagie, Atg18 est libérée de la membrane vacuolaire, la liaison d'Atg2 à Atg18 et l'interaction d'Atg18 au PI(3)P sont requises pour la localisation du dimère Atg18-Atg2 à la SPA (Obara et al., 2008). Ainsi, l'intervention d'une PI(3,5) P₂-phosphatase pourrait participer à la régulation de la localisation de Atg18 dans la cellule. En outre, Atg2 est connue pour se lier à Atg9 et semble intervenir dans la dynamique d'association-dissociation de cette protéine au niveau de la SPA de façon dépendante d'Atg1 (Sekito et al., 2009). Grâce à leurs domaines WD40, Atg18 et Atg21 permettent le recrutement des systèmes de conjugaison nécessaires à la nucléation et à l'expansion de la membrane autophagosomale (voir plus loin). Ces protéines n'apparaissent pas recruter le complexe Atg12-Atg5~Atg16 mais contrôlent la conjugaison d'Atg8, l'un des derniers produits de gène Atg à être recruté à la SPA (Nair et al., 2010).

Mécanistiquement, la voie CVT utilise une grande partie de la machinerie autophagique, et en particulier la machinerie impliquée dans la formation de la SPA nécessaire à la mise en place de l'autophagosome bi-membranaire en conditions de privation nutritionnelles et des vésicules de la voie CVT (Scott et al., 1996; Khalfan et Klionsky, 2002).

Figure 17 (page suivante): Déroulement de l'autophagie chez la levure S.cerevisiae :

Suite à l'inhibition de TORC1 (1), Atg13 est déphosphorylée, ce qui lui permet de s'associer à Atg1 (2), puis de former un complexe pentamérique en interagissant avec celui formé par Atg17, Atg29 et Atg31 (2'). Parallèlement, Atg14 recrute le complexe VPS34/VPS15/Atg6 à l'origine de la production de PI(3)P, nécessaire à la nucléation de la membrane pré-autophagosomale (3). Le complexe pentamérique Atg13-Atg1/Atg17-Atg29-Atg31 interagit ensuite avec d'autres protéines Atg telles que Atg20 et Atg24 par le biais d'Atg17, le tout participant à l'organisation de la SPA (2', 3' et 3'').

De façon dépendante de l'activité kinase d'Atg1, Atg9, protéine trans-membranaire va « cycler » entre des structures membranaires discrètes, les « réservoirs à Atg9 » où elle est complexée à Atg27 et Atg23 et la SPA où elle est liée à Atg2 et Atg18, ancré à la membrane par liaison au PI(3)P, et faisant le lien avec le complexe organisateur. Le recrutement d'Atg9 vers la SPA fait intervenir Atg11 (ou Atg17) (4' et 5'). Ce trafic d'Atg9 pourrait permettre l'apport de portion membranaires nécessaires pour la formation de l'expansion de la membrane d'isolement. La conjugaison d'Atg12 à Atg5 d'une part (formation du complexe Atg12-Atg5~Atg16, cf Partie 2-II-C-4-a-i) et celle d'Atg8 à la PE (cf Partie 2-II-C-4-a-ii) d'autre part (4), nécessitant l'intervention des enzymes Atg3, Atg4, Atg7, et Atg10 est nécessaire à l'expansion de la membrane autophagosomale (5), qui se referme enfin sur elle-même pour donner l'autophagosome (6). Ce dernier fusionne ensuite avec la vacuole pour y déverser son contenu qui sera dégradé en molécules de base (aa, lipides) par les enzymes y résidant dont la lipase Atg15. Ces éléments passent dans le cytosol grâce à des perméases comme Atg22 où ils seront recyclés.



3. Autophagie chez les mammifères

L'initiation de l'autophagie est assurée par les homologues mammaliens de Atg1, Atg13 et Atg17, très conservés entre les espèces.

a. La famille ULK

La famille d'homologues mammaliens d'Atg1 a été identifiée en tant que protéine homologue de la protéine Unc-51 du nématode *C. elegans* (Kuroyanagi et al., 1998), ce sont les protéines ULK. Quatre membres de cette famille sont connus, ULK1-4 parmi lesquels, ULK1, ULK2 et ULK3 sont impliqués dans l'autophagie. Néanmoins, l'isoforme majoritaire pour le processus autophagique est ULK1 puisque la suppression de son expression dans des cellules de la lignée HEK293 inhibe l'autophagie. Cependant, les souris n'exprimant pas ULK1 présentent une induction normale de l'autophagie suite à une privation, un ralentissement de la dégradation mitochondriale (Kundu et al., 2008; Jung et al., 2009). Par conséquent, des protéines telles que ULK2 pourraient alors compenser la perte de ULK1. Dans des neurones granulaires cérébelleux issus de souris KO (*Knock-Out*) pour ULK1, l'autophagie est anormale et la sensibilité de ces neurones à l'apoptose est accrue, ce qui n'est pas le cas pour les fibroblastes, suggérant alors une activité tissu-spécifique, partiellement redondante des homologues mammaliens de Atg1 (Tomoda et al., 1999; Lee et Tournier, 2011).

Chez les métazoaires, les homologues d'Atg1 sont associés au processus de développement du système nerveux central (SNC). dAtg1, pour la drosophile est impliquée dans le développement neuronal, et Unc-51 joue un rôle important dans la croissance et le guidage axonaux chez le nématode (Ogura et al., 1997; Lai et Garriga, 2004; Tsuboi et al., 2005; Ogura et Goshima, 2006; Ogura et al., 2010). De même, ULK1 et 2 seraient impliqués, chez les mammifères dans la croissance neuritique et sont recrutés par le récepteur au facteur de croissance neuronal TrkA-NGF (Lee et Tournier, 2011).

ULK1 interagit avec un certain nombre de protéines comme GATE-16, GABARAP, p62/SQSTM1, FIP200, SynGAP (*Synaptic GTPase-Activating protein*)/Atg101 et la synténine (une protéine interagissant avec la petite protéine G Rab5) (Okazaki et al., 2000; Hara et Mizushima, 2009; Mercer et al., 2009).

b. mAtg13

L'identification de l'homologue mammalien d'Atg13 est très récente (Mercer et al., 2009). Comme chez la levure, mAtg13 est un substrat de mTORC1 et peut également être phosphorylée

par ULK1 (Kamada et al., 2010), mais contrairement à Atg13 chez *S. cerevisiae*, mAtg13 peut s'associer à ULK1 et à FIP200 indépendamment de son état de phosphorylation. FIP200, correspondrait à l'homologue fonctionnel d'Atg17 chez les mammifères malgré une faible homologie de séquence (Hara et al., 2008; Hara et Mizushima, 2009).

Atg101, une protéine associée à mAtg13 (Hosokawa et al., 2009b; Mercer et al., 2009), n'a pas d'homologue chez *S. cerevisiae* mais elle est retrouvée chez un certain nombre d'espèces eucaryotes dont la levure *S. pombe* (Hosokawa et al., 2009b). Atg101 affecterait la dégradation dépendante du protéasome d'Atg13, constituant une nouvelle forme de modulation de l'activité autophagique (Hosokawa et al., 2009b; Mercer et al., 2009).

c. **Fonctionnement du complexe ULK1-mAtg13-FIP200**

Ce complexe existe dans la cellule quelles que soient les conditions nutritionnelles. Son activité va dépendre de sa localisation et de ses interactions avec d'autres protéines telles que l'AMPK et mTORC1 (figure 15).

En conditions physiologiques normales, ULK1, Atg13 et FIP200 sont phosphorylés sur des sites inhibiteurs et retrouvés sous forme de complexes avec mTORC1 et cette association est dépendante des conditions nutritionnelles de la cellule (Hosokawa et al., 2009a). En cas d'induction de l'autophagie, mTORC1 est inhibé, conduisant à sa dissociation d'avec ULK1-mAtg13-FIP200 et à la déphosphorylation des protéines membres de ce complexe. ULK1 peut alors s'autophosphoryler en position activatrice, et phosphoryler mAtg13 et FIP200 et peut participer à la nucléation de la membrane autophagosomale (Jung et al., 2009). Le fonctionnement de ce complexe est indispensable pour l'initiation de l'autophagie (Ganley et al., 2009). Bien que les substrats du complexe ULK1-mAtg13-FIP200 ne sont pas clairement identifiés, il semble agir sur le recrutement des protéines nécessaires à la formation de l'autophagosome vers des portions membranaires spécifiques du RE appelées omégasomes (terme donné à cause de la forme prise par ces membranes en forme d'omega) qui serviront de plateforme pour la formation du phagophore (Axe et al., 2008; Simonsen et Stenmark, 2008).

4. Importance des phosphoinositides pour l'autophagie

Les phosphoinositides sont des molécules dérivant du phosphatidylinositol (PI). Le PI peut être phosphorylé au niveau des groupements hydroxyles en position 3, 4 et 5 du cycle inositol grâce à

des protéines kinases dont les PI3K, spécialisées dans la phosphorylation de la position 3 de ce cycle. Le PI(3)P en résultant est un lipide retrouvé dans les vésicules de la voie endosomale (et au niveau de la membrane vacuolaire chez la levure), normalement inexistant dans le RE et important pour le recrutement de la machinerie autophagique et la formation des autophagosomes.

a. PI(3)P kinases

Chez la levure, deux complexes produisent ce lipide, les complexes PI3K (I) et (II) qui ont en commun l'activité catalytique de Vps34 (Kihara et al., 2001a). Vps34 est ancrée à la membrane du réseau *trans*-golgien par association avec la protéine adaptatrice Vps15 ; p150 chez les mammifères (Panaretou et al., 1997). Le premier complexe, nécessaire pour l'autophagie contient Atg6 et Atg14, le second a un rôle dans la voie endocytaire (Itakura et Mizushima, 2009).

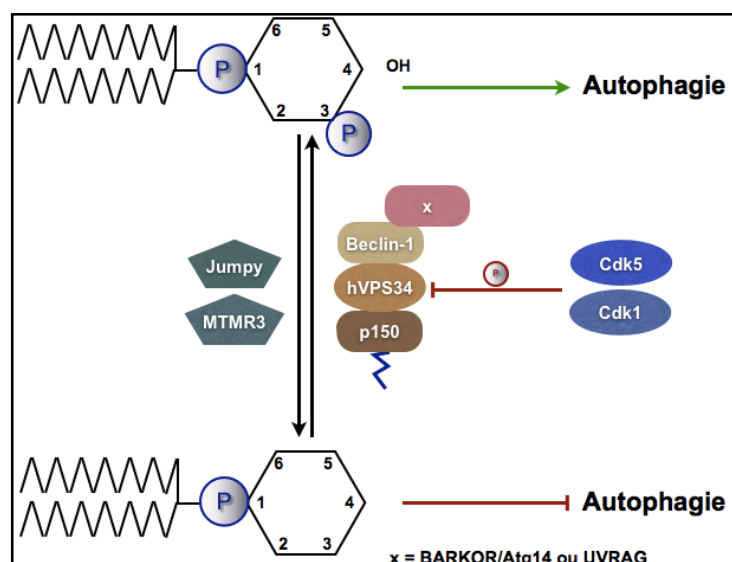


Figure 18 : Phosphorylation du PI en PI(3)P

Le complexe hVPS34-p150-Beclin-1 est localisé au niveau du réseau *trans*-golgien ou au niveau du site de nucléation des autophagosomes. p150 doit être myristoylée pour que le complexe soit actif. L'activité de hVPS34 est inhibée par les kinases Cdk1 et Cdk5. Le PI3P est déphosphorylé en PI par Jumpy et les phosphatases appartenant à la famille MTMR. Jumpy et MTMR3 ont été impliquées dans la régulation négative de l'autophagie.

Chez les mammifères, il existe trois classes de PI3K dont deux ont des rôles opposés dans l'autophagie. En effet, les PI3K de classe I qui catalysent la phosphorylation du PI (4,5)P₂ en PI(3,4,5)P₃ inhibent l'autophagie en activant mTOR par l'intermédiaire de la voie Akt/PKB (Furuta et al., 2004) (voir **Partie 2-II-B-2-a**). La PI3K(III) hVPS34 n'a pour substrat que le PI qu'elle phosphoryle en PI(3)P (figure 18). Les protéines possédant le domaine FYVE ou PX peuvent se lier au PI(3)P, ce qui influence leur localisation, leur

conformation et/ou leur activité (Burman et Ktistakis, 2010). L'activation du complexe contenant hVPS34 est à la base de la nucléation de la membrane d'isolement (Meijer et Codogno, 2004).

La PI3K(III), indépendamment des effets d'une privation en aa, peut-être inhibée lors d'une privation en glucose *via* l'AMPK. Cette inhibition serait un frein agissant en cas de stress prolongé. En ce sens, chez la drosophile, la protéine kinase dS6K agit en complément de dVps34 en tant qu'effecteur positif de l'autophagie et se voit inhibée en cas de stress nutritionnel (Young et al.,

2006). hVPS34 est physiologiquement phosphorylée au niveau de plusieurs sérines et thréonines : T163, S164, S244, S282 et S455. Elle constitue le substrat de certaines Cdk (*cyclin-dependent kinases*) : Cdk1 et Cdk5 (Furuya et al., 2010). La phosphorylation de hVPS34 par Cdk1 en T159, réduisant l'activité autophagique en inhibant l'interaction entre hVPS34 et Beclin-1 (Atg6), aurait un rôle dans l'inhibition de l'autophagie au cours de la mitose. La protéine Cdk5, quant à elle, phosphoryle hVPS34 à la fois en T159 mais aussi en T668, résidu situé au niveau du site catalytique de Vps34. Cette phosphorylation peut donc inhiber à elle seule hVPS34. Le fait que hVPS34 soit aussi un substrat de la Cdk5 a des implications sur le plan pathologique (Rubinsztein, 2010).

La formation de PI(3)P est indispensable à la mise en place de l'omégasome et à la poursuite du processus autophagique. Ce lipide pourrait permettre le recrutement de DFCP-1 (contenant deux domaines FYVE ; *Double FYVE-Containing Protein 1*) et de WIPI-1 (*WD40 repeat containing protein that Interacts with Phosphatidylinositide*) et WIPI-2 (homologues mammalien d'Atg18, présentant un domaine FYVE) (Proikas-Cezanne et al., 2004; 2007; Polson et al., 2010). Il existe des divergences entre WIPI1 et WIPI2. Cette dernière serait finalement la plus proche d'Atg18 (Polson et al., 2010). WIPI2 a également été décrite comme étant l'homologue d'Atg21.

Alors que toutes les PI3K sont inhibées par la wortmannine, les PI3K(III) sont inhibées plus spécifiquement par la 3-méthyladénine (3-MA) qui constitue donc un inhibiteur de l'autophagie (Seglen et Gordon, 1982). Ces substances ont contribué à l'établissement de la chronologie de l'intervention des protéines Atg au cours de la formation autophagosomale (Itakura et Mizushima, 2009).

b. Les complexes hVPS34-p150-Beclin-1

Suite à une signalisation inductrice de l'autophagie, Beclin-1 interagit avec hVPS34 (**figures 18 et 19**), au niveau de la membrane du réseau *trans*-golgien par l'intermédiaire d'une protéine adaptatrice ancrée à ce niveau : p150 (Panaretou et al., 1997; Kihara et al., 2001b). La présence de Beclin-1 a été décrite au niveau de la membrane plasmique, du RE, du réseau *trans*-golgien, dans le cytoplasme et au niveau du noyau (Kihara et al., 2001b; Liang et al., 2001; Criollo et al., 2007; Heath-Engel et al., 2008; Li et al., 2009; Vicencio et al., 2009). hVPS34, existe dans au moins trois complexes distincts qui ont en commun la protéine p150, homologue de Vps15, et Beclin-1 :

- hVPS34-p150-Beclin-1/mAtg14 ou BARKOR (*Beclin-1 Associated Autophagy Related Key regulator*);

- hVPS34-p150-Beclin-1/UVRAG (*Ultra-Violet Resistance Associated Gene*);

- hVPS34-p150-Beclin-1/UVRAG/Rubicon (*RUN domain protein as Beclin-1 Interacting et cystein-rich Containing*) (Matsunaga et al., 2009).

Ces complexes interviennent dans la régulation spatio-temporelle de l'autophagie. En effet, chacun d'entre eux intervient à des étapes différentes au cours de l'autophagie. Le premier de ces complexes contient mAtg14 (Sun et al., 2009; Matsunaga et al., 2009; Matsunaga et al., 2010; Noda et al., 2011) et est impliqué dans le recrutement des protéines nécessaires à la nucléation et à l'expansion de la membrane d'isolement (voir plus loin). La liaison de mAtg14 et de UVRAG au complexe hVPS34-p150-Beclin-1 est exclusive donc les deux complexes PI3K(III) résultant de ces associations auraient des actions différentes au cours de l'autophagie. Cependant, le fait que le complexe comprenant UVRAG agisse au cours de l'autophagie est matière à controverse. En effet, certains groupes ont présenté son caractère nécessaire pour la conduite de cette voie catabolique (Takahashi et al., 2011) alors que certains travaux l'excluent de ce processus (Itakura et Mizushima, 2009). De fait, UVRAG peut se lier à hVPS34 indépendamment de Beclin-1. Lorsque UVRAG est absente, la fusion autophagosomale est perturbée alors que la nucléation du phagophore est très peu affectée. A l'inverse, l'inhibition de l'interaction entre UVRAG et Beclin-1 gêne la formation autophagosomale (Liang et al., 2008a). Par conséquent, l'implication d'UVRAG au cours de l'autophagie ne serait pas limitée à la nucléation du phagophore et interviendrait au cours des étapes de transport et de fusion des autophagosomes et de leurs dérivés. La protéine UVRAG intervient également au cours de la régulation du trafic des vésicules de la voie endo-lysosomale. Cette protéine peut être localisée au niveau des endosomes précoces et peut d'interagir avec la GTPase Rab5, spécifique de ces structures. La mutation du domaine C2 (domaine d'association aux lipides membranaires dépendant du calcium) perturbe la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. UVRAG interagit également avec Rab7 et favorise son activation, il a alors été émis l'hypothèse qu'UVRAG permette l'échange de Rab5 avec Rab7 au cours des étapes de maturation de la voie endo-lysosomale (Liang et al., 2008b) par activation de HOPS. Rubicon interagit spécifiquement avec Rab7 et de manière mutuellement exclusive avec UVRAG et constitue un régulateur négatif de la maturation endosomale et autophagique (Sun et al., 2010; Lin et Zhong, 2011).

Beclin-1 peut se lier aux protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-XL et ce de façon dépendante de la disponibilité en nutriments, cette interaction est inhibitrice pour l'autophagie car elle empêche l'association entre Beclin-1 et hVPS34 (Patingre et al., 2005). A l'inverse, l'association entre Beclin-1 et Bcl-2 n'inhibe en aucun cas la fonction anti-apoptotique de Bcl-2 (Maiuri et al., 2007; Ciechomska et al., 2009). En fait, toutes les formes de Bcl-2 n'inhibent pas l'autophagie en

interagissant avec Beclin-1 : seule la forme de Bcl-2 associée au RE a cette capacité, (la forme mitochondriale de Bcl-2 peut inhiber l'autophagie en interagissant avec AMBRA-1 (Strappazon et al., 2011 ; voir plus loin). Ce fait peut être expliqué par l'implication du récepteur à l'IP3 dans ce processus de régulation (Vicencio et al., 2009). Beclin-1 est le substrat de la DAPk (*Death-Associated Protein kinase*), une protéine suppresseur de tumeur absente dans un grand nombre de cancers (Raveh et Kimchi, 2001; Lin et al., 2010). La DAPk va phosphoryler Beclin-1 au niveau de son domaine BH3 et ainsi promouvoir sa dissociation d'avec Bcl-2 (Zalckvar et al., 2009a; b). JNK/SAPK (*c-jun amino-terminal kinase, Stress Activated Protein Kinase*), une protéine appartenant à la famille des MAPK et pouvant être activée par la DAPk a Bcl-2 pour substrat et diminue son affinité pour Beclin-1 (Wei et al., 2008). La phosphorylation de Bcl-2 par JNK est induite également en cas d'induction de l'autophagie par les céramides qui agissent en parallèle sur la voie Akt et mime une privation en aa (Pattingre et al., 2009a; b) (figure 14).

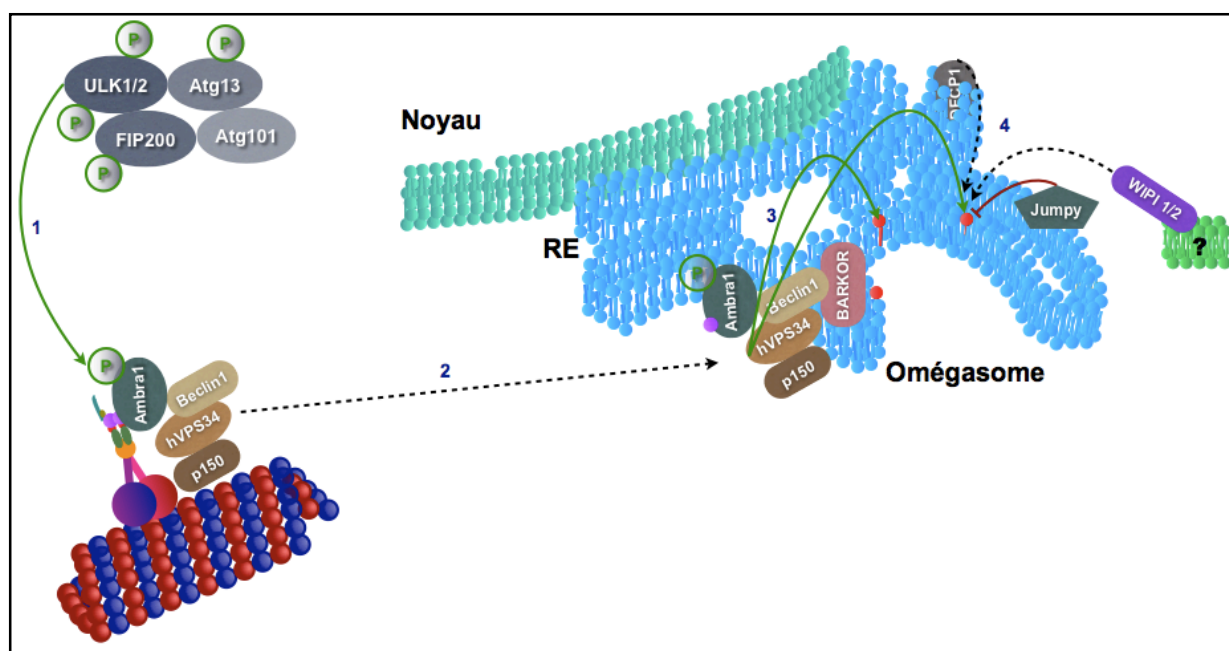
c. PI(3)P Phosphatases

La déphosphorylation du PI(3)P est due à l'action de protéines appartenant à la famille des myotubularines qui comprend quinze membres (MTM1 et MTMR1-14). MTMR14, également appelée Jumpy, mutée dans la myopathie centronucléaire, est responsable de la déphosphorylation de PI(3)P au cours de l'autophagie et a une influence négative sur la formation du phagophore ainsi qu'au cours d'étapes plus tardives. La protéine MTMR3 jouerait également un rôle dans la formation de l'omégasome en fonctionnant de concert avec WIPI1/2. Il s'agirait d'un mécanisme de frein contrebalançant l'activité de hVPS34 permettant une régulation fine de la formation des membranes autophagosomales (Vergne et al., 2009; Burman et Ktistakis, 2010; Vergne et Deretic, 2010). Outre leur rôle dans la régulation négative de l'autophagie, MTMR3 et Jumpy ont un rôle crucial en conditions normales car en empêchant l'existence du PI(3)P au niveau de la membrane du RE, ces phosphatases conditionnent l'efficacité de la signalisation autophagique et le recrutement spécifique de la machinerie autophagique constituée par les protéines Atg en conditions inductrices (Vergne et al., 2009; Taguchi-Atarashi et al., 2010).

5. Mise en place de l'omégasome

L'existence de l'omégasome a été mise en évidence récemment dans des cellules de mammifères. Sa mise en évidence repose sur la co-localisation précoce, temporaire et faisant suite à une privation en aa entre une protéine, DFPCP-1, pouvant se lier au PI(3)P et à la protéine LC3-II, marqueur de la membrane autophagosomale (Axe et al., 2008).

En conditions non-inductrices d'autophagie, DFCP1 est trouvée au niveau de l'appareil de Golgi, et de façon ubiquitaire, dans la membrane du RE. Elle est relocalisée dans des portions membranaires spécifiques liées au RE après induction de l'autophagie. Cela a lieu de façon dépendante de l'activité du complexe Beclin-1/hVPS34. Ces nouvelles structures, en continuité avec la membrane du RE ont été nommées omégasomes (figure 19). L'omégasome présente la particularité d'être une des rares zones du RE contenant du PI(3)P (Simonsen et Tooze, 2009). Il s'agit d'un compartiment dynamique, à l'existence fugace, de l'ordre de six à sept minutes, et co-localisant partiellement avec un certain nombre de protéines Atg endogènes.



Son rôle serait de servir de patron et de plateforme pour la formation de l'autophagosome, à la

Figure 19 : Formation de l'omégasome

(1) Le complexe ULK1 activé phosphoryle la protéine Ambra-1 associée aux microtubules grâce à une interaction avec DLC1 au niveau du complexe moteur dynéine. (2) Ceci permet le recrutement du complexe Ambra-1-Beclin-1-hVPS34-p150 au niveau du RE où est localisée BARKOR/mAtg14. (3) L'activité kinase de hVPS34 permet la synthèse de PI3P au niveau de la membrane du RE. La formation de PI(3)P est régulée négativement par l'intervention de la phosphatase Jumpy. (4) La présence de PI3P au sein de la membrane du RE permet le recrutement de DFCP1 et de WIPI 1/2. La protéine DFCP-1 est nécessaire pour la formation de l'omégasome, berceau où sera assemblé le phagosome.

manière de l'anneau de plastique pour les bulles de savon. Une fois l'autophagosome formé, l'omégasome s'effondre sur lui-même et disparaît. La protéine DFCP1, marqueur de l'omégasome est nécessaire et suffisante pour la localisation des protéines Atg requises pour l'établissement du phagosome au niveau du RE ainsi que pour la naissance de l'autophagosome, mais n'inhibe pas l'autophagie (Axe et al., 2008; Simonsen et Stenmark, 2008, Walker et al., 2008). La formation de l'omégasome et la naissance du phagosome sont deux processus très rapprochés dans le temps. En

outre, mAtg14, protéine résidente du RE est indispensable à la mise en place de ces deux structures et dont l'activité dépend du complexe ULK1-mAtg13-FIP200 (Matsunaga et al., 2010).

Un modèle mathématique a permis de démontrer l'importance de l'existence de cette structure dans l'optimisation de la régulation temporelle de la formation autophagosomale (Ktistakis et al., 2011).

Les événements exacts suivant l'activation du complexe ULK1/mAtg13/FIP200, ne sont pas encore tous connus. Néanmoins, il a été montré qu'une protéine impliquée dans le développement du système nerveux central et indispensable pour l'autophagie, AMBRA1 (Fimia et al., 2007), était un substrat de ULK1. AMBRA1 est une protéine du complexe hVPS34/p150/Beclin 1. AMBRA1 interagit avec DLC1 (*Dynein Light Chain 1*), appartenant au complexe moteur dynéine, responsable du transport de composants le long des microtubules. Suite à sa phosphorylation par ULK1, AMBRA1 se dissocie de DLC1 et participe ainsi à la translocation du complexe hVPS34-p150-Beclin-1 au niveau du RE (Di Bartolomeo et al., 2010; Fimia et al., 2011). La protéine mAtg14 localisée au niveau du RE recrute le complexe hVPS34-p150-Beclin-1 pour permettre la production de PI(3)P (Matsunaga et al., 2010). Ce lipide, normalement absent de la membrane du RE probablement grâce à l'action de Jumpy, « attire » DFCP-1 et WIPI1/2. Les protéines WIPI, grâce à leur domaine WD40, fonctionnent comme une sorte de plateforme permettant le recrutement des autres protéines Atg comme par exemple mAtg9 (Proikas-Cezanne et al., 2004; Itakura et Mizushima, 2009; Mehrpour et al., 2010). Il a également été suggéré que le PI(3)P conférerait à l'omégasome sa courbure particulière (Hamasaki et Yoshimori, 2010).

Hayashi-Nishino et al., ont réalisé une étude ultra-structurale des omégasomes et ont établi un modèle pour la formation de la membrane d'isolement dans lequel les structures relatives aux omégasomes font partie du RE. Les bords de l'omégasome et la membrane d'isolement en formation sont connectées entre eux par une étroite langue de membrane suggérant que le RE fournirait des portions membranaires pour la formation du phagophore, ce qui n'exclue pas l'existence d'autres sources pour la constitution de la membrane autophagosomale (Hayashi-Nishino et al., 2009; 2010; Tooze et Yoshimori, 2010).

6. Nucléation et expansion de la membrane d'isolement

a. Naissance du phagophore

A cette étape du processus autophagique, interviennent deux systèmes de conjugaison *ubiquitin-like* (Ohsumi et Mizushima, 2004) (figures 19 et 22). Il s'agit de complexes intervenant principalement dans la formation de l'autophagosome (Yang et Klionsky, 2010). Le rôle exact de ces deux complexes et leurs liens aux voies de signalisation citées précédemment sont assez flous, toutefois, il semble clair que ce rôle ait un rapport avec l'expansion de la membrane d'isolement voire l'initiation de sa formation et la fermeture de l'autophagosome (Yang et Klionsky, 2010).

i. Formation du complexe *Atg5-Atg12~Atg16L*

Chez *S. cerevisiae*, Atg12, une protéine constituée de 186 aa, est activée par la formation, au niveau d'un résidu glycine C-terminal, d'une liaison thioester de haute énergie avec une enzyme ATP-dépendante *E1-like*, Atg7 (au niveau de la cystéine 507) (Tanida et al., 1999). Atg12 est ensuite transférée à une enzyme *E2-like* : Atg10 (au niveau de la cystéine 133). Enfin, la glycine C-terminale est liée de façon covalente à la K149 d'Atg5 (liaison isopeptide). Alternativement, Atg12 peut être conjuguée à Atg3 (enzyme *E2-like* du système de conjugaison Atg8) par une liaison covalente. Ce complexe apparaît être nécessaire pour l'homéostasie mitochondriale en favorisant la dégradation autophagique spécifique de mitochondries altérées (Fujioka et al., 2010; Radoshevich et al., 2010; Radoshevich et Debnath, 2011) (figure 20).

Le complexe Atg12-Atg5 interagit avec une protéine possédant une région CC : Atg16, présente dans le cytoplasme sous forme homo-oligomérique¹², probablement sous forme de dimères. Cette interaction a lieu grâce à un domaine amino-terminal de la séquence d'Atg16 (Fujioka et al., 2010) et elle peut avoir lieu sans qu'il n'y ait de conjugaison entre Atg12 et Atg5 (Mizushima et Ohsumi, 1999). Les complexes Atg12-Atg5~Atg16 s'associent en tétramères d'environ 350 kDa et se retrouvent liés à la membrane de la SPA (Mizushima et al., 2003). De façon remarquable, les complexes Atg12-Atg5~Atg16 ne peuvent se lier que sur des surfaces membranaires convexes, ce qui conforte l'idée selon laquelle ce complexe participe à la formation autophagosomale. Ce type de liaison aux membranes est identique à celui de protéines du manteau impliquées dans le trafic membranaire. En outre, la formation du complexe Atg12-Atg5 est essentielle pour la poursuite de

¹² Il est à noter que chez *Schizosaccharomyces pombe*, Atg16 n'existe pas (Mukaiyama et al., 2010).

l'autophagie, d'une manière générale, la présence d'Atg5 est indispensable (Reggiori et Klionsky, 2005).

Ce processus est en grande partie conservé bien que la protéine Atg16L (*Atg16 like*) retrouvée chez les mammifères n'ait qu'un taux d'homologie très faible avec Atg16. En effet, au cours de la phylogenèse, Atg16L a acquis des domaines supplémentaires à l'image du large domaine C-terminal comportant sept domaines de répétitions WD40.

Atg12 est liée par le résidu glycine carboxy-terminal, de façon covalente, à la K130 d'Atg5 pour, finalement, former un complexe multimérique d'environ 800 kDa avec Atg16L. La liaison

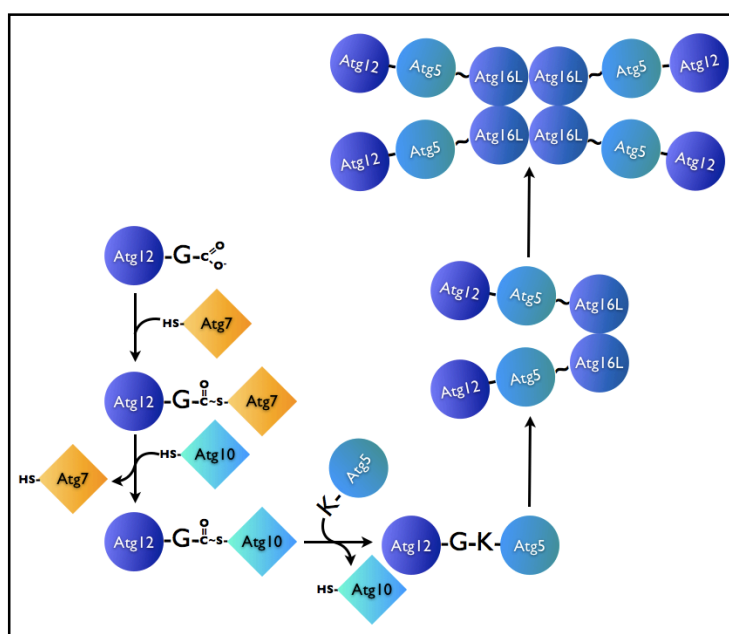


Figure 20 : Formation du complexe Atg12-Atg5-Atg16L.
Atg12 est couplé à Atg5 par une conjugaison de type ubiquitine où l'enzyme Atg7 joue le rôle d'E1 et Atg10 celui d'Atg10. Atg12-Atg5 est ensuite associé à Atg16L (mammifères, Atg16 pour *S. cerevisiae*) de façon non-covalente, puis ces complexes sont assemblés en tétramères.

covalente d'Atg12 à Atg5 n'est pas nécessaire ni pour la liaison entre Atg5 et Atg16L, ni pour leur ciblage à la membrane d'isolement mais elle est indispensable pour l'expansion de celle-ci (Mizushima et Ohsumi, 1999; Fujioka et al., 2010).

Mizushima et al. ont montré en 2001, que le marquage de la membrane d'isolement par le complexe Atg12-Atg5 disparaissait après la formation de l'autophagosome (Mizushima et al., 2001), ce processus est extrêmement rapide puisqu'il a lieu dans les cinq minutes suivant la

fermeture autophagosomale (Fujita et al., 2008)¹³. Donc ce complexe agit au cours de l'étape de formation et d'expansion du phagophore mais pas au-delà (Mizushima et al., 2001).

¹³ La déacétylase dépendante du NAD, Sirt1 peut s'associer à Atg5, Atg7 et Atg8. En outre les souris pour lesquelles l'expression de Sirt1 a été abolie présentent un phénotype proche de celui présenté par les souris Atg5^{-/-} dont l'accumulation intracellulaire de vésicules et une létalité péri-natale. Les auteurs ont alors suggéré que la lysine 130 d'Atg5 pouvait être acétylée de façon réversible et constituer un substrat pour Sirt1 qui aurait alors un rôle important dans la modulation de l'autophagie (Lee et al., 2008).

ii. *Le système de conjugaison Atg8 (MAP-LC3) : expansion et fermeture du phagophore*

- *Principe*

La conjugaison d'Atg8 est totalement dépendante du complexe précédent car celui-ci participe aux phases finales de la réaction. Par rapport aux autres systèmes de conjugaison de type ubiquitine existants, le système Atg8 est particulier car le couplage ne se fera non pas à une protéine mais à un phospholipide, la PE (Ichimura et al., 2000). Atg8 est une petite protéine globulaire repliée de la même manière que l'ubiquitine et présente également un domaine UBL à son extrémité carboxy-terminale. La spécificité de cette protéine réside au niveau de son extrémité amino-terminale, constituée de deux hélices α en tandem, spécifiques à la famille protéique Atg8 (Noda et al., 2010).

Chez la levure, le résidu asparagine C-terminal du précurseur de la protéine Atg8 est clivé par une cystéine protéase : Atg4 de façon à exposer un résidu glycine (Mizushima et al., 2001) pour obtenir la forme activée d'Atg8. De la même façon qu'avec Atg12, Atg8 est couplée par une liaison thioester à Atg7 (cystéine 507) puis transférée à Atg3 (Tanida et al., 2002) et liée par la glycine exposée au groupement amine de la PE au niveau de la SPA (Ichimura et al., 2000) (Atg8-PE). Cette liaison à la membrane n'a lieu qu'en présence d'un complexe Atg12-Atg5~Atg16 fonctionnel car Atg8 ne peut pas cibler la membrane dans des organismes déficients en Atg5 (Mizushima et al., 2001 ; [figure 21](#)).

De récents travaux *in vitro* ont permis une meilleure compréhension des processus de fusion montrant la capacité intrinsèque de Atg8-PE à favoriser l'accolement et l'hémifusion de liposomes par interaction entre molécules d'Atg8 associées à différentes membranes lipidiques, ce processus est ralenti par l'action d'Atg4 (Nakatogawa et al., 2007; Subramani et Farré, 2007). Atg8 contrôlerait donc l'expansion de la membrane d'isolement et la lipidation de cette protéine en constituerait le signal d'activation. Chez la levure, la quantité d'Atg8 conjuguée à la PE est directement reliée à la taille des autophagosomes sans affecter leur nombre (Xie et al., 2008a; b) et régule l'intensité de l'activité autophagique. De plus, ces derniers travaux indiquent que la déconjugaison d'Atg8 par Atg4 est nécessaire pour la fermeture de l'autophagosome confirmant l'activité régulatrice de cette enzyme sur l'expansion membranaire autophagosomale et dans le contrôle de la taille des autophagosomes. La déconjugaison d'Atg8-PE par Atg4 est régulée par Atg18 et Atg21. Ces deux protéines recrutées à la SPA, protègent Atg8 envers l'activité

enzymatique d'Atg4 et donc également participer à la régulation de la taille des autophagosomes (Nair et al., 2010).

Atg8 est une protéine hautement conservée au cours de l'évolution et retrouvée chez tous les organismes modèles, ce qui est également le cas chez les mammifères (Martinet et al., 2006). Cependant, une complexification du système est survenue puisqu'il y a deux homologues de Atg8 chez *C. elegans* et la drosophile, et au moins huit homologues différents d'Atg8 pour l'Homme (Alberti et al., 2010; Weidberg et al., 2010). Le premier homologue mammalien identifié pour avoir une fonction dans le processus autophagique est MAP1-LC3 chez le rat (Kabeya et al., 2000). Comme chez *S. cerevisiae*, le précurseur de LC3 subit un clivage activateur au niveau de son extrémité carboxy-terminale par un homologue d'Atg4 pour donner une forme activée cytosolique : la forme LC3-I qui sera ensuite spécifiquement conjuguée à la PE du phagophore en formation grâce à l'intervention des homologues d'Atg7 et d'Atg3. Le complexe Atg12-Atg5~Atg16L a la fonction d'enzyme *E3-like* pour la conjugaison de LC3 à la PE de la membrane autophagosomale (Hanada et al., 2007; Noda et al., 2008). Par ailleurs, ce complexe spécifie le site de lipidation de LC3 au niveau du phagophore et participe à son recrutement en interagissant à la fois avec Atg3 et avec des facteurs membranaires encore inconnus catalysant cette réaction. En effet, lorsque ce complexe est localisé de façon artificielle au niveau de la membrane plasmique, alors la lipidation de LC3 a lieu à ce niveau (Hanada et al., 2007). Ainsi, le complexe comprenant Atg16L tiendrait le rôle d'échafaudage dans la lipidation de LC3 en permettant le rapprochement de l'enzyme E2-like Atg3 près de la membrane cible (Nakatogawa et al., 2008; Noda et al., 2008). La forme ainsi liée à la PE, LC3-PE est appelée LC3-II.

LC3-II est ancrée de chaque côté de la membrane d'isolement. Après la fermeture de celle-ci, il n'est plus retrouvé que du côté luminal de l'autophagosome puis est dégradé après la formation de l'autolysosome (Kabeya et al., 2000). Après fermeture de l'autophagosome, LC3-II couplée à la membrane externe est clivée par Atg4 et recyclée dans le cytoplasme où elle pourra être éliminée par le protéasome après avoir été polyubiquitinylée. Comme chez la levure, cette déconjugaison de LC3 de la PE est nécessaire pour la poursuite de l'autophagie puisque la suppression de

l'expression d'Atg4B cause l'accumulation de phagophores (autophagosomes non refermés) dans les cellules (Fujita et al., 2008; 2009).

LC3 est une phosphoprotéine, au niveau de laquelle deux sites de phosphorylation ont été identifiés. Le premier se situe au niveau de la T6, et est phosphorylé par la protéine kinase C (PKC). Bien que l'inhibition de la PKC augmente l'autophagie et qu'à l'inverse son activation a un effet inhibiteur, l'action directe de cette phosphorylation sur l'autophagie n'a pas pu être démontrée (Jiang et al., 2010). LC3 est également un substrat

de la protéine kinase A (PKA) qui la phosphoryle au niveau de la S12. Cette phosphorylation est inhibitrice de l'activité autophagique, néanmoins, comme il existe une

population de LC3 phosphorylée dans les cellules de manière ubiquitaire, la phosphorylation de LC3 pourrait constituer un moyen de stocker LC3 sous une forme inactive mais rapidement mobilisable en cas d'induction de l'autophagie (Cherra et al., 2010).

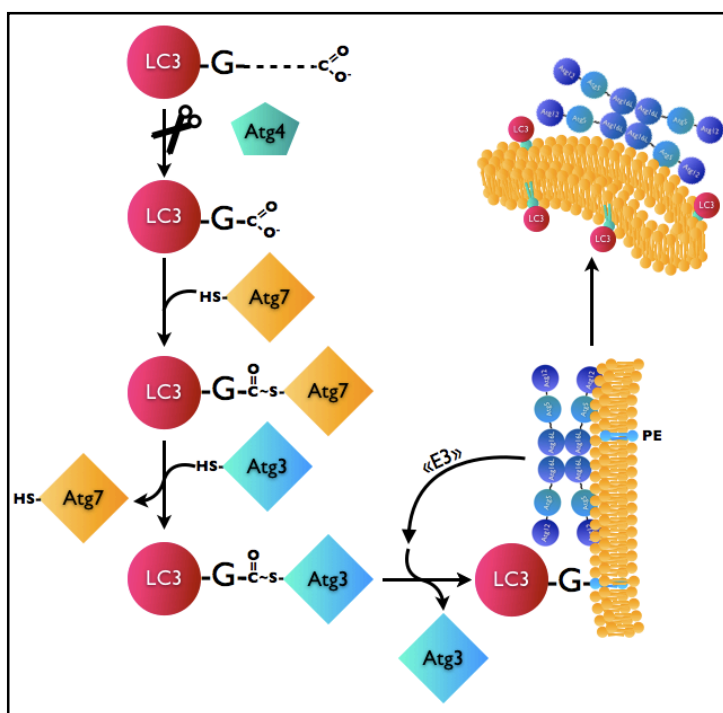


Figure 21 : Conjugaison de LC3 (Atg8) à la membrane autophagosomale selon un processus de conjugaison de type ubiquitine.

LC3 est activée par un clivage de l'extrémité carboxy-terminale par la cystéine-protéase Atg4 afin d'exposer un résidu glycine. LC3 est ensuite conjuguée à Atg7 (E1) puis à Atg3 (E2) et couplé à une phosphatyléthanolamine du phagophore en formation. Le complexe Atg12-Atg5-Atg16L tiendrait le rôle d'enzyme E3 à ce niveau.

- *Homologues mammaliens d'Atg8*

Chez les mammifères, les homologues d'Atg8 sont regroupés en deux sous-familles. La première est la sous-famille LC3, constituée de quatre membres : LC3A qui comporte deux isoformes issues d'un épissage alternatif, LC3B et LC3C. Les formes A et B sont les plus abondantes (He et al., 2003). La seconde correspond à la sous famille GABARAP qui comprend GATE-16 (*Golgi-Associated ATPase Enhancer of 16 kDa*) ou GABARAPL2, GABARAP, GABARAP-L1 et GABARAP-L3.

MAP1-LC3 constitue la chaîne accessoire¹⁴ d'un complexe protéique formé par une chaîne lourde MAP1A ou MAP1B (*Microtubule-Associated Protein 1*) et d'autres chaînes légères résultant du clivage d'un polypeptide précurseur à l'origine également des chaînes lourdes (le premier polypeptide donne MAP1B et LC2, le second MAP1A et LC1) et peut se lier d'elle-même aux microtubules grâce à une région basique amino-terminale. Lorsqu'elle est complexée à MAP1A ou B, LC3 joue un rôle régulateur pour ces protéines stabilisatrices des microtubules¹⁵ et favorise leur interaction avec le cytosquelette.

Tous les homologues d'Atg8 sont ubiquitaires cependant il y a des variations en fonction des tissus et des protéines prises en considération par exemple, GABARAP est plus présente dans les glandes endocrines alors que GABARAPL1 est abondante dans le cerveau. Ces protéines, bien qu'impliquées dans des processus de transport membranaire, n'étaient pas connues pour avoir des fonctions au sein du processus macroautophagique (Wang et al., 1999; Sagiv et al., 2000). En effet, *in vitro*, GATE-16 est impliquée dans le transport des protéines en provenance de l'appareil de Golgi (Elazar et al., 2003) et GABARAP, une protéine essentiellement neuronale, est associée au récepteur d'un neurotransmetteur inhibiteur : le GABA ainsi qu'au cytosquelette et joue un rôle dans la régulation du mécanisme d'endocytose. Or, GATE-16, GABARAP et GABARAPL1 sont toutes activées par Atg4B par clivage au niveau d'une glycine carboxy-terminale conservée (Tanida et al., 2004), donnant une forme « -I » et peuvent être conjuguées à la PE (forme II) et retrouvées associées à la membrane de l'autophagosome (Kabeya et al., 2004; Chakrama et al., 2010). Concernant leur fonction au cours de l'autophagie, il a été très récemment indiqué que contrairement à ce qui était admis, les protéines des sous-familles LC3 et GABARAP ne présentaient pas une activité redondante mais complémentaire. Ainsi, les membres de la sous-famille LC3¹⁶ participeraient à l'expansion du phagophore et ceux de la sous-famille GABARAP permettrait la fermeture de l'autophagosome et participeraient de façon directe ou non au détachement du complexe Atg12-Atg5~Atg16L de la membrane externe autophagosomale (Weidberg et al., 2010).

¹⁴ Il existe d'autres chaînes légères LC1 et LC2 mais leur principe de fonctionnement est différent de LC3 et elles n'appartiennent pas à la même famille de protéines. En effet, ces protéines sont synthétisées à la suite de MAP1A ou B car elles sont codées par le même gène puis clivées. Elles peuvent alors s'associer indifféremment à l'une ou l'autre de ces protéines MAP1.

¹⁵ Le rôle des MAP sera discuté plus loin

¹⁶ LC3 est aussi connue pour interagir avec la caldendrine, une protéine impliquée dans la signalisation calcique (Seidenbecher et al., 2004).

Chaque sous-famille interviendrait donc de manière différentielle au cours de la formation autophagosomale. Malgré tout l'équation n'est pas totalement résolue puisque l'on ne sait toujours pas de façon claire si, au sein de chaque sous-famille, les différents membres présentent des spécificités de fonction, qu'elles soient temporelles, contextuelles (autophagie basale ou induite par exemple) et/ou spécifiques de tissus (Weidberg et al., 2010). Par exemple il a été suggéré que GABARAPL1 puisse fonctionner au cours de la mitophagie puisqu'il a une meilleure co-localisation avec NIX/BNIP3L, protéine adaptatrice qui permet la séquestration des mitochondries dans l'autophagosome (Chakrama et al., 2010). GATE-16 est connue pour fonctionner au niveau de la fusion vésiculaire dans l'appareil de Golgi en interagissant avec la protéine NSF (*N-ethylmaleimide factor*) (Elazar et al., 2003). Etant donné qu'il existe au moins quatre membres par sous-famille, on peut imaginer que l'action combinée de deux protéines appartenant à chaque groupe puisse affiner la régulation et la spécificité de la prise en charge du substrat dans l'autophagosome.

Par ailleurs, la sérine 12 de LC3, c'est-à-dire son site de phosphorylation par la PKA est conservée pour les trois isoformes de cette protéine (A, B et C) mais est néanmoins absente dans la séquence protéique de GATE-16 et de GABARAP. Cette phosphorylation ayant un rôle régulateur pour la formation autophagosomale, ce dernier point soutient l'existence de fonctions biologiques distinctes (diversité fonctionnelle) pour les différents membres mammaliens de la famille protéique LC3 (Cherra et al., 2010).

- *Homologues mammaliens d'Atg4*

Chez les mammifères, il existe quatre homologues d'Atg4 : Atg4A/autophagine 2, Atg4B/autophagine 1, Atg4C/autophagine 3 et Atg4D/autophagine 4 parmi lesquels, seule Atg4B a la capacité d'activer et de délipider tous les homologues humains d'Atg8 (Tanida et al., 2004) démontrant l'apparition d'une divergence fonctionnelle et une possible différence d'activité tissulaire puisque des souris pour lesquelles l'expression de Atg4C a été abolie présentent une déficience de l'activité autophagique au niveau du diaphragme uniquement (Marino et al., 2007). Les protéines Atg4 ont une homologie de séquence au niveau de leur domaine endopeptidase central mais présentent des divergences au niveau de leurs extrémités N- et C-terminales qui pourraient être impliquées dans la sélection du substrat. Atg4B possède un domaine LIR/LRS (voir plus loin) et sa liaison à LC3 semble être particulièrement bien régulée (Satoo et al., 2009). Atg4B nécessite que LC3 soit entière pour la cliver, or, il semblerait que la fixation de LC3 au niveau du

site catalytique de Atg4B induise un changement conformationnel renforçant l'activité catalytique de cette enzyme. GATE-16 et plus généralement la sous-famille GABARAP sont les substrats préférentiels de Atg4A (Scherz-Shouval et al., 2003; Kabeya et al., 2004; Weidberg et al., 2010), qui est en outre incapable de cliver LC3B (Li et al., 2011). Atg4D présente une meilleure affinité pour GABARAP-L1 (Betin et Lane, 2009a). Néanmoins, cette dernière a la particularité de posséder un site de clivage par les caspases et un domaine BH3-like en position C-terminale. Cette protéine est inactive lorsqu'elle est entière, sa troncation par les caspases permettant son activation. L'autophagie dans laquelle Atg4D intervient est plus cytoprotectrice que celle dans laquelle Atg4B est impliquée (Betin et Lane, 2009a; b).

Atg4A et Atg4B peuvent être oxydées au niveau de résidus cystéines conservés encadrant le site catalytique lui-même contenant une cystéine. Cette oxydation inhibe préférentiellement l'activité de dé-lipidation de ces enzymes mais aurait peu d'effet sur le clivage de LC3 ou de GATE-16 avant leur conjugaison. Suite à l'induction de l'autophagie par un stress nutritionnel, l'activation du complexe hVPS34-p150-Beclin-1 pourrait conduire à la formation modérée, au niveau des mitochondries, d'ERO (sous forme de peroxyde d'hydrogène, H₂O₂) de manière locale et réversible, créant un micro-environnement oxydant au niveau du site de formation de l'autophagosome inhibant ainsi Atg4 et permettant la lipidation de LC3. Des changements environnementaux dans la zone de formation de l'autophagosome conduirait alors à l'activation d'Atg4 et au détachement de LC3 du feuillet externe de la membrane autophagosomale (Scherz-Shouval et al., 2007).

iii. *mAtg9*

Chez les mammifères, mAtg9 est localisée dans les membranes *trans*-golgiennes situées près du noyau et au niveau de la membrane des endosomes tardifs. Lors d'une privation nutritive, Atg9 est redistribuée et est co-localisée avec la petite protéine G Rab7, ainsi qu'avec Rab5, Atg16L et parfois avec LC3. Cette redistribution n'a pas lieu lorsque l'expression de ULK1 est abolie (Young et al., 2006). Elle est sous la dépendance de la voie de la PI3K(III) puisqu'elle est inhibée par la 3-MA ou par la wortmannine et donc fonctionne en aval de ULK1 (Mehrpour et al., 2010). Le rôle d'Atg9 n'est pas vraiment clair bien qu'il y ait un consensus sur le fait que cette protéine puisse être impliquée dans le recrutement de lipides nécessaires pour la formation de la membrane d'isolement .

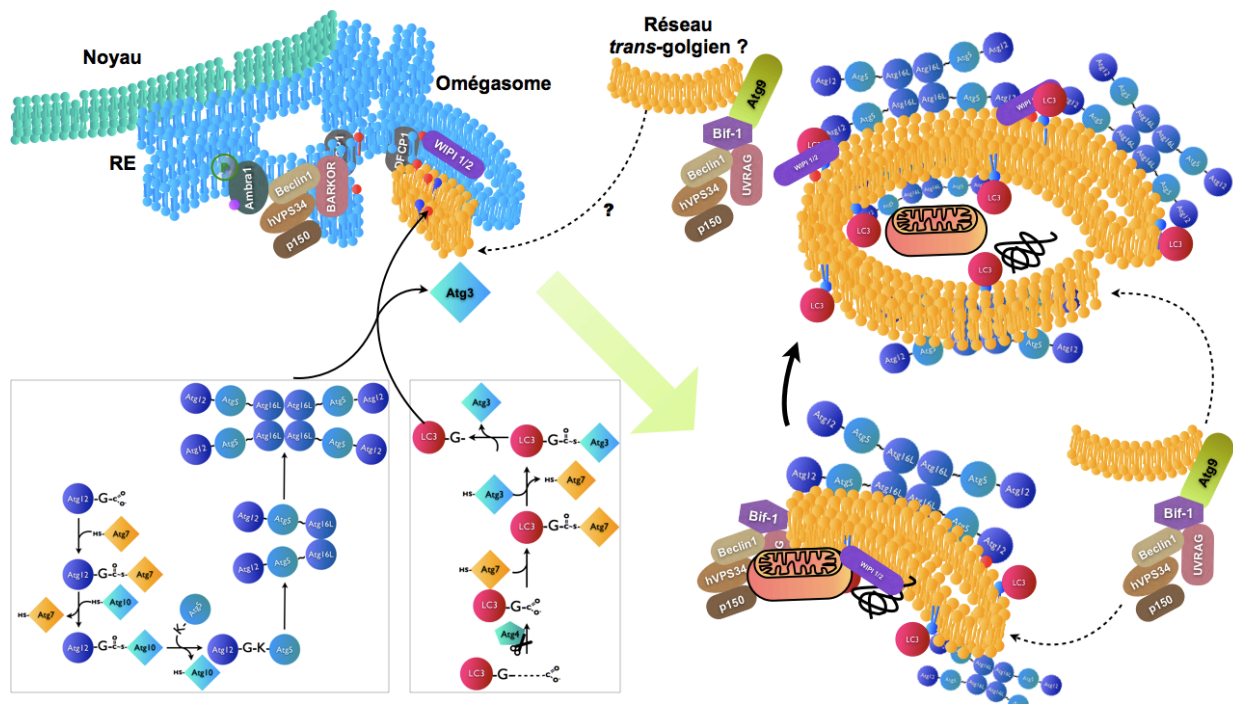


Figure 22 : Expansion du phagophore

Selon le modèle le plus communément admis, la membrane d'isolement est issue d'une synthèse de novo, l'apport de membrane serait du au trafic cyclique de mAtg9 depuis le réseau trans-golgien. mAtg9 a la possibilité d'interagir avec Bif-1, elle même associée au complexe UVRAG-Beclin-1-hVPS34. Bif-1 serait responsable de la courbure membranaire. hVPS34 fournit le PI3P nécessaire au fonctionnement de WIPI1/2 qui permettrait le recrutement des protéines nécessaires à la formation du phagophore dont les complexes ubiquitine-like Atg12-Atg5-Atg16L et LC3. Le premier complexe serait associé à la membrane par interaction entre Atg16L et un partenaire inconnu et permet la conjugaison de LC3 à la PE. WIPI 1/2 jouerait en outre un rôle protecteur pour LC3-II en empêchant sa déconjugaison par Atg4.

Le fait que mAtg9 puisse co-localiser avec Bif-1 (*Bax Interacting Factor 1*; ou endophiline 1), renforce cette hypothèse. En effet, Bif1 est une protéine qui interagit avec UVRAG (Takahashi et al., 2007). Cette protéine possède un domaine spécifique, le domaine N-BAR (*N-terminal amphipathic helix et Bin/Amphiphysin/Rvs*) qui joue un rôle dans la déformation des membranes. Takahashi et al., ont exposé que, suite à une privation nutritionnelle, Bif-1 provoquait une fission de membranes golgiennes enrichies en mAtg9 et que ces membranes contribuaient à la formation de l'autophagosome. Ceci est dépendant de l'activation de ULK1 et surtout de l'action du complexe PI3K(III), très vraisemblablement celui contenant la protéine UVRAG (Takahashi et al., 2011). Au cours de la formation du phagophore, cette protéine permettrait de conférer à la membrane d'isolement cette courbure qui lui est caractéristique et qui lui permet de séquestrer des portions cytoplasmiques mais également de pouvoir se refermer sur elle-même par accollement de ses deux extrémités (Takahashi et al., 2007; 2009; 2011; Yang et Klionsky, 2010). Atg9 pourrait aussi être impliquée dans le recyclage des portions membranaires après l'autophagie (He et Klionsky, 2007).

b. Origine de la membrane autophagosomale

La plupart des mécanismes régissant le processus autophagique sont aujourd'hui en grande partie élucidés. Toutefois, un mystère persiste et non l'un des moindres. Cette inconnue demeure quant à l'origine de la membrane d'isolement, et ce malgré l'identification récente des omégasomes, structures dérivant du RE, et berceaux pour la formation du phagophore (Simonsen et Stenmark, 2008; Tooze et Yoshimori, 2010). Ainsi, de nombreuses mises au point au sujet de l'origine de cette membrane sont régulièrement publiées (Juhász et Neufeld, 2006; Reggiori, 2006; Cuervo, 2010; Hamasaki et Yoshimori, 2010; McEwan et Dikic, 2010; Ravikumar et al., 2010b; Tooze et Yoshimori, 2010).

Les premières études menées sur le sujet ont suggéré que cette membrane pouvait dériver de l'appareil de Golgi, du RE, des endosomes, des mitochondries et/ou des lysosomes. Des résultats contradictoires concernant la présence ou non de marqueurs spécifiques de la membrane de divers organites ont été présentés. Cependant, la membrane autophagosomale est plutôt pauvre en protéines (Fengsrud et al., 2000) ce qui serait en faveur d'une formation *de novo*, permettant cette composition particulière (Noda et al., 2002).

Depuis longtemps, le RE était soupçonné de fournir des éléments permettant la nucléation de la membrane d'isolement. La mise en évidence récente de l'importance du PI(3)P et surtout le fait que le phagophore puisse naître au niveau du RE (omégasome) a replacé cet organite en tête des candidats pour l'approvisionnement en matériel membranaire nécessaire à la nucléation du phagophore (Axe et al., 2008; Ylä-Anttila et al., 2009; Hayashi-Nishino et al., 2010; Ktistakis et al., 2011). De plus, l'analyse *in situ* de ces jonctions entre phagophore et membranes du RE montre que ces deux structures sont reliées entre elles par une mince portion membranaire (Hayashi-Nishino et al., 2009). Néanmoins, cette hypothèse est mise à mal par le fait que seulement 70% des phagophores sont retrouvés connectés au RE et que les études concernant la présence ou non de marqueurs des membranes du RE dans la membrane autophagosomale sont contradictoires.

Une étude a permis d'identifier Rab33 comme partenaire de Atg16L *via* le domaine CC de cette dernière (Itoh et al., 2008). Etant donné que des modifications de l'expression de Rab33 modulent l'autophagie, le complexe comprenant Atg16L pourrait jouer le rôle d'effecteur d'un signal provenant de cette petite GTPase. L'interaction de Rab33 avec Atg16L pourrait permettre le rapprochement efficace de vésicules de transport provenant de l'appareil de Golgi et contenant Rab33 associé à la membrane cible (Itoh et al., 2008). La membrane d'isolement pourrait donc

avoir en partie une origine *trans*-golgienne (Reggiori et Klionsky, 2005). Cette hypothèse est renforcée par les découvertes récentes au sujet de Bif-1 et du recrutement de membranes enrichies en mAtg9 (Takahashi et al., 2011). Néanmoins, mAtg9 étant une protéine avec une localisation dynamique et retrouvée au niveau des endosomes précoces, on ne peut exclure la possibilité que ces vésicules puissent également participer à la formation de la membrane autophagosomale.

D'autres auteurs suggèrent que le feuillet externe mitochondrial fournirait des lipides pour l'établissement du phagophore dans le cas de l'autophagie induite par une privation nutritionnelle (Hailey et al., 2010; McEwan et Dikic, 2010). En effet, Hailey et al., montrent que Atg5 et une partie de la population de LC3 sont co-localisées avec le feuillet externe mitochondrial. Cette hypothèse repose sur le fait que les éléments à la base de la synthèse de PE sont peu disponibles en cas de privation et qu'il existe au niveau de la mitochondrie une enzyme, la PS-carboxylase qui permet de convertir ce lipide en PE. La PS utilisée serait fournie par le RE grâce à l'intervention de la mitofusine 2, une GTPase de la famille des dynamines impliquée dans le mécanisme de fusion mitochondrial (Martens et McMahon, 2008), permettant le rapprochement de ces deux organites (Hailey et al., 2010).

L'intervention de la membrane plasmique à ce niveau du processus autophagique est également discutée. En ce sens, des travaux récents montrent que Atg16L interagit avec la chaîne lourde de clathrine et que des portions de membranes juste endocytées contenant cette protéine étaient importantes pour la formation de structures précurseurs du phagophore (Ravikumar et al., 2010a; b). Ce qui est séduisant dans cette hypothèse est que compte-tenu de sa grande surface, la membrane plasmique peut fournir assez de matériel lors d'une induction robuste de l'autophagie (par exemple suite à une privation nutritionnelle) sans compromettre d'autres fonctions cellulaires. Malgré tout, la suppression de l'activité de protéines impliquées dans le bourgeonnement des vésicules recouvertes de clathrine, ne supprime que 30% de l'activité autophagique. Cela peut être dû à des difficultés techniques et une inhibition inefficace de ce processus ou alors à l'existence de mécanismes compensatoires pour la formation des membranes autophagiques.

Par ailleurs, du fait de l'existence de multiples sources potentielles de membrane pour la formation de l'autophagosome, on peut se demander si chaque source de membrane n'est pas liée à une activité autophagique particulière et à un type de substrat, par exemple, le RE participe à la formation de l'autophagosome dans le cadre de la réticulophagie mais pas dans celui de la mitophagie ou de l'autophagie induite suite à une privation nutritionnelle. En ce sens, l'étude de la

localisation des autophagosomes montre que ces structures semblent pouvoir se former aléatoirement dans le cytoplasme (Jahreiss et al., 2008). L'existence de l'interaction entre Beclin-1 et des protéines ayant des localisations cellulaires distinctes pourrait corroborer cette hypothèse. Cependant, dans l'étude menée par Jahreiss et al., l'autophagie a été induite par une privation nutritionnelle. Compte-tenu des débats au sujet des différences de spécificité entre autophagie induite (dégradation au hasard de portions cytoplasmiques) et autophagie basale qui présenterait une haute spécificité envers les substrats séquestrés, il est possible qu'il y ait des divergences dans la formation des autophagosomes.

Un autre point en relation avec la notion d'origine de la membrane autophagosomale est le mode d'expansion du phagophore. L'élucidation de ce mécanisme permettrait de répondre à la question précédente. En ce sens, Longatti et Tooze., ont émis quatre hypothèses concernant ce phénomène (Longatti et Tooze, 2009) : (1) une constitution par apport de lipides sous forme de micelles (synthèse *de novo*), (2) une constitution par apport de vésicules transportées à travers le cytoplasme, (3) un système de fusion de citernes membranaires, et (4) l'extension d'une membrane préexistante associée à un organe.

Chaque hypothèse implique l'intervention de mécanismes communs, identifiés pour participer à certaines étapes du processus autophagique comme les protéines à domaine N-BAR (Bif-1), les deux systèmes *ubiquitin-like*, et de mécanismes distincts, permettant pour certaines d'expliquer l'existence de structures particulières comme les citernes Atg9 (Mari et Reggiori, 2010).

4. Maturation des autophagosomes et fusion avec les lysosomes

La maturation correspond à la fusion des autophagosomes nouvellement formés avec les lysosomes afin d'acquérir les propriétés et les enzymes nécessaires à la dégradation de leur contenu. Alors que chez la levure, cette maturation est présumée s'accomplir en une étape unique de fusion de l'autophagosome avec la vacuole, dans les cellules mammaliennes, elle constitue un processus séquentiel de fusion avec divers composants de la voie lysosomale (Eskelinen, 2005). Après leur formation, les autophagosomes sont à même de fusionner avec des endosomes précoces puis matures (Tooze et al., 1990; Liou et al., 1997) ou avec des MVBs. Les autophagosomes peuvent également fusionner entre eux (fusion homotypique) (Jahreiss et al., 2008). L'étape obligatoire de la

maturation autophagosomale réside dans les processus de fusion avec les lysosomes (fusions hétérotypiques) donnant naissance aux auto(phago)lysosomes.

Initialement, les autophagosomes ont le même pH que le cytosol, celui-ci va s'acidifier au cours de la maturation par l'acquisition de pompes à protons vacuolaires dépendantes de l'ATP. Ainsi, on assiste à un abaissement du pH du contenu des vésicules autophagiques qui est de l'ordre de 6,4 dans les autophagosomes (chez la souris), alors proche du pH du cytoplasme environnant pour atteindre 5,7 dans les amphisomes (Tanaka et al., 2000). Ces différentes étapes de fusion permettent également l'incorporation de protéines de la membrane lysosomale et l'enrichissement de la membrane en cholestérol, lipide abondant dans ces membranes. Ceci permet aux hydrolases obtenues lors des fusions terminales de dégrader le contenu des vésicules autophagiques de même que leur(s) membrane(s) interne(s) (Eskelinen, 2005).

a. Flux autophagique

La cinétique des événements depuis la formation du phagophore jusqu'à la dégradation du matériel initialement séquestré au sein des lysosomes définit le flux autophagique. Ce flux autophagique correspond à la résultante du taux de formation des autophagosomes et du taux de leur élimination par dégradation lysosomale. La présence d'un nombre défini d'autophagosomes dans la cellule à un instant donné est donc conditionnée par l'existence de ce flux autophagique (Nixon et Yang, 2011). Ce flux peut être perturbé en cas d'anomalies de la maturation autophagosomale et conduire à une accumulation d'autophagosomes immatures contenant du matériel non ou partiellement dégradé dans le cytoplasme. De nombreuses substances sont connues pour bloquer le flux autophagique. C'est le cas de la bafilomycine A1 (bafilomycine), un inhibiteur des pompes à protons vacuolaires (H^+V -ATPases) qui empêche l'acidification des vésicules autophagiques et donc l'action des hydrolases acides lysosomales (Yamamoto et al., 1998). Il existe néanmoins une controverse au sujet de cette substance puisque son utilisation affecte autant voire plus les voies endosomales que l'autophagie (Klionsky et al., 2008). La leupeptine et la pepstatine, des inhibiteurs des cathepsines (protéases lysosomales) sont également utilisées pour bloquer le flux autophagique.

b. Convergence des voies endosomales et de la voie autophagique

La formation des amphisomes semble être une étape nécessaire pour la fusion terminale avec les lysosomes puisque l'invalidation de protéines impliquées dans le fonctionnement de la voie endosomale conduit à des anomalies de la maturation autophagique. Ceci marque la convergence

entre la voie autophagique et les voies endosomales, en particulier, l'endocytose dépendante d'un récepteur et la voie de formation des MVBs. *In vitro* il a été montré que les autophagosomes fusionnaient avec la même efficacité avec tous les types d'endosomes testés (Morvan et al., 2009).

Pour la levure, Vps4, protéine de la famille des protéases AAA-ATPases, a été identifiée en tant que protéine intervenant dans les deux voies (Klionsky et Ohsumi, 1999). Elle est impliquée dans le transport des endosomes à la membrane plasmique et aux lysosomes. Elle est nécessaire pour la formation des autolysosomes, de même que son homologue murin, SDK1 suggérant que le transport des endosomes tardifs est requis pour la maturation autophagosomale (Shirahama et al., 1997; Nara et al., 2002). De la même façon, la suppression de sous-unités fonctionnant dans le complexe COPI ou coatomère, impliqué dans le trafic des endosomes ainsi que dans le transport RE - appareil de Golgi - membrane plasmique (voie sécrétoire) conduit à l'accumulation d'autophagosomes et d'amphisomes incapables de devenir des autolysosomes (Razi et al., 2009).

Un autre lien entre autophagie et voie sécrétoire a été mis en évidence de façon surprenante grâce à la génération d'une souche de souris invalidées pour Atg4B et qui présentent des défauts importants au cours du développement de l'oreille interne et en particulier dans la formation des otolithes, indispensables dans la perception des mouvements d'accélération linéaire et dans le maintien de l'équilibre. La synthèse et la mise en place de ces structures à base de carbonate de calcium est effectivement directement dépendante de la voie sécrétoire et est associée aux anomalies de l'autophagie provoquée par l'absence d'Atg4B. Les fonctions de deux protéines majeures de cette voie sont perturbées (AP-3 ; *Adaptor Protein 3* et BLOC-1 ; *Biogenesis of Lysosome-related Organelle Complex 1*) ; (Cabrera et al., 2010; Mariño et al., 2010; Till et Subramani, 2010).

c. Les petites GTPases de la famille Rab

Les petites GTPases de la famille Rab fonctionnent au cours du trafic cellulaire et sont impliquées dans le rapprochement et l'accolement de deux structures membranaires afin que leur fusion se produise. Les processus de fusion nécessitent l'action de différents mécanismes moléculaires autres, spécifiques à chaque type de fusion, faisant généralement intervenir les protéines des complexes SNARE (voir plus loin). Dans le cas du trafic endolysosomal (comprenant également le trafic autophagosomal), interviennent principalement Rab5 et Rab7. Rab5 constitue un marqueur des endosomes précoces car il doit être échangé avec Rab7 pour que la maturation de ces derniers en endosomes tardifs puisse s'accomplir (Wang et al., 2011). Rab7 est associée aux

endosomes et aux lysosomes et facilite, à travers son interaction avec des effecteurs, la maturation endosomale à travers la régulation de leur mouvement le long du cytosquelette (microtubulaire) et permet ainsi le rapprochement des endosomes et des lysosomes.

L'invalidation de Rab7, dont l'expression est augmentée au cours de la maturation lysosomale (Jäger et al., 2004) provoque une accumulation de vésicules autophagiques au stade d'amphisomes (Gutierrez et al., 2004). Rab7 et Rab9, marqueurs spécifiques des endosomes tardifs, sont également co-localisés avec Atg9 (Young et al., 2006). Rab7 n'est pas indispensable pour les événements précoces de formation autophagosomale et les étapes de fusion avec les endosomes précoces. En revanche, la suppression de l'activité de cette protéine retarde la maturation autophagosomale en agissant probablement lors de la fusion entre autophagosomes/amphisomes et lysosomes (Jäger et al., 2004). Une mutation de Rab11 inhibe les processus de fusion entre autophagosomes et MVBs ce qui n'est pas le cas de Rab7 (Fader et al., 2008). De même, Rab24, dont le rôle est mal connu, est associée à la maturation des autophagosomes. Cette protéine est co-localisée avec LC3-II dans des motoneurones lésés et son expression est augmentée en cas d'inhibition du protéasome. Rab24 pourrait avoir un rôle dans la dégradation protéique et en particulier dans le transport des vésicules autophagiques matures vers les lysosomes (Egami et al., 2005) et pouvait également être co-localisée avec GABARAP (Munafó et Colombo, 2002).

d. Les protéines SNARE

Les protéines des complexes SNARE (*Soluble N-ethyl-maleimide sensitive factor Attachment protein Receptor*) sont des protéines ancrées aux membranes qui arbitrent les processus de fusion vésiculaire. Selon la membrane où elles sont localisées, ces protéines peuvent être classées en t-SNARE (*target*) et v-SNARE (*vesicle*).

La mutation de l'homologue murin de Vti1 (Vti1b) retarde la fusion autophagosomale dans les hépatocytes de façon dépendante du NSF (Ishihara et al., 2001). Chez *A.thaliana*, VTI12 est impliquée dans la fusion des autophagosomes avec la vacuole (Surpin et al., 2003). Chez la drosophile, Car/Vps33A, appartenant à la famille des protéines SM (*Sec1/Munc18-related proteins*) est également impliquée dans la maturation autophagosomale. La perte de fonction de cette protéine essentielle (sa suppression est létale) provoque la dégénérescence de structures telles que les photorécepteurs et les ailes de ces animaux (Akbar et al., 2009). Chez la levure, cette protéine fonctionne au sein du complexe HOPS (*Homotypic Vacuolar Protein Sorting*), effecteur de Ypt7 (dont l'homologue mammalien est Rab7), est nécessaire pour la fusion entre autophagosomes et

vacuoles. Dans cet organisme, l'importance des SNAREs Sec17, Sec18, de Vam3, Vam7 et Ykt6 pour la maturation autophagique a également été démontrée (Klionsky, 2005).

Chez les mammifères, la fusion des autophagosomes avec les MVBs pour former des amphisomes est dépendante de l'homologue mammalien de Vam3 : VAMP3 ou cellubrévine (v-SNARE). Cette protéine n'est en revanche pas nécessaire pour la formation des autolysosomes, contrairement à une autre v-SNARE, VAMP7 (Fader et al., 2009).

e. Les complexes ESCRT

La machinerie ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*), formée par les complexes ESCRT 0, I, II, et III est responsable de la formation des MVBs en reconnaissant des protéines substrats *trans*-membranaires généralement mono-ubiquitinylées ou ubiquitinylées par de courtes chaînes composées de deux ou trois monomères d'ubiquitine (Fader et Colombo, 2009). L'implication de différentes protéines fonctionnant au cours de la formation des MVBs dans la maturation autophagosomale montre qu'il existe des liens étroits entre ces deux voies. En outre, dans les cellules où les MVBs peuvent devenir des vésicules excrétrices, l'induction de l'autophagie les détourne de leur destinée et provoque leur fusion avec les lysosomes (Fader et Colombo, 2009).

Hrs est l'une des protéines faisant partie du complexe ESCRT-0. Lorsqu'elle est supprimée dans le cerveau de souris, celles-ci présentent une importante perte des neurones pyramidaux de la région CA3 de l'hippocampe associée à une apparition d'agrégats de protéines ubiquitinylées qui sont co-localisés avec p62 et des récepteurs au glutamate (GluR1 et NR2B), ainsi qu'une augmentation de l'expression de GFAP dans cette partie du cerveau. Ces souris présentent également une perte de la capacité d'apprentissage et des défauts dans l'activité locomotrice (Tamai et al., 2008).

Il semble exister un lien direct entre des anomalies dans le fonctionnement des complexes ESCRT et des pathologies neurodégénératives (démences fronto-temporales, SLA).

f. Les présénilines

La préséniline 1 (PS1) est une holoprotéine *trans*-membranaire ubiquitaire qui agirait dans le cadre d'un certain nombre de fonctions comme l'adhésion cellulaire, l'apoptose, la croissance neuritique, l'homéostasie calcique et la plasticité synaptique (Shen et Kelleher, 2007).

Au niveau cellulaire, elle pourrait fonctionner dans le trafic cellulaire de protéines intégrales. Une partie de 45 kDa environ peut être clivée au niveau du RE provoquant sa réorganisation en

deux chaînes peptidiques. Cette protéine s'associe à la nicastrine, Aph1 (*Anterior Pharynx defective phenotype*) et Pen2 (*Presenilin Enhancer-2*) dans un complexe γ -sécrétase où PS1 constitue la sous-unité catalytique (De Strooper, 2003). Ce complexe est impliqué dans le clivage de la portion *trans*-membranaire de protéines intégrales de type I comme l'APP (*Amyloid Precursor Protein*), Notch ou les cadhérines. Toutes les fonctions associées à PS1 ne sont cependant pas dépendantes de son activité γ -sécrétase. C'est en particulier le cas au cours de la maturation autophagique (Neely et al., 2011; Neely et Green, 2011). Dans ce cadre, PS1 interviendrait en tant que protéine régulatrice de l'adressage de protéines *trans*-membranaires par la voie sécrétoire (Lee et al., 2010). Il a été suggéré que les présénilines puissent interférer dans les mécanismes de la maturation autophagique en agissant sur les voies calciques (Neely et Green, 2011).

Des mutations de la PS1 liées à la survenue de formes familiales de la maladie d'Alzheimer causent une inhibition de la N-glycosylation et la rétention de la sous unité V0a1 de la pompe à protons lysosomale V-ATPase, avec laquelle elle interagit normalement, au niveau du RE, ce qui cause un blocage de l'acidification des vésicules tardives des voies endosomales et lysosomales, leur fusion et la dégradation de leur contenu (Esselens et al., 2004; Lee et al., 2010). La PS1 interviendrait donc en faveur de la maturation autophagique en permettant l'acidification lysosomale.

g. Les protéines LAMP1 et LAMP2

Les protéines LAMP1 et 2 appartiennent à la famille protéique des LAMPs. Ces glycoprotéines *trans*-membranaires de type-I, sont des constituants majeurs des membranes du compartiment lysosomal (Eskelinen, 2006). Elles présentent une extrémité C-terminale cytoplasmique courte (10 à 11 aa), un domaine *trans*-membranaire et un long domaine luminal hautement glycosylé (16 à 20 sites de N- et O-glycosylation) avec une région charnière riche en résidus proline et quatre ponts disulfures contigus. Ces protéines ont une répartition ubiquitaire chez les mammifères (figure 23).

Outre le rôle spécifique de LAMP-2A dans la CMA, les protéines LAMP1 et 2 sont indispensables à la fusion des vacuoles autophagiques avec la membrane lysosomale (Eskelinen et al., 2004). Ces protéines possèdent des rôles en commun pouvant se compenser, elles interviennent dans de nombreux processus physiologiques inhérents à la fonction lysosomale. Cependant, l'activité de LAMP1 semble moins spécifique que celle de son homologue LAMP2. En effet, une déficience en LAMP2 conduit au développement d'une pathologie cardio-musculaire : le syndrome de Danon (Orphanet n°34587 ; OMIM n°300257) caractérisé par une accumulation de

vésicules autophagiques matures (ou non) dans les cellules musculaires squelettiques et cardiaques et un désordre métabolique important (dont l'accumulation de cholestérol non estérifié) (Nishino et al., 2000; Eskelinen, 2006), et observé chez l'animal (souris KO pour LAMP2) (Saftig et al., 2001). La déplétion de LAMP2 est également associée à la pancréatite chronique liée à l'alcool où les cellules pancréatiques lésées sont caractérisées par une nécrose consécutive à une accumulation de vésicules autophagiques (Fortunato et al., 2009).

LAMP1 et 2 sont requises pour les étapes de fusion entre autophagosomes ou amphisomes et lysosomes. Leur suppression bloque l'action de la protéine Rab7 lors de ces étapes de maturation possiblement en provoquant des anomalies au niveau de la composition en cholestérol de ces membranes (Jäger et al., 2004).

Lors de la phagocytose, plusieurs hypothèses ont été émises pour expliquer le mécanisme par lequel LAMP1 et LAMP2 intervenaient dans les processus de maturation. Le lien serait situé entre la fonction des protéines LAMPs, Rab7 et des protéines motrices impliquées dans la motilité rétrograde des lysosomes le long des microtubules, les dynéines. En effet, la suppression de LAMP1 et de LAMP2 cause des anomalies de l'adressage et de l'activation de Rab7 associées à une motilité lysosomale anormale. Ces organites présentent alors une localisation diffuse dans la cellule (Huynh et al., 2007). Néanmoins, la structure des LAMPs, ne permet pas d'expliquer le mécanisme par lequel celles-ci sont impliquées dans le transport vésiculaire (Saftig et al., 2008). Les protéines LAMPs seraient donc des protéines qui permettraient le rapprochement entre les vésicules du système lysosomal (endosomes tardifs, lysosomes) et des vésicules précoces qu'elles soient d'origine endosomale ou autophagique lors des processus de maturation.

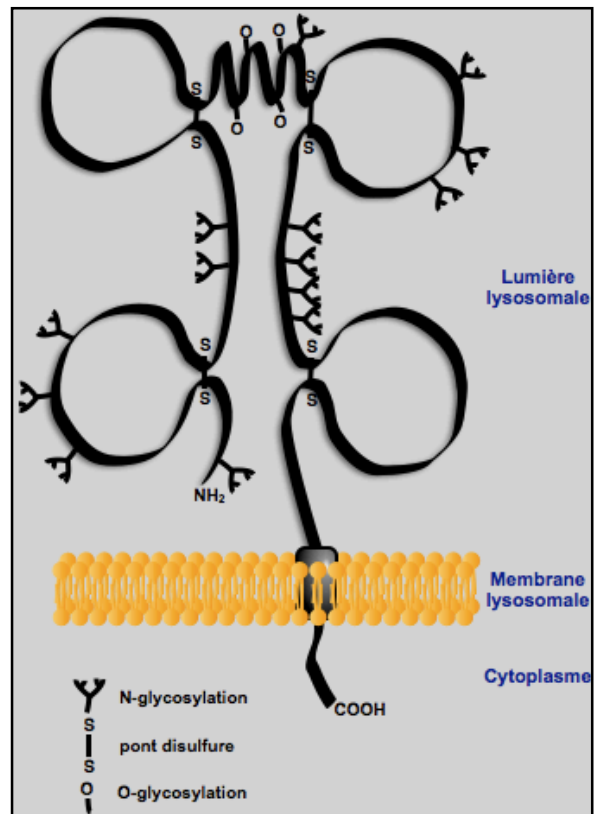


Figure 23 : Représentation de la structure de LAMP2 (D'après Eskelinen)
<http://www.helsinki.fi/bioscience/biochemistry/eskelinen>

h. FYCO1

La protéine FYCO1 (*FYVE et Coiled-coil domain containing*) contenant un domaine LIR, est localisée au niveau des autophagosomes, des endosomes tardifs et des lysosomes. Elle fonctionnerait dans le transport des autophagosomes en formant un lien entre LC3 et les protéines motrices dépendantes de microtubules (Pankiv et Johansen, 2010). Il existerait une compétitivité entre FYCO1 et un effecteur de Rab7 connu pour être impliquée dans la maturation autophagique, RILP (*Rab-Interacting Lysosomal Protein*). RILP régule la morphogénèse endolysosomale et le transport des vésicules vers l'extrémité (-) (transport rétrograde) des microtubules en coopération avec ORP1L [*OSBP (Oxysterol-Binding Protein) Related Protein 1L*] en recrutant le complexe dynéine/dynactine (Wang et al., 2011). Alors que RILP permettrait d'adapter l'autophagosome aux moteurs dynéine *via* une interaction avec la dynactine, FYCO1 serait un adaptateur pour les kinésines induisant un mouvement des autophagosomes dans le sens opposé (transport antérograde) (Pankiv et al., 2010).

i. Hydrolases lysosomales et autres enzymes dédiées à la dégradation

La suppression de l'activité de certaines enzymes lysosomales conduit à une inhibition de la fusion et une accumulation de vésicules autophagiques (autophagosomes et amphisomes) dans le cytoplasme de la cellule. Cet effet est artificiellement obtenu en utilisant des inhibiteurs des cathepsines comme la pepstatine, la leupeptine ou le composé E64. Une autre preuve indirecte est l'étude menée par Renna et al., en 2011 montrant qu'une suppression de l'expression de composants d'un complexe SNARE impliqué dans le transport antérograde affectait l'autophagie en empêchant l'acheminement des cathepsines aux lysosomes (Renna et al., 2011).

III. AUTOPHAGIE ET CYTOSQUELETTE

Le cytosquelette joue un rôle éminemment important dans la conduite du processus autophagique non seulement dans la phase de maturation mais aussi à d'autres niveaux, en particulier au cours de la signalisation et de la nucléation, de la formation de l'autophagosome ainsi que dans la séquestration de certains substrats. Le cytosquelette pourrait donc intervenir dans des mécanismes sélectifs de l'autophagie et en particulier dans le cadre de l'agrégation (voir plus loin).

Le cytosquelette comporte trois types de filaments : les microfilaments (composés de molécules d'actine), les microtubules (polymères de α - et de β -tubuline) et les filaments intermédiaires (composés de trois chaînes polypeptidiques, dont la nature varie en fonction du type cellulaire, enroulées sur elles-mêmes).

2. Filaments d'actine et autophagie spécifique

Reggiori et al., ont montré, en 2005 que les filaments d'actine étaient nécessaires au transport du complexe CVT vers la SPA (Reggiori et al., 2005) et dans les cas d'autophagie spécifique chez la levure (sélection du chargement à séquestrer ; Monastyrska et al., 2009). En revanche, chez les mammifères très peu de données plaident en faveur d'un rôle joué par le cytosquelette d'actine au cours de l'autophagie.

3. Les microtubules

Outre des fonctions dans l'acquisition et le maintien de la forme cellulaire (en particulier au niveau neuronal), les mouvements ciliaires et flagellaires, la division et la différenciation cellulaires, le réseau microtubulaire a un rôle prépondérant dans le trafic cellulaire et en particulier dans le trafic vésiculaire. Les microtubules interviennent dans la conduite du processus autophagique et en particulier au cours des étapes de maturation lorsque les autophagosomes doivent fusionner avec d'autres vésicules de la voie endosomale/lysosomale et nécessitent d'être rapprochés de ces dernières pour que la fusion ait lieu. La plupart des liens existants microtubules et autophagie sont dépendants des dynéines.

Les microtubules sont dans un état permanent d'instabilité dynamique, c'est-à-dire qu'ils sont en constante restructuration par poly/dépolymérisation (figure 24), ce qui leur confère la capacité de s'adapter très rapidement aux besoins de la cellule. La croissance des microtubules se fait par l'assemblage d'hétérodimères déjà constitués de α -/ β -tubuline en protofilaments. Ceux-ci s'associent ensuite par

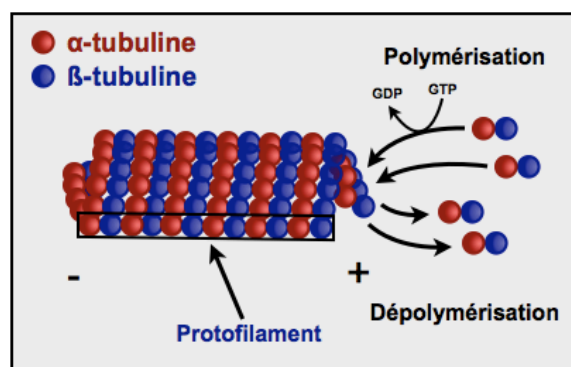


Figure 24: Représentation schématique de la formation des microtubules

12 à 15 pour former une structure cylindrique d'environ 24 nm de diamètre, creuse et non ramifiée constituant le microtubule (Conde et Caceres, 2009; Monastyrska et al., 2009). L'organisation des

dimères de tubuline à l'intérieur des protofilaments est telle que les microtubules sont structurellement polarisés. L'extrémité (-) est ancrée au niveau du MTOC (*Microtubule-Organising Centre*) et l'extrémité (+), plus dynamique, s'étend en direction de la surface cellulaire. La stabilité et les fonctions des microtubules peuvent être régulées par l'acétylation de l' α -tubuline. L'assemblage, le désassemblage et la stabilité des microtubules sont conditionnés par les fonctions de protéines modulatrices classées en trois catégories : (1) les MAP, qui favorisent l'assemblage et la stabilité de ces structures et dont l'affinité pour les microtubules est généralement régulée négativement par phosphorylation, (2) des facteurs déstabilisants dont la fonction est opposée à celle des MAP et (3) des facteurs de nucléation.

Le réseau microtubulaire constitue donc une structure dynamique qui rayonne dans la cellule et fonctionne comme des rails pour le transport de constituants cellulaires. Ce transport est dépendant de deux familles de protéines motrices, parfois appelées « *walking molecules* » nécessitant l'hydrolyse de l'ATP en tant que source d'énergie qui diffèrent sur le plan fonctionnel : les kinésines, responsables du transport antérograde, c'est-à-dire du centre de la cellule vers la périphérie (en direction de l'extrémité (+) microtubulaire) et les dynéines, chargées du transport rétrograde, en direction du centre de la cellule, vers l'extrémité (-).

Les kinésines comportent une « tête » N-terminale possédant l'activité ATPase interagissant directement avec les microtubules, reliée par une structure longue et fine, la « tige », à une « queue » globulaire permettant la liaison spécifique de protéines modulatrices aussi appelées chaînes légères et au chargement à transporter. Au niveau de la tige, sont contrôlés le mouvement et sa direction.

Les dynéines, de taille plus imposante, sont des complexes multimériques composés de chaînes lourdes, intermédiaires et légères. Il existe deux types de dynéines : les dynéines cytoplasmiques, mobiles, impliquées dans les fonctions cellulaires associées au transport de divers constituants et les dynéines axonémales, responsables de la motilité ciliaire et flagellaire (Gibbons, 1996). Les chaînes lourdes, motrices, présentent l'activité ATPase (Carter et al., 2011; Spudich, 2011).

En 2006, Köchl et al, ont mis en évidence que des microtubules intacts facilitaient la formation des autophagosomes et étaient nécessaires à la fusion des vacuoles autophagiques avec les endosomes puis les lysosomes (Köchl et al., 2006). Ils ont également mis en évidence que la vinblastine, alcaloïde issu de la pervenche de Madagascar, agent dépolymérisant (déstabilisant) les microtubules et utilisé en cancérothérapie, induisait le processus autophagique indépendamment des

conditions nutritionnelles cellulaires et de la voie mTOR, et ce, avant qu'un changement perceptible ait lieu au niveau cytosquelettique. De plus, les autophagosomes (mais pas les phagophores) s'associent avec les microtubules et se concentrent près du MTOC. Les microtubules permettraient la mise en place d'une barrière spatiale entre les phagophores et les autophagosomes (Fass et al., 2006).

L'implication du transport lié aux microtubules est confirmée par une étude portant sur les dynéines, qui, lorsqu'elles sont mutées, bloquent l'autophagie (Webb et al., 2004). Le suivi du transport des autophagosomes le long des microtubules a révélé la coexistence de deux modes de fusion autophagosomale : une fusion complète entre deux vésicules et une fusion de type « *kiss-and-run* », c'est-à-dire une fusion partielle au cours de laquelle, l'autophagosome déverse son contenu dans une autre vésicule (Fass et al., 2006; Jahreiss et al., 2008).

L'intérêt porté au rôle des microtubules dans la fusion autophagosomale a masqué leur fonction au cours de la biogenèse autophagosomale. Les fonctions des microtubules au cours de l'autophagie semblent être dépendantes de leur état d'acétylation. En effet, alors que l'acétylation des microtubules (α -tubuline) est nécessaire pour la fusion avec le compartiment endo-lysosomal, les microtubules non-acétylés amélioreraient l'efficacité de la conversion de LC3-I en LC3-II mais ne seraient pas essentiels (Xie et al., 2010). Il apparaît également dans cette étude qu'une faible quantité de microtubules intacts est suffisante pour permettre la survenue des étapes de maturation, ce qui expliquerait les données contradictoires concernant la nécessité des microtubules à l'accomplissement de l'autophagie. Cela est en rapport avec l'existence de deux populations de microtubules : les microtubules dits labiles, extrêmement dynamiques et les microtubules stables, acétylés et détyrosylés associés de façon différentielle avec les protéines impliquées dans la formation et la maturation de l'autophagosome. Ainsi, il apparaît que les microtubules labiles sont associés avec les marqueurs du phagophores (Atg5, WIPI, LC3-I) et les stables avec LC3-II confirmant les constatations relatives au niveau d'acétylation des microtubules (Geeraert et al., 2010). Cette acétylation est en relation avec la régulation autophagique puisque d'une part, l'inhibition de cette acétylation bloque l'induction de l'autophagie suite à un stress nutritionnel et d'autre part, un stress nutritionnel cause une hyperacétylation microtubulaire à l'origine de l'activation de la kinésine-1, de JNK et l'activation autophagique subséquente (Geeraert et al., 2010).

Korolchuk et al., en 2011, ont mis en évidence que les nutriments présents dans les cellules agissaient sur la valeur du pH intracellulaire, celui-ci influençant le recrutement par les lysosomes de protéines impliquées dans leur localisation intracellulaire : ARL8 (*ADP-Ribosylation factor-Like 8*) et KIF2 (*member of Kinesin super-Family protein*). Lorsqu'elles sont localisées aux lysosomes, ces protéines entraînent une relocalisation de ceux-ci à la périphérie de la cellule. Or le complexe mTORC1 existe sous une forme associée aux microtubules et l'activité de ce complexe est modulée par la localisation lysosomale elle-même. Ainsi, lorsque les lysosomes sont placés à la périphérie de la cellule, l'activité de mTORC1 se trouve facilitée. Suite à une privation nutritionnelle, le pH intracellulaire est élevé causant le détachement de ARL8 et de KIF2 des lysosomes qui sont alors transportés le long des microtubules grâce aux dynéines et se retrouvent en position périnucléaire. L'activation de mTORC1 est freinée et toutes les étapes de l'autophagie s'en trouvent stimulées (synthèse et fusions). Des modifications de l'expression d'ARL8, KIF2 ou des dynéines perturbent cette régulation et causent des anomalies du processus autophagique (Korolchuk et al., 2011).

Les chaînes légères de dynéines peuvent interagir avec la protéine AMBRA-1. Cette interaction est directement régulée par l'activité kinase du complexe ULK1-mAtg13-FIP200 actif qui a AMBRA-1 pour substrat (Di Bartolomeo et al., 2010; Fimia et al., 2011). La phosphorylation d'AMBRA-1 permettrait ainsi le recrutement du complexe hVPS34-p150-Beclin-1 au niveau du RE et favoriserait son interaction avec mAtg14 nécessaire pour la nucléation du phagophore (Itakura et Mizushima, 2009; Matsunaga et al., 2009).

IV. AUTOPHAGIE SPÉCIFIQUE

1. Distinction entre autophagie constitutive et autophagie induite par un stress

D'une manière générale, tous les types cellulaires ne présentent pas la même sensibilité envers les différents stress inducteurs de l'autophagie. Par exemple, les neurones sont très peu sensibles à la privation nutritionnelle *in vivo* par rapport aux autres types cellulaires de l'organisme (Mizushima et Kuma, 2008). Dans le cas de la carence en aa, la situation sera différente selon que l'on se place au niveau des cellules musculaires squelettiques et cardiaques où seule la privation en leucine est inductrice ou dans les hépatocytes où plusieurs aa seront alors déterminants (Mortimore et al., 1972; Woodside et Mortimore, 1972). A l'inverse, aucun ne le sera dans certaines cellules

pancréatiques (Cuervo, 2004). L'autophagie induite en cas de stress est donc présentée comme un mode de dégradation plutôt aspécifique séquestrant aléatoirement des portions cytoplasmiques contenant des protéines et/ou des organites dans le but de fournir des matières premières à la cellule qui seront ensuite utilisés afin de fournir de l'énergie et pour la synthèse de nouveaux constituants lui permettant de s'adapter et de survivre (Lum et al., 2005; Nakatogawa et al., 2009). Cependant une étude menée en 2008 montre que suite à une déprivation en aa de cellules de la lignée MCF7, l'autophagie ainsi induite dégradait les protéines cellulaires selon un ordre séquentiel, c'est-à-dire que disparaissent dans un premier temps les protéines libres cytosoliques et les protéines protéasomales suivies par les protéines ribosomales, mitochondriales puis celles de la membrane du RE et enfin les protéines nucléaires (Dengjel et al., 2008). Donc, après une privation en aa, les différentes formes d'autophagie spécifique pourraient être induites séquentiellement.

L'autophagie constitutive est quant à elle responsable de la dégradation de constituants surnuméraires, inutiles ou anormaux tels que des protéines mal repliées, (Bernales et al., 2006; Yorimitsu et al., 2006; Yorimitsu et Klionsky, 2007) ou des mitochondries altérées, sources d'ERO. L'autophagie se doit alors d'avoir un certain niveau de spécificité puisqu'il ne s'agit pas ici d'une situation « d'urgence » mais de l'entretien des conditions physiologiques optimales dans le but de maintenir l'homéostasie protéique et de garder la cellule dans un état fonctionnel. C'est sur ce point que des différences avec l'autophagie induite apparaissent. Ceci nécessite l'intervention de protéines dites adaptatrices qui permettent la séquestration de substrats spécifiques dans l'autophagosome en formation à l'instar de p62/SQSTM1 (Douglas et Dillin, 2010 ; Johansen et Lamarck 2011). Mis à part le mode de sélection du substrat, c'est-à-dire avec ou sans l'intervention de protéines adaptatrices, il y a peu de données concernant une distinction entre ces deux versants de l'autophagie. Les acteurs intervenant dans la formation de l'autophagosome, ainsi que dans la poursuite de ce processus catabolique semblent être identiques. Jusqu'à aujourd'hui, il ne semble pas exister de différence majeure entre autophagie constitutive et autophagie induite concernant le strict déroulement de cette voie.

Cette sélectivité de l'autophagie basale existe déjà chez les eucaryotes inférieurs à moindre échelle, ce système s'étant complexifié avec l'évolution. Chez la levure, plusieurs types de macroautophagie ont été décrits. Tous ont en commun la mise en place de la SPA regroupant les produits de 17 gènes *Atg*. Ils diffèrent par l'intervention de protéines particulières permettant d'assurer une certaine sélectivité envers des substrats particuliers. Ainsi, en cas de dégradation spécifique, le chargement séquestré dans les vésicules autophagiques contient très peu de matériel

cytoplasmique accompagnant l'organite ou les protéines ciblées contrairement à la macroautophagie « en bloc » qui séquestre à la fois matériel cytoplasmique, protéines et/ou organite(s). Le processus de CVT qui a lieu en période végétative, en présence de nutriments, peut-être considéré comme une forme de macroautophagie spécifique (Lynch-Day et Klionsky, 2010). Cette forme est celle qui se rapproche le plus de l'autophagie spécifique mammalienne. Un des points communs fondamentaux existant entre la voie CVT fongique et l'autophagie spécifique, réside dans un système basé sur deux protéines impliquées dans la reconnaissance du substrat : une protéine adaptatrice et une protéine « récepteur » (Yamamoto et Simonsen, 2011). Ces protéines spécifiques ne sont pas nécessaires au déroulement de l'autophagie induite comme Atg11 et Atg19 au cours de la voie CVT ou Atg32 dans le cas de la mitophagie mais sont indispensables pour la séquestration du chargement.

2. Acteurs et voies : importance des récepteurs autophagiques

a. Le domaine LIR/LRS

Dans les cellules de mammifères, la protéine réceptrice la mieux caractérisée est p62/SQSTM1 pour laquelle le motif peptidique LIR/LRS permettant son interaction avec LC3 a été identifié (Pankiv et al., 2007; Komatsu et al., 2007b). La forme mature de LC3 étant la forme pouvant se lier préférentiellement à p62, probablement par un mécanisme de changement de conformation suite à la lipidation de LC3-I pour former LC3-II (Bjørkøy et al., 2005; Pankiv et al., 2007; Lim et al., 2011). Cette protéine adaptatrice possède aussi un domaine UBA qui permet la dégradation spécifique de substrats altérés ubiquitinylés aussi variés que les agrégats protéiques, les mitochondries, les bactéries intracellulaires, les protéines ribosomales... (Bjørkøy et al., 2006; Zheng et al., 2009; Deretic, 2010; Narendra et al., 2010). L'existence de motifs LIR sur une protéine implique qu'elle soit elle-même sélectivement dégradée par autophagie.

Les portions N-terminales des protéines de la famille Atg8 présentent deux poches hydrophobes, appelées site W et site L, contenant respectivement des résidus leucine et phénylalanine conservés, situées de part et d'autre d'un feuillet β (feuillet β_2) et entourées d'aa basiques conservés, constituant le site d'interaction avec les résidus du motif WXXL du domaine LIR (Noda et al., 2010). Les résidus W et L sont profondément enfouis dans les poches hydrophobes tandis que les

résidus acides X interagiront grâce à des liaisons ioniques avec des aa basiques conservés (lysines ou arginines) situés autour des poches hydrophobes (Noda et al., 2008).

b. Les différents types d'autophagie spécifique

L'autophagie est de nature « omnivore », aussi, dans le cas de la forme spécifique, en fonction du type de substrat pris en charge, on distingue différents types d'autophagie (Klionsky et al., 2007). On parlera alors de mitophagie (dégradation autophagique des mitochondries), de pexophagie (prise en charge des peroxysomes ; Iwata et al., 2006), de réticulophagie (séquestration du RE) (Bernales et al., 2006), de xénophagie (dégradation de bactéries intracellulaires et de virus), de ribophagie (protéines ribosomales) (Kraft et al., 2008) et enfin d'agrèphagie. Celle-ci correspond à la dégradation autophagique de protéines anormalement repliées ou d'agrégats protéiques. La prise en charge par p62 de la protéine ribosomale rpS30 (qui possède une activité microbicide), lorsque cette dernière est ubiquitinylée constitue un moyen de défense envers *Mycobacterium tuberculosis*, agent pathogène de la tuberculose. La séquestration de cette protéine dans les autophagosomes puis leur fusion avec des phagosomes ayant capturé le bacille permet à la rpS30 d'agir directement sur la bactérie (Ponpuak et al., 2010; Ponpuak et Deretic, 2011). Cela signifie que l'autophagie n'a pas systématiquement lieu dans un but catabolique direct mais peut être intégrée à une réponse cellulaire plus complexe généralement en faveur de la survie cellulaire.

Iwata et al. ont mis en évidence en 2005 que la machinerie autophagique permettait de dégrader sélectivement les peroxisomes (pexophagie) dans le foie de rats (Iwata et al., 2005). Ceci implique une reconnaissance spécifique de ces organites et souligne le rôle de l'autophagie dans la régulation et le contrôle du *pool* d'organites dans le cytoplasme cellulaire. Dans chaque cas, une protéine généralement située au niveau membranaire de l'organite ciblé est reconnue par un récepteur autophagique.

NDP52 (*Nuclear Dot Protein of 52 kDa*) est un récepteur autophagique qui, grâce à un domaine UBA reconnaît des bactéries ubiquitinylées (comme *Salmonella typhimurium*) et peut induire l'autophagie pour la dégradation de l'agent pathogène.

Dans le contexte de la mitophagie, l'élément déclencheur est une dissipation du potentiel membranaire mitochondrial qui conduit à la séquestration de l'organite lésé par l'intermédiaire de la protéine réceptrice Nix/BNIP3L. La mitophagie serait une réminiscence de la xénophagie pour des organismes antérieurs sur le plan de la phylogenèse (Deretic, 2010b).

c. p62/SQSTM1/A170

i. Structure

Originellement, p62 a été identifiée en tant que protéine interagissant avec les Protéines Kinases C atypiques (aPKC) (Park et al., 1995; Vadlamudi et al., 1996), la PKC ζ et la PKC λ /i, d'où son nom de ZIP (*Zeta PKC-Interacting Protein*) chez le rat (Gong, 1999). Cette protéine est retrouvée sous le nom d'A170 chez la souris et de Ref(2)P [*Refractory to Sigma P (Ref(2)P/CG10360)*] chez la drosophile (Puls et al., 1997; Nezis et al., 2008) mais n'est pas conservée dans le règne végétal ni au niveau fongique (Komatsu et Ichimura, 2010).

p62 est aussi une protéine adaptatrice pour le système ubiquitine/protéasome, sa séquence peptidique comprenant un domaine UBA (Lee et al., 1998). Elle contient également un domaine PB1 (*Phox et Bem1p*) d'homo-oligomérisation, suivi d'un domaine en doigt de zinc ZZ, d'un domaine de liaison à TRAF6 (*Tumour Necrosis Factor - TNF Receptor Associated Factor 6*), de deux séquences PEST (riches en proline P, acide glutamique E, sérine S et thréonine T) puis les

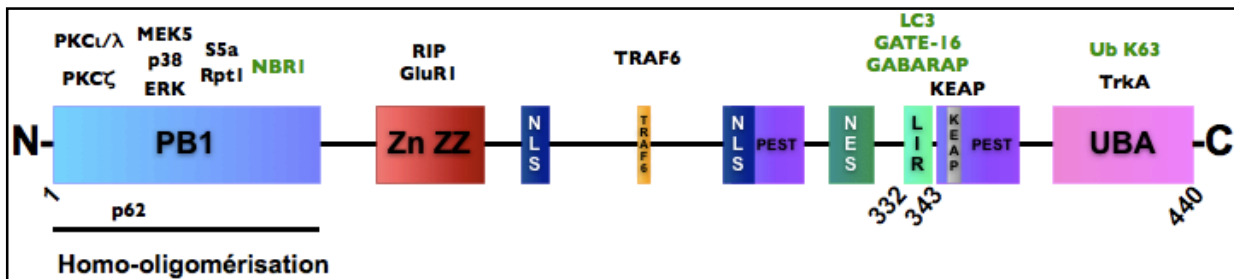


Figure 25 : Structure protéique de p62/SQSTM1

p62 possède un domaine d'interaction protéique de type PB1 en position N-terminale grâce à auquel elle peut s'homo-oligomériser ou s'associer à une autre impliquée dans la dégradation autophagique spécifique, NBR1. Cette région est suivie d'un domaine en doigt de zinc ZZ (ZnZZ). p62 peut se lier aux protéines de la famille LC3 au niveau de sa séquence LIR. En position C-terminale est retrouvé le domaine d'interaction avec les protéines ubiquitinylées UBA. En outre, p62 contient deux séquences PEST, deux motifs de localisation nucléaire (NLS) et un signal d'export nucléaire (NES). Elle interagit avec TRAF6 et KEAP grâce à des domaines d'associations dédiés. Sont représentées en vert les séquences liées directement au rôle de p62 au cours de l'autophagie spécifique.

domaines LIR et UBA à l'extrémité carboxy-terminale. p62 possède également deux séquences de localisation nucléaire (NLS) et une séquence d'export nucléaire lui permettant de faire la navette entre noyau et cytoplasme (Pankiv et al., 2010a; b ; figure 25).

ii. p62 et signalisation cellulaire

- Modifications post-traductionnelles

p62 est une phosphoprotéine, substrat de la CDK1, phosphorylée en phase précoce de la mitose, ce qui est nécessaire pour l'efficacité du complexe cdk1/cyclinB1 à ce stade. La phosphorylation de

p62 en T269 et S272 préviendrait la dégradation de la cycline B1 par le protéasome ralentissant ainsi la sortie de la mitose (Linares et al., 2011). Il existe un troisième site de phosphorylation, en S266 dont la modification est inhibitrice pour l'import nucléaire de p62 (Pankiv et al., 2010b).

- *Interactions multiples de p62*

Parmi les fonctions initialement identifiées de p62 figure son rôle en tant que protéine adaptatrice entre les aPKC et leurs substrats. Chez le rat, Gong et al., ont montré en 1999 que ZIP, l'homologue de p62, permettait la phosphorylation de la sous-unité Kv β 2 par la PKC ζ en fonctionnant en tant qu'adaptateur entre ces deux protéines. Kv β 2 est une sous-unité de canaux potassiques au niveau neuronal et dont la fonction est importante pour le contrôle de l'excitabilité neuronale (Gong, 1999). Au niveau de l'hippocampe, p62 interviendrait au cours de la potentialisation à long terme (LTP : *Long Term Potentiation*) en permettant la phosphorylation de la sous-unité GluR1 du récepteur à l'AMPA (acide α -amino-3-hydroxy-5-méthyl-4-isoxazole propionique) par une aPKC (Jiang et al., 2009). Cette phosphorylation permet l'adressage du récepteur au niveau de la vésicule synaptique. Dans ce cas, l'interaction entre p62 et GluR1 se fait au niveau de la région ZZ de p62 et la deuxième boucle cytoplasmique (L2-3) de GluR1. La suppression de p62 chez la souris cause un blocage de la LTP.

p62 interagit avec TRAF6, une ubiquitine-ligase de type RING (*Really Interesting New Gene*) catalysant la formation de polymères d'ubiquitine liés en K63. p62 peut aussi se lier avec une enzyme de dé-ubiquitination spécifique des ubiquitines liées en K63, CYLD (Cylindromatose) et régule leurs activités (Wooten et al., 2008). De par ses capacités de liaison avec les aPKC d'une part et avec TRAF6 d'autre part, p62 est impliquée dans la régulation de la voie de signalisation du facteur de transcription NF- κ B (*Nuclear Factor Kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Duran et al., 2008). p62 module également la voie NF- κ B en interagissant *via* son domaine PB1 avec la MAPK MEKK3 (MAP/ERK Kinase Kinase 3) (Nakamura et al., 2010) ; et semble constituer un carrefour entre diverses autres voies de signalisation cellulaire (Moscat et Diaz-Meco, 2009). Ainsi, en réponse à la fixation de cytokines (TNF α ; *Tumour Necrosis Factor α* et IL-1 β ; Interleukine 1 β) sur leurs récepteurs multimériques comportant la protéine RIP (*Receptor Interacting Protein*) à laquelle p62 peut se lier grâce à son domaine PB1 (Kawai et al., 2008), p62 est impliquée dans la réponse inflammatoire en conduisant à l'activation de la p38^{MAPK} avec laquelle elle interagit également.

Alors que dans les cellules cancéreuses, p62 favorise la survie cellulaire en participant à la modulation de la voie NF- κ B, elle peut intervenir dans le déclenchement de l'apoptose suite à la fixation d'un ligand sur les récepteurs de mort DR5 et DR6 (*Death Receptor*), qui par l'intermédiaire du complexe DISC (*Death-Inducing Signalling Complex*) conduit à l'ubiquitinylation de la caspase 8 par la *cullin3-based ubiquitin-ligase* puis à son oligomérisation grâce à une interaction directe avec p62 (Jin et al., 2009).

Enfin, de manière dépendante de l'autophagie, p62 est impliquée dans la régulation négative de la voie Wnt, voie jouant des rôles au cours de l'embryogenèse, du renouvellement tissulaire et de la tumorigenèse. p62, en favorisant l'agrégation et l'ubiquitinylation de Dvl, facilite la dégradation de cette protéine, contenant par ailleurs un motif LIR, par autophagie (Gao et al., 2010; Gao et Chen, 2011).

- *p62 et stress oxydatif*

Lorsque l'activité autophagique est abolie dans les foies de souris KO pour Atg7, p62 est accumulée au sein d'inclusions protéiques et ceci est associé à une induction robuste de l'expression de protéines anti-oxydantes et une accumulation de Nrf2 dans le noyau suggérant un rôle de p62 dans ce type de réponse.

L'expression de p62 est rapidement induite suite à un stress protéotoxique (comme une inhibition du protéasome, ou la surexpression d'une protéine mutante ayant propension à s'agréger) ou à un stress oxydatif (Lee et al., 1998; Moscat et Diaz-Meco, 2009; Pankiv et al., 2010b). Le promoteur du gène codant p62/SQSTM1 contient un élément de réponse aux antioxydants (ARE ; *Antioxidant Response Element*) (Jain et al., 2010) qui est activé par la fixation du facteur de transcription Nrf2 (*Nuclear factor erythroid 2-Related Factor 2*) dont l'activité est induite suite à un stress oxydant. En conditions physiologiques, Nrf2 est lié à Keap1 (*Kelch-like ECH-Associated Protein 1*) ce qui permet sa dimérisation. Ceci conduit à l'ubiquitinylation et la dégradation de Nrf2 par l'intermédiaire de l'ubiquitine-ligase culline 3, (Komatsu et al., 2010). En cas de stress oxydant, l'oxydation de Keap1 diminue son interaction avec Nrf2 qui peut alors être transloquée dans le noyau et stimuler l'expression de p62 (Lee et al., 1998). En retour, p62 favorise la signalisation Nrf2 par une boucle de régulation positive en interagissant directement avec Keap1, ce qui conduit à sa dégradation par autophagie (Jain et al., 2010). p62 est donc placée aux deux extrémités de cette chaîne, elle intervient dans l'induction de la réponse au stress oxydatif et est induite par ce type de stress. De façon surprenante, les lésions apparaissant suite à la suppression de l'autophagie dans le

foie de souris résulteraient de l'accroissement des niveaux de Nrf2 (dû à l'accumulation de p62) puisque ce phénotype est allégé quand l'expression de Nrf2 est abolie (Komatsu et al., 2010). Dans une variété de maladies neurodégénératives, l'expression de p62 est réduite suite à l'oxydation de son promoteur, cette diminution étant donc corrélée au stress oxydatif (Du et al., 2009b; a).

p62 semble favoriser la survie cellulaire suite à un stress oxydatif de façon indépendante de l'autophagie en agissant positivement sur la voie Akt en favorisant les dissociations entre les protéines 14-3-30 de la PDK1 (*3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase-1*) et la PKC ζ d'Akt par liaison directe (Heo et al., 2009).

iii. p62, un récepteur autophagique modèle

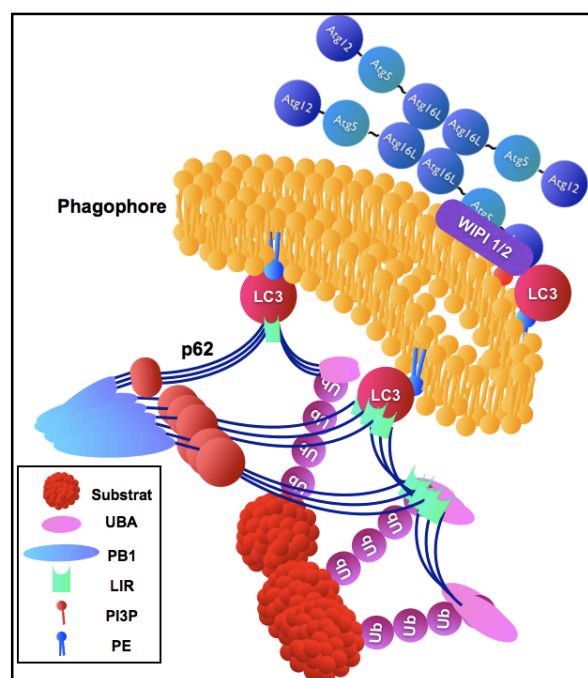


Figure 26 : Schéma du fonctionnement de p62 en tant que récepteur autophagique
 p62 reconnaît les substrats ubiquitinylés (protéines, agrégats protéiques, mitochondries, bactéries ...) grâce à son domaine UBA et s'homooligomérise au niveau N-terminal (motif PB1). Le domaine LIR se lie préférentiellement à la forme lipidée de LC3, permettant d'ancrer le substrat dans le phagosome en formation et la séquestration qui s'en suivra dans l'autophagosome.

L'identification du domaine LIR permettant l'interaction entre p62 et LC3 (Komatsu et al., 2007a; Pankiv et al., 2007) a permis de déterminer la base de fonctionnement d'un mécanisme commun aux voies autophagiques spécifiques. L'existence d'une telle spécificité était déjà soupçonnée, en particulier dans le cas de la dégradation des mitochondries altérées suite à la mise en place du pore de perméabilité mitochondrial conduisant à la dépolarisation de ces organites (Lemasters et al., 1998; Elmore et al., 2001) mais les modalités de sélection et d'adressage des substrats étaient inconnues (Kim et Klionsky, 2000; Klionsky et al., 2007). L'analyse extensive du fonctionnement de p62 a conduit à l'identification des récepteurs autophagiques faisant de p62 la molécule canonique (figure 26).

Du fait d'une conformation particulière de son domaine UBA, la protéine p62 va préférentiellement se lier *in vivo*, aux protéines conjuguées à une chaîne d'ubiquitine liée en K63 (Tan et al., 2007; Long et al., 2008; Wooten et al., 2008). Cependant, *in vitro*, l'affinité de ce domaine UBA est pratiquement identique pour les dimères d'ubiquitine, qu'ils soient liés en K48 et

en K63 (Long et al., 2008). La greffe d'une seule ubiquitine sur une protéine serait malgré tout suffisante pour sa prise en charge par p62, en particulier dans le cadre de la pexophagie (Kim et al., 2008). Parallèlement, le domaine LIR de p62 présente une meilleure affinité pour LC3 par rapport à GABARAP et GATE-16 (Komatsu et Ichimura, 2010) et l'interaction entre p62 et LC3 est indispensable pour la dégradation spécifique des protéines « capturées » par p62 (Tung et al., 2010).

p62 est impliquée dans la dégradation spécifique de bon nombre de substrats comme les bactéries, les peroxysomes et les mitochondries. Dans le contexte de la dégradation protéique, p62 fonctionne en association avec d'autres protéines nécessaires à cette voie particulière appelée agréphagie qui correspond aussi bien à la dégradation de protéines anormales que d'agrégats protéiques. En outre, la suppression de l'expression de p62 chez la souris cause des troubles métaboliques (obésité) associés à l'apparition d'inclusions neuronales de protéines ubiquitinylées, dont la protéine tau hyperphosphorylée, et à une neurodégénérescence (Ramesh Babu et al., 2008; Tan et al., 2007).

3. Agréphagie : p62 et ses partenaires

a. NBR1, deuxième récepteur autophagique

NBR1 est une protéine d'une architecture très proche de p62 bien que partageant une très faible homologie de séquence avec elle (Lamark et al., 2003). NBR1 est ainsi composée d'un domaine d'interaction PB1 amino-terminal lui permettant d'interagir avec les aPKC et p62 mais pas de s'homo-oligomériser, une séquence de type ZZ, et d'une séquence UBA C-terminale. En outre, elle possède deux motifs d'interaction avec les protéines de la famille Atg8 : LIR2 (540-636) et LIR1 (727-738), un motif unique appelé NBR1-box et deux domaines CC situés de part et d'autre du domaine LIR2 (Kirkin et al., 2009a; Waters et al., 2009). NBR1 peut lier, *via* son domaine UBA C-terminal, des protéines ubiquitinylées de manière plus large que p62 car elle présente une meilleure affinité pour les polymères d'ubiquitine liés en K63 et pour ceux liés en K48 (Waters et al., 2009). NBR1 est un substrat spécifique de l'autophagie et sa dégradation est indépendante de l'intervention de p62 (Kirkin et al., 2009a).

b. Alfy, adaptateur autophagique ?

Alfy (blue cheese chez la drosophile) est une grosse protéine de 400 kDa conservée au cours de l'évolution, bien qu'elle ne soit pas retrouvée chez *S. cerevisiae*. Que ce soit dans les cellules de mammifères ou celles d'insectes, ces deux protéines sont importantes pour la dégradation de

protéines anormales et/ou mal repliées (Simonsen et al., 2004; 2007). Alfy (ou WDFY3) a été découverte en tant que protéine pouvant être co-localisée avec LC3 et Atg5.

Structurellement, cette protéine comprend un domaine d'homologie à la pleckstrine (PH, *Pleckstrin Homology*), un domaine d'interaction BEACH (*Blue Cheese And Chédiak-Higashi*¹⁷), un domaine FYVE de liaison au PI(3)P et cinq répétitions WD40 (Knaevelsrud et Simonsen, 2010). En conditions physiologiques normales, Alfy est une protéine nucléaire localisée en périphérie de l'enveloppe nucléaire (Clausen et al., 2010). Grâce à ses signaux d'export et de localisation nucléaires, p62, qui semble faire continuellement et à haute fréquence la navette entre cytoplasme et nucléoplasme, recrute Alfy en conditions de stress (Clausen et al., 2010; Pankiv et al., 2010b). L'interaction entre Alfy et p62 se fait au niveau du domaine BEACH d'Alfy mais le site au niveau de p62 n'a pas été identifié. p62 et Alfy sont toutes les deux indispensables à l'agrégation et dépendantes l'une de l'autre bien qu'Alfy ne soit pas nécessaire à la dégradation spécifique de p62 par autophagie (Filimonenko et al., 2010; Knaevelsrud et Simonsen, 2010). Grâce à sa suite de motifs WD40, Alfy peut s'associer à Atg5 et donc à la machinerie centrale autophagique : Atg12, 16 et LC3. Alfy pourrait donc moduler la formation de l'autophagosome (Deretic, 2010).

Alfy étant impliquée dans la dégradation des agrégats protéiques, sa surexpression dans des modèles de drosophile surexprimant la huntingtine (htt) mutée au niveau des yeux est neuroprotectrice (Filimonenko et al., 2010).

c. HDAC6 et recrutement des protéines anormales

La protéine HDAC6 est une déacétylase non-canonique. Outre sa fonction dans le noyau, elle régule l'acétylation des microtubules ainsi que la motilité cellulaire chimiotactique. Elle a la capacité d'interagir avec les complexes dynéines. HDAC6 peut se lier à l'ubiquitine et ses polymères liés en K63 à travers un domaine de liaison à l'ubiquitine de type Zf-UBP (*Zinc Finger in Ubiquitin specific Protease*) : BUZ (*Bound to Ubiquitin Zinc*). HDAC6 est également requise pour la mise en place des agrésomes en transportant les protéines mal repliées en direction du MTOC en interagissant avec la dynéine (Kawaguchi et al., 2003). Dans le contexte d'un modèle de neurodégénérescence rétinienne chez la drosophile induite par la surexpression d'une protéine à expansion de polyglutamine (poly-Q), inhibitrice du protéasome, l'introduction d'un gène HDAC6 exogène arrête la neurodégénérescence et ce de façon dépendante de l'autophagie et de la

¹⁷ Chédiak-Higashi est une pathologie de surcharge lysosomale liée à une mutation d'une protéine possédant un domaine BEACH, la protéine LYST (Orphanet n°167, OMIM n°214500)

fonctionnalité du site catalytique de cette protéine. HDAC6 est donc impliquée dans l'induction d'une autophagie compensatoire suite à une altération de l'activité du SUP (Pandey et al., 2007a; b). Par conséquent, HDAC6 relie les deux mécanismes cataboliques majeurs : autophagie et SUP en facilitant la dégradation des protéines nocives pour la cellule par agréphagie (Pandey et al., 2007a; b; Iwata et al., 2005).

d. Homo-oligomérisation de p62 et formation des agrésomes

Bien que présentant une meilleure affinité pour les substrats conjugués à une chaîne d'ubiquitines liées en K63, cette affinité reste malgré tout très faible comparée à d'autres domaines UBA. Il serait alors nécessaire que p62 s'homo-oligomériser par son domaine PB1 afin d'optimiser sa capacité à lier les protéines ubiquitinylées (Kirkin et al., 2009a). Cette fonction intervient non seulement dans le contexte de la reconnaissance de substrats ubiquitinylés mais aussi dans le cadre des fonctions de p62 dans la signalisation cellulaire (Jain et al., 2010), cela lui permet d'adapter le substrat d'une enzyme (aPKC par exemple) au niveau de son site catalytique.

L'expression de p62 ainsi que la formation d'agrégats de protéines ubiquitinylées et positifs pour p62 et TRAF6 sont induites lorsque le protéasome est inhibé (Nakaso et al., 2004; Seibenhener et al., 2004). En cas d'inhibition de l'autophagie, il se forme dans la région périnucléaire, à proximité du MTOC, des agrégats de protéines ubiquitinylées unies entre elles par p62 et par NBR1 (Bjørkøy et al., 2005; Kirkin et al., 2009a), de même type que ceux observés lors de l'inhibition du protéasome. p62 et NBR1 sont toutes deux nécessaires pour la formation de tels agrégats, appelés corps p62 (*p62 bodies*) ou agrésomes (Johnston et al., 1998) ainsi que pour leur dégradation (Bjørkøy et al., 2005; Kirkin et al., 2009a; b).

Les agrésomes sont des structures formées transitoirement dans la région périnucléaire de la cellule, à proximité des centres organisateurs des microtubules (Johnston et al., 1998; García-Mata et al., 1999; Kopito, 2000) (figure 27). Ils correspondent à des inclusions contenant des protéines anormalement repliées polyubiquitinylées associées à d'autres composants protéiques tels que des chaperons moléculaires, des protéasomes et des protéines particulières. Ainsi, les protéines p62, HDAC6 et Alfy sont constamment retrouvées dans ces agrégats (Zatloukal et al., 2002; Kawaguchi et al., 2003; Simonsen et al., 2004).

La formation des agrésomes est induite suite à des stress cellulaires d'origines diverses et pouvant compromettre le fonctionnement cellulaire. Ce sont par exemple des stress protéotoxiques comme l'inhibition de l'une ou l'autre des voies cataboliques majeures (autophagie ou SUP), des

stress nutritionnels, du RE ou oxydatifs. La destination finale de ces agrésomes est majoritairement l'autophagie spécifique dépendante de p62 et d'Alfy (agrèphagie). Certains auteurs suggèrent que ces agrésomes puissent également être substrats de l'UPS. Mais les travaux de Pandey et al., portant sur un modèle d'insecte de pathologie neurodégénérative oculaire liée à l'expression de protéines mutantes à expansion de polyglutamine (polyQ) révèlent que de telles espèces protéiques pouvaient inhiber le protéasome (Pandey et al., 2007b).

La formation des agrésomes nécessite de plus l'intervention du cytosquelette microtubulaire, des dynéines et de HDAC6. Cette dernière lie les agrégats aux dynéines d'une part et influence d'autre part la stabilité des microtubules de par son activité enzymatique déacétylase (Kawaguchi et al., 2003; Seibenhener et al., 2004). La formation de ces agrésomes, serait cytoprotectrice en permettant la séquestration d'espèces protéiques toxiques suivie de leur dégradation.

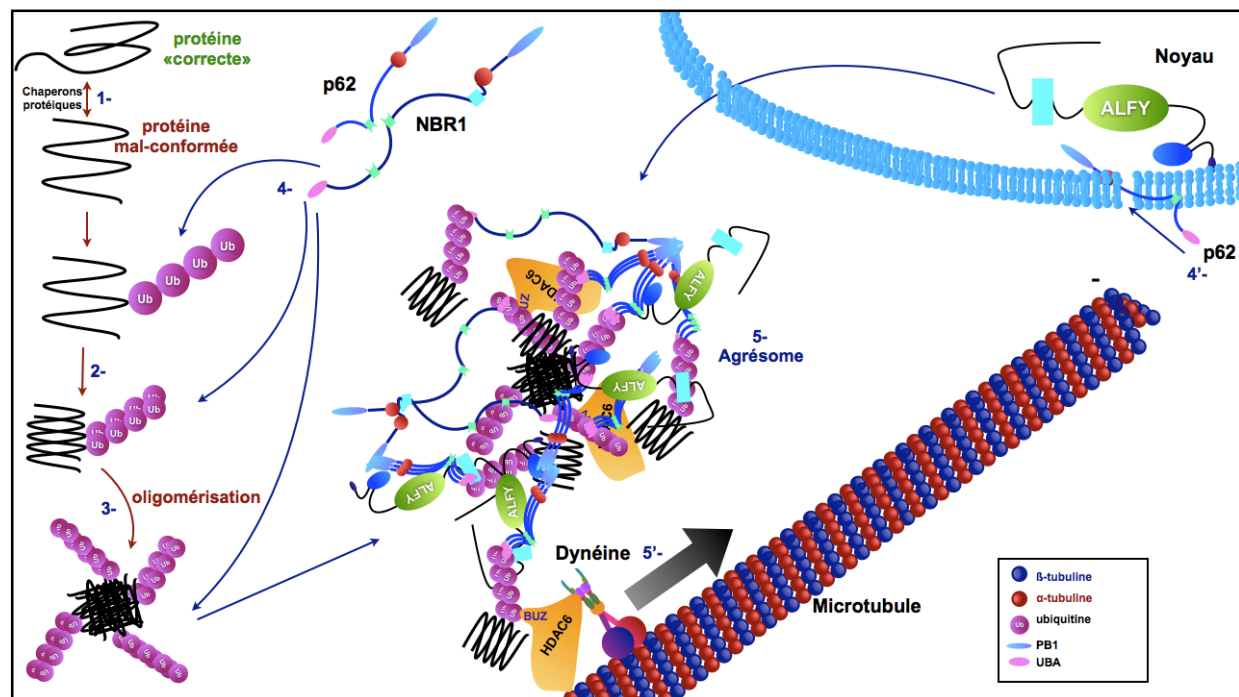


Figure 27 : Mécanisme de formation des agrésomes (D'après Knaevelsrud et Simonsen, 2010)

Les protéines mal-conformées, potentiellement pathologiques sont prises en charge par des chaperons moléculaires qui soit les aident à retrouver une conformation correcte soit induisent leur ubiquitinylation (1), à ce stade elles peuvent être dégradées par le protéasome ou s'oligomériser, ce processus étant favorisé par la configuration de leur structure tertiaire (cf Partie 3-I-E) (2- et 3-). Les protéines ou agrégats de protéines ubiquitinylées sont reconnus par les domaines UBA de p62 et de NBR1 (p62 reconnaît préférentiellement les chaînes en K63, NBR1 les chaînes K63 et K48) (4-). De par leur capacité à s'holo-oligomériser (via le domaine PB1 de p62 et CC de NBR1), p62 et NBR1 concentrent et séquestrent les protéines anormales sous la forme d'inclusions insolubles appelés agrésomes (5-). HDAC6 participe à la formation de ces structures en adaptant les agrégats protéiques aux moteurs dynéines afin de les transporter le long des microtubules pour les rassembler au niveau du site de formation des agrésomes (5'). En parallèle, un contingent de p62 recrute Alfy dans le noyau et permet ainsi son inclusion au sein des agrésomes (4').

Les agrésomes sont ensuite dégradés par autophagie par la liaison de p62 et de NBR1 à LC3 via leur domaine LIR (figure 28). Compte-tenu de ses rôles dans la signalisation cellulaire, la

dégradation spécifique de p62 par autophagie indépendamment de son rôle en tant que récepteur pour ce processus catabolique revêt une importance certaine, ceci signifiant que l'autophagie elle-même peut contrôler ces voies de signalisation (Moscat et Diaz-Meco, 2009).

p62 est communément retrouvée dans les agrégats de protéines polyubiquitinylées s'accumulant dans les tissus de patients atteints d'agrégopathies telles que la maladie de Huntington (Bjørkøy et al., 2005), l'ataxie spino-cérébelleuse de type 3 (maladie de Machado-Joseph) (Donaldson et al., 2003), la SLA (Mizuno et al., 2006; Gal et al., 2007), la démence fronto-temporale avec parkinsonisme liée au chromosome 17 (Arai et al., 2003) ou encore la maladie d'Alzheimer (Kuusisto et al., 2001; 2002; Babu et al., 2005). Chez l'Homme, la mutation du gène codant p62, en particulier au niveau du domaine UBA, conduit à la survenue de la maladie de Paget des os 5q35 (OMIM n°602080 et 601530) (Laurin et al., 2002; Duran et al., 2004; Kurihara et al., 2007) bien que le rôle exact de p62 à ce niveau ne soit pas complètement clair et pourrait être indépendant de sa fonction dans l'autophagie sélective (Kirkin et Dikic, 2007).

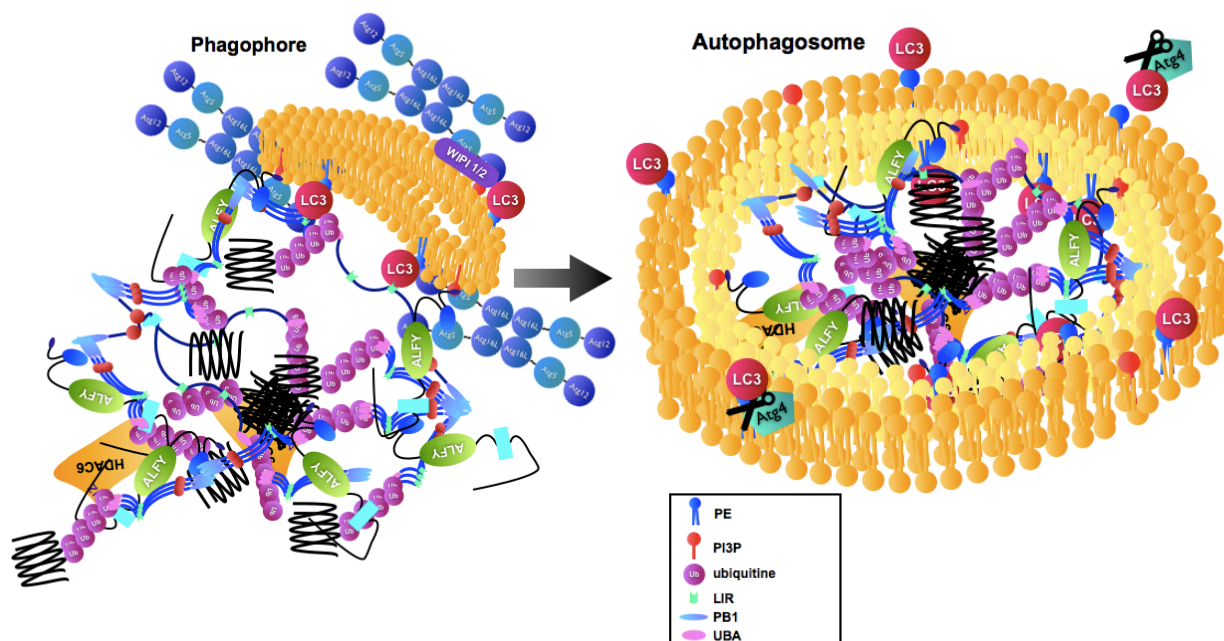


Figure 28 : Agréphagie : séquestration des agrésomes au sein des autophagosomes

Une fois formés, les agrésomes peuvent être spécifiquement dégradés par autophagie (agréphagie) grâce à l'association de LC3 avec les domaines LIR de p62 et de NBR1 au niveau de la partie interne du phagophore en formation (à gauche). Alfyl participe à l'adaptation des agrésomes en interagissant d'une part avec le PI3P par sa séquence FYVE et avec le complexe Atg12-Atg5-Atg16L via ses répétitions WD40. Lors de la fermeture de l'autophagosome (à droite), l'agrésome et les différentes protéines qui lui sont associées sont séquestrées à l'intérieur et seront ensuite dégradées au cours de la maturation autophagosomale.

Les souris KO pour p62 présentent une activité autophagique qui n'est pas significativement différente des souris WT. Ces souris développent à l'âge adulte une obésité résistante à la leptine associée à un diabète insulino-résistant, (Rodriguez et al., 2006; Komatsu et al., 2007c). Elles

présentent une croissance normale avec une durée de vie supérieure à 1 an. Ces souris développent cependant, dès l'âge de six mois, une altération de la signalisation liée aux kinases et une accumulation de la protéine tau hyperphosphorylée et polyubiquitinylée en K63, une perte neuronale associée à une altération du comportement relié au fonctionnement de l'hippocampe (Babu et al., 2005; Babu et al., 2008) bien que ces dernières caractéristiques n'aient pas été retrouvées dans toutes les études réalisées avec ce type de souris (Komatsu et al., 2007c).

Auparavant, il avait été montré que l'abolition conditionnelle du processus autophagique, chez la souris, dans le foie (Komatsu et al., 2005) ou dans le cerveau (Komatsu et al., 2006; Hara et al., 2006) conduisait à l'apparition de phénotypes délétères chez ces animaux : hypertrophie, lésions, perte de la conformation lobulaire en ce qui concerne le foie, et des troubles comportementaux associés à la formation d'agrégats de protéines anormales polyubiquitinylées dans le cas d'une suppression au niveau du système nerveux central. Lorsqu'on associe à l'abolition de l'autophagie dans ces tissus la suppression de p62, il y a disparition des anomalies au niveau du foie, ce qui n'est pas le cas au niveau du cerveau (neurones pyramidaux corticaux et hippocampiques) et du cervelet (cellules de Purkinje) où il y a peu de différences avec le modèle murin où seul le processus autophagique est annulé (Komatsu et al., 2007c) suggérant l'existence d'une autre protéine (probablement NBR1) compensant la perte d'activité de p62. Concernant la fonction de p62 dans la prise en charge des substrats ubiquitinylés en vue de leur dégradation autophagique, des résultats similaires ont été obtenus au niveau du système nerveux central de la drosophile (Nezis et al., 2008). En effet, la suppression de l'expression de l'homologue de p62, Ref(2) associée à l'inhibition de l'autophagie dans le cerveau de ces animaux réduit la formation d'agrégats protéiques développés lorsque l'autophagie est supprimée (Komatsu et al., 2007c; Nezis et al., 2008). Néanmoins une autre étude montre que la suppression de l'expression du facteur de transcription Nrf2 dans le foie de souris pour lesquelles l'autophagie a été abolie, est protectrice et régulerait l'accumulation des protéines ubiquitinylées quelque soit le type de chaîne (K11, K48 ou K63) suggérant que l'action de p62 dans ces modèles murins ne passe par son rôle dans la sélection du substrat au cours de l'autophagie mais serait lié à son action dans les voies de réponse au stress (Riley et al., 2010).

e. Anomalies de l'agrégation

Les cellules sorties du cycle cellulaire telles que les hépatocytes et les neurones sont extrêmement sensibles à la présence de protéines anormales ayant propension à s'agréger. L'agrégation constitue l'un des recours indispensables pour le maintien de ces cellules dans un état

fonctionnel. En effet, des mutations des protéines associées à cette voie sont retrouvées dans un certain nombre de pathologies humaines et dans des modèles animaux. La suppression conditionnelle de l'autophagie (souris *Atg7^{-/-}* ou *Atg5^{-/-}*) induit des pathologies dégénératives associées à la présence d'inclusions cytoplasmiques constituées de protéines agrégées et polyubiquitinylées où sont retrouvées Alf β , p62 et NBR1. L'abolition de l'expression de p62 dans des modèles murins a été associée à la survenue d'une tauopathie au niveau neuronal (Ramesh Babu et al., 2008) et des anomalies de p62 et de NBR1 chez l'Homme sont impliquées dans la pathogénie de la maladie de Paget des os (Waters et al., 2009; Waters et al., 2010; Whitehouse et al., 2010).

PARTIE 3 : RÔLES ET PHYSIOLOGIE DE L'AUTOPHAGIE

I. RÔLES PHYSIOLOGIQUES DE L'AUTOPHAGIE

A. Développement : morphogenèse et embryogenèse

L'autophagie, qu'elle soit basale ou induite, est un mécanisme indispensable tout au long de la vie d'un organisme du (des) premier(s) stade(s) développemental(aux) à sa mort. La suppression de l'expression d'un grand nombre de gènes essentiels à la conduite de l'autophagie est, à l'échelle de l'organisme, dans la majorité des cas, incompatible avec la vie (cf tableau). En effet, chez la levure, la drosophile, l'amibe *D. discoideum* et chez le nématode *C. elegans*, des mutations affectant des gènes essentiels pour la conduite de l'autophagie provoquent des troubles du développement, respectivement, troubles de la sporulation, mort à la troisième étape larvaire ou pendant le stade nymphal ; troubles de l'étape de formation du corps fructifère (*fruiting body*), formation anormale du stade « *dauer* ») (Meléndez et al., 2003; Tekinay et al., 2006; Meléndez et Neufeld, 2008).

Le bon fonctionnement de l'autophagie est indispensable à la survie du zygote dans les trompes, depuis la fécondation jusqu'à son implantation dans l'endomètre. Chez les mammifères, l'abolition de l'expression de gènes *Atg* chez la souris sont létaux soit au cours du développement embryonnaire, soit dans les heures suivant la naissance. Ainsi, Tsukamoto et al., ont créé un modèle murin dans lequel l'expression de *Atg5* est supprimée dans les ovocytes. Bien que ces cellules, une fois fertilisées par des spermatozoïdes *Atg5*⁻, soient viables, l'œuf ne se développe pas au-delà du stade 4-8 cellules (Tsukamoto et al., 2008a). Les embryons réussissent à se développer lorsque le gamète mâle est de génotype *Atg5*⁺. Dans des zygotes sauvages, l'autophagie est induite juste après la fécondation, probablement induite par une entrée massive d'ions calcium, permettant de dégrader ARNm et protéines maternelles et la synthèse de protéines issues de la transcription des gènes du zygote (Tsukamoto et al., 2008b). Chez la souris, les mutants *Beclin-1*^{-/-} meurent au jour embryonnaire E7.5 et présentent un défaut de la formation de la cavité amniotique (Yue et al.,

2003). Ce défaut de cavitation est également observé dans un modèle de développement embryonnaire élaboré à partir de cellules souches murines *Atg5^{-/-}* et est attribué à un défaut de l'élimination des cellules apoptotiques suite à une faillite de l'émission des signaux « mangez-moi » (exposition de la phosphatidylsérine au niveau du feuillet lipidique externe de la membrane plasmique) et « venez me prendre » (sécrétion de lysophosphatidylcholine) nécessaires à la phagocytose des corps apoptotiques par les cellules environnantes (Qu et al., 2007). L'autophagie, en dégradant des composants intracellulaires permet la synthèse d'ATP qui est nécessaire à l'émission de ces signaux.

Une autre mutation létale (entre E11,5 et E14,5) est celle de la protéine *Ambra1*, appartenant au premier complexe hVPS34-p150-Beclin-1 provoquant des anomalies très importantes au niveau de l'organogenèse du SNC. Celui-ci présente alors une prolifération incontrôlée des cellules dérivant du tube neural suivie d'un déclenchement massif de l'apoptose (Fimia et al., 2007; Cecconi et al., 2008).

A la naissance, le nouveau-né connaît une période de privation nutritionnelle pendant laquelle la dégradation autophagique est nécessaire pour fournir aux cellules l'énergie et les nutriments nécessaires à leur fonctionnement. Cette période correspond à l'espace temporel séparant l'arrêt de la nutrition par le placenta et l'assimilation du lait maternel. Une élévation des niveaux d'autophagie sont observés dans le cœur, les poumons et le diaphragme immédiatement après la naissance, confortant cette hypothèse. Par conséquent les nouveau-nés *Atg5^{-/-}* ou *Atg7^{-/-}* meurent dans les 12 heures suivant la naissance (Kuma et al., 2004). Cette mort ne serait pas uniquement due à une faillite dans le maintien des stocks d'énergie mais serait également due à un défaut d'élimination des corps apoptotiques, en particulier dans les poumons et la rétine (Qu et al., 2007).

B. Importance de l'autophagie au niveau tissulaire : pathologies associées à l'autophagie

1. Modèles animaux de modifications des gènes impliqués dans l'autophagie

L'abolition de l'expression de gènes codant des protéines nécessaires à l'accomplissement de l'autophagie cause, dans la majorité des cas, des anomalies majeures au niveau de ces tissus reflétant le rôle crucial de l'autophagie sur le plan physiologique (tableau 2). Ainsi, par exemple, la

suppression de l'expression d'Atg4B conduit à des anomalies graves du système vestibulaire et en particulier nuit à la mise en place des otoconies ; ces cristaux de carbonate de calcium sont à l'origine de la conversion de l'énergie mécanique des accélérations linéaires en signaux nerveux (Cabrera et al., 2010; Mariño et al., 2010; Till et Subramani, 2010). La suppression d'Atg4C va quant à elle entraîner des anomalies au niveau diaphragmatique.

La suppression de l'autophagie au niveau du système nerveux central ou au niveau hépatique conduit au développement de pathologies dégénératives avec une surcharge protéique au sein des cellules touchées (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006) (tableau 2).

2. Dysfonctionnements de l'autophagie et pathologies

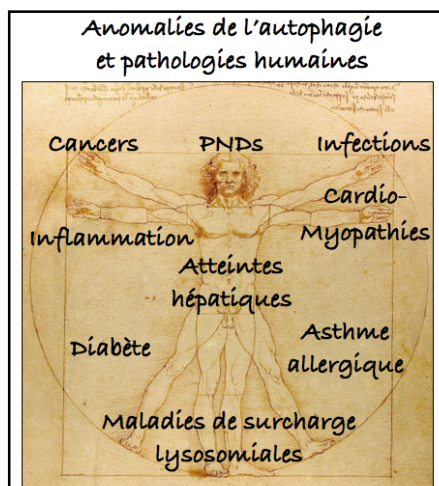


Figure 29 : Pathologies humaines associées à des anomalies de l'autophagie.

De nombreuses pathologies de divers types sont associées à des dysfonctionnements du processus autophagique (Levine et Kroemer, 2008; Mizushima et al., 2008 ; figure 29). La question importante est d'identifier le rôle de l'autophagie dans la pathogenèse de ces maladies et l'origine des dysfonctionnements (cause, conséquence, tentative désespérée de la cellule de retour à un état physiologique, participation au suicide cellulaire). La production de modèles animaux déficients pour l'autophagie est difficile puisque la délétion des gènes *Atg* indispensables à la conduite de l'autophagie et n'ayant pas d'homologue (*Atg5*, *7*, *Beclin-1*) est létale. Pour pallier ce problème, des mutants conditionnels

ont été établis pour lesquels, l'autophagie est abolie uniquement dans un type cellulaire/organe. Les effets de l'annulation de ce processus par délétion conditionnelle d'*Atg5* ou *7* sont résumés dans le tableau 2. Les effets des délétions/mutations/surexpressions géniques, gène à gène, ont été rassemblés dans le tableau 1 présenté en annexe.

Organe ciblé	Phénotype	Pathologie humaine associée
SNC	Retard de croissance, troubles comportementaux et moteurs, neurodégénérescence, inclusions neuronales positives pour l'ubiquitine et p62, mort dans les 28 semaines suivant la naissance. Dans un modèle d'ischémie par ligature carotidienne unilatérale : diminution de la perte neuronale hippocampique chez les sujets jeunes (post-natal) mais pas pour des animaux plus âgés	PND
Cellules de Purkinje	Ataxie progressive à début tardif, dégénérescence axonale, accumulation d'inclusions de protéines positives pour l'ubiquitine et p62 et de mitochondries altérées	PND de type Ataxie
Tissu adipeux	Résistance à l'obésité, accumulation d'inclusions protéiques et de mitochondries endommagées, perte de tissu adipeux blanc, augmentation du volume de tissu adipeux brun, augmentation de la mortalité.	Diabète, maladies métaboliques
Cellules hématopoïétiques	Elimination mitochondriale défectueuse au cours de l'érythropoïèse, anémie sévère, lymphopénie, mortalité accrue.	Pathologies du système immunitaire
Cellules T	Lymphopénie T, accumulation de mitochondries anormales, augmentation du taux d'apoptose	Pathologies du système immunitaire
Intestin grêle	Dysfonctionnement des cellules de Paneth	Maladie de Crohn
Cellules pancréatiques	Perte de la tolérance au glucose, augmentation du taux de mort cellulaire en réponse à un régime alimentaire riche en lipides, accumulation d'inclusions protéiques et de mitochondries altérées.	Diabète, maladies métaboliques
Muscles squelettiques	Atrophie, perte de la force musculaire, accumulation d'inclusions protéiques et de mitochondries endommagées	Myopathies, maladies de surcharge lysosomale
Foie	Hépatomégalie, accumulation intracellulaire d'organites anormaux et d'inclusions protéiques, dégénérescence lipotoxique	Stéatose hépatique alcoolique, cyrroses, maladies avec dégénérescence hépatique

Tableau 2 : Phénotypes liés à la suppression de l'autophagie dans différents tissus chez la souris

a. Mutations, pathologies d'origine génétique et maladies de surcharge lysosomale

En pathologie humaine, des dysfonctions de la voie autophagique/lysosomale dues à des mutations de gènes *Atg* sont retrouvées dans une grande variété de maladies et d'organes.

i. Maladie de Crohn

Une mutation ponctuelle du gène Atg16L1 est à l'origine d'une susceptibilité génétique à l'origine de la maladie de Crohn (Orphanet n°206, OMIM n°611081 et 266600), une affection inflammatoire multifactorielle détruisant les cellules intestinales (Cadwell et al., 2008; Saitoh et al., 2008b; Fujita et al., 2009; Stappenbeck et al., 2010).

ii. Maladie de Paget

Dans le cadre de l'autophagie sélective, la mutation des gènes p62 et NBR1 sont associées à la maladie de Paget des os qui est liée à un dysfonctionnement des ostéoclastes (hypertrophie hyperplasique) conduisant à une accélération du renouvellement osseux et à la désorganisation de la structure osseuse (Waters et al., 2010; Whitehouse et al., 2010). Ces anomalies sont dues à la fois au rôle de p62 et de NBR1 en tant que récepteurs autophagiques mais aussi à la fonction de p62 dans diverses voies de signalisation.

iii. Maladie de Danon et maladies de surcharge lysosomales

Les maladies de surcharge lysosomales sont des pathologies dues à des mutations au niveau de gènes codant généralement des enzymes lysosomales et parfois, comme dans le cas du syndrome de Danon, des protéines impliquées dans les processus de transport (Saftig et al., 2008). Dans la plupart de ces pathologies, les structures atteintes sont le système nerveux et le système musculaire. Lorsqu'elles sont associées à des anomalies de l'autophagie, ces maladies sont appelées myopathies vacuolaires autophagiques (ou AVM ; *Autophagic Vacuolar Myopathies*) (Malicdan et al., 2008) parmi lesquelles on compte, outre le syndrome de Danon, la myopathie avec autophagie excessive liée à l'X (Orphanet n°25980 , OMIM n°310440; XMEA ; *X-linked Myopathy with Excess of Autophagy*), la maladie de Pompe ou glycogénose de type II (Orphanet n°365, OMIM n°232300).

La maladie de Danon ou cardiomyopathie liée au chromosome X est due à des mutations au niveau du gène codant LAMP2 (Nishino et al., 2000) et correspond à une cardiomyopathie parfois associée à des retards mentaux. Elle se caractérise par une augmentation du nombre de vésicules autophagiques dans le cytoplasme des cellules musculaires et par des troubles du métabolisme du cholestérol (Tanaka et al., 2000; Eskelinen, 2006).

Des anomalies de l'autophagie ont également été rapportées chez les patients atteints de la maladie de Niemann-Pick de type C. Cette pathologie est causée par une mutation autosomale récessive affectant dans environ 95% des cas le gène NPC1 codant pour une protéine *trans-*

membranaire lysosomale impliquée dans le trafic des lipides et du cholestérol. La dysfonction de cette protéine conduit à l'accumulation intralysosomale de sphingolipides et de cholestérol et une induction apparente de l'autophagie (Pacheco et al., 2007; Pacheco et Lieberman, 2007). Il s'agit d'une pathologie progressive dont la période de début est très variable mais se situe souvent dans l'enfance. Elle se manifeste par une hépato- et une splénomégalie et une dégénérescence neuronale progressive se traduisant par une démence progressive et la présence d'inclusions neuronales (dégénérescences neurofibrillaires).

b. Cancers

Il existe de nombreux liens entre autophagie et cancer. De par la nature de ses voies de régulation et des protéines qui les composent, des dysfonctionnements de l'autophagie sont impliqués dans les processus tumoraux. En fait le rôle de l'autophagie dans ce type de pathologies est ambigu. L'autophagie constitue un mécanisme suppresseur de tumeur dans la mesure où elle permet à la cellule de se défendre contre des stress tumorigènes. Elle peut en effet être impliquée dans le déclenchement d'un processus de mort cellulaire programmée, elle participe à la limitation de la taille des cellules et les débarrasse des organites usagés potentiellement sources de stress (mitochondries par exemple) et augmente le risque de mutations géniques. De par ses implications par rapport à l'apoptose, à la protection, ou au contraire à la destruction des cellules cancéreuses, l'autophagie est l'objet d'étude pour de nouvelles voies de thérapeutiques anticancéreuses (Puissant et al., 2010). En ce sens, la plupart des membres intervenant dans la voie mTOR liée au récepteur à l'insuline et aux facteurs de croissance sont également reliés à des processus cancéreux (Akt, mTOR, DAPK1...) et sont des inhibiteurs de l'autophagie. A l'inverse, les molécules connues pour avoir une activité de suppresseur de tumeur régulent positivement ce processus : Beclin-1, PTEN, p53, TSC1/2, mutées dans la sclérose tubéreuse de Bourneville (Orphanet n°805, OMIM n°191100). Dans le même but, l'induction de l'autophagie peut favoriser la survie des cellules cancéreuses contre des stress (métaboliques et/ou hypoxiques dans les tumeurs non encore vascularisées) ou contre des substances chimiques toxiques utilisées en thérapie (Ogier-Denis et Codogno, 2003; Kondo et al., 2005; Degenhardt et al., 2006; Marino et al., 2010; Vucicevic et al., 2011). A l'inverse, la mort cellulaire autophagique peut être déclenchée à la suite d'un traitement anticancéreux. De plus, les cellules cancéreuses étant des cellules physiologiquement anormales avec l'expression de certains gènes totalement dérégulée et un cycle cellulaire aberrant, il est probable que le processus autophagique soit également affecté (Marino et al., 2007; Mizushima et al., 2008).

Ainsi, des altérations de protéines impliquées dans les voies autophagiques sont liées à des processus de cancérisation comme par exemple Atg4C qui favorise la tumorigenèse de manière tissu-spécifique (formation de fibrosarcomes) (Marino et al., 2007). La protéine Beclin-1 est un suppresseur de tumeur haploinsuffisant puisque plus de 59% des souris Beclin-1^{+/-} développent des tumeurs spontanément (Yue et al., 2003) ; des anomalies touchant un allèle de Beclin-1 (anomalies hétérozygotes) sont retrouvées dans un grand nombre de cancers (75% des cancers ovariens, 50% des cancers du sein et 40% des cancers de la prostate) (Qu et al., 2003). L'hétérozygotie de Beclin-1 a été reliée à une hausse de la prolifération cellulaire, à une diminution des niveaux autophagiques et à une susceptibilité accrue vis-à-vis de stress cancérogènes (exposition à l'HBV).

c. Infections et pathologies affectant le système immunitaire

L'autophagie est impliquée dans de nombreux mécanismes liés à l'immunité que ce soit dans l'établissement des répertoires T, la maturation des cellules B (Miller et al., 2008; Nedjic et al., 2008) ou encore dans l'élimination de pathogènes intracellulaires (Deretic, 2011; Levine et al., 2011). Le polymorphisme d'Atg16L est connu pour constituer un facteur de risque pour le développement d'une pathologie inflammatoire de l'intestin : la maladie de Crohn dans laquelle les protéines Atg5 et 7 ont également été impliquées (Cadwell et al., 2008; Cadwell et al., 2009; Fujita et al., 2009). Des anomalies de l'autophagie sont aussi impliquées dans la neurodégénérescence suite à l'activation de la microglie infectée par des virus tels que le VIH (Virus de l'Immunodéficience Acquise) (Alirezai et al., 2008; 2011). Un des nombreux rôles de l'autophagie est la défense des cellules contre des pathogènes invasifs (comme les bactéries à action intracellulaire, ou à plus forte raison, les virus) dans le cadre de la réponse immune innée (Kirkegaard et al., 2004). Cependant, de nombreux pathogènes peuvent l'utiliser, l'inhiber ou la contourner, c'est le cas de bactéries telles que *Legionella pneumophila*, *Porphyromonas gingivalis*, ou encore de virus (poliovirus, HSV-1, HCMV...) (Taylor et Kirkegaard, 2007). Le plus souvent, les pathogènes activent la formation de l'autophagosome et bloquent la maturation des vacuoles autophagiques ou leur fusion avec les lysosomes ou comme dans le cas de HSV-1 et HCMV inhibent directement l'autophagie (Chaumorcel et al., 2008). Des aspects de l'asthme allergique sont associés à des dysfonctions de l'autophagie.

d. Pathologies neurodégénératives

Les PND sont des maladies affectant le système nerveux généralement caractérisées par la présence d'agrégats protéiques cytoplasmiques (tau, α -synucléine), extracellulaires (peptide β -

amyloïde), ou nucléaires (ataxine) dans les cellules en dégénérescence (ou à proximité). Ces corps d'inclusion correspondent à des structures discrètes où sont séquestrés des agrégats protéiques (Alirezaei et al., 2008). Qu'elles soient sporadiques ou dues à des mutations génétiques, les PND sont causées par des protéines ayant propension à s'agréger (cf tableau 2 en annexes). La survenue des symptômes s'opère généralement à l'âge adulte et le vieillissement en constitue donc le facteur de risque majeur.

L'autophagie est considérée comme un mécanisme neuroprotecteur qui ralentit l'avancée des PND et dont l'inhibition est associée à la neurodégénérescence. Une augmentation, parfois précoce du nombre de vésicules autophagiques dans les neurones a été observée dans le tissu cérébral touché issu de modèles animaux murins ou de drosophile et issu de patients (Rubinsztein et al., 2005). Ainsi des anomalies du système autophagique/lysosomal ont été reliées à la maladie d'Alzheimer (Nixon et al., 2005), aux autres tauopathies (démence fronto-temporale, démence fronto-temporale avec parkinsonisme liée au chromosome 17...) (Yamamoto et Simonsen, 2011b), à la maladie de Parkinson (Forno et Norville, 1976; Anglade et al., 1997; Crews et al., 2010), aux pathologies dues à des protéines contenant des répétitions de glutamines (polyglutamines) telles que la maladie de Huntington, la maladie de Machado-Joseph et l'ataxie cérébelleuse (Petersen et al., 2001; Ravikumar et al., 2002; Nascimento-Ferreira et al., 2011), aux maladies à prions (maladie de Creutzfeldt-Jakob, encéphalite spongiforme bovine,...) (Liberski et al., 2004; Liberski, 2004; Sikorska et al., 2004; Kovacs et Budka, 2009; Heiseke et al., 2010), aux maladies affectant les neurones moteurs comme la SLA (Wong et Cuervo, 2010), aux maladies de surcharge lysosomale qui entraînent pour une grande majorité d'entre elles des retards mentaux associés à une neurodégénérescence, à l'exemple de la maladie de Niemann-Pick de type C (Pacheco et Lieberman, 2008).

Ces constatations soulèvent de nombreuses questions : quel est le niveau d'implication de l'autophagie ? Joue-t-elle un rôle à part entière dans la pathogenèse ou est-elle affectée secondairement ? Quelle est la cause de l'accroissement du compartiment autophagique dans les neurones en dégénérescence ? L'autophagie est-elle induite, bloquée ? D'autre part, bien que le sujet soit controversé, la mort cellulaire dite autophagique a été décrite dans ce type d'affections (Gorman, 2008), quelle est la part réelle de l'autophagie dans la perte neuronale ?

Sous un angle différent, une induction de l'autophagie est souvent décrite comme protectrice dans le cadre de l'étude de la neurodégénérescence dans différents modèles cellulaires ou animaux

de PND (Ravikumar et al., 2004; Berger et al., 2006; Williams et al., 2006; Rubinsztein, 2007; Sarkar et al., 2007; Heiseke et al., 2009) ou délétère (Cheng et al., 2011; Zhang et al., 2011). Résoudre ces problèmes permettrait d'identifier de nouvelles pistes thérapeutiques.

Premièrement, dans les modèles murins de suppression conditionnelle de l'autophagie dans le SNC, le signe le plus précoce de neurodégénérescence est un gonflement axonal localisé à proximité des terminaisons synaptiques (Katsumata et al., 2010; Lee et al., 2011) suggérant que la défection de l'autophagie est un phénomène précoce. Ce point a été confirmé par des études menées en microscopie électronique sur du tissu nerveux prélevé *post-mortem* chez des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Nixon et al., 2005) ainsi que dans le cadre d'un modèle d'induction de la maladie de Parkinson par le MPTP (1-méthyl-4-phényl-1,2,3,6-tétrahydropyridine) chez le rat (Dehay et al., 2010). Il reste à établir si une perturbation de l'activité autophagie peut effectivement constituer une cause primaire favorisée par l'expression anormale de protéines ayant propension à s'agréger. En ce sens, une étude épidémiologique menée sur une cohorte de patients européens atteints de la maladie de Huntington, il a été établi qu'un polymorphisme du gène *Atg7* (V471A) était corrélé avec une survenue plus précoce des symptômes (Metzger et al., 2010).

i. Perturbations directes de la voie autophagique-lysosomale

Des anomalies de l'expression ainsi que de la distribution des cathepsines ont également été observées, avec une augmentation des niveaux d'expression de la cathepsine D dans le tissu cérébral de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Cataldo et al., 1995; Hoffman et al., 1998) et une distribution anormale de la cathepsine L dans la maladie de Parkinson (Li et al., 2011). Dans la maladie d'Alzheimer, l'augmentation des niveaux de cathepsine D ne sont pas forcément corrélés avec celle de l'activité de cette enzyme. En effet, elle nécessite un pH acide optimal pour son activité or une inhibition de l'acidification lysosomale ou une inhibition pharmacologique des cathepsines bloquent le transport axonal des compartiments vésiculaires acides positifs pour ces hydrolases (Lee et al., 2011). Ceci conduit à une pathologie neuronale proche de celle observée dans les neurones en dégénérescence au cours de la maladie d'Alzheimer (Yamamoto et al., 1998; Klionsky et al., 2008; Boland et al., 2010). Quant à la maladie d'Alzheimer, ce défaut d'acidification a été relié au dysfonctionnement de la PS1, qui intervient dans la maturation autophagique en permettant un adressage correct des pompes acidificatrices H⁺-vATPases (Esselens et al., 2004; ; Williamson et Hiesinger, 2010; Neely et al., 2011; Neely et Green, 2011). Par ailleurs, une perte de fonction des présénilines est associée à une augmentation du nombre de vésicules autophagiques et à une mauvaise localisation de certaines protéines (α - et β -synucléines) (Wilson et

al., 2004; 2003). L'approche inverse consistant à inhiber l'autophagie dans des modèles cellulaires ou animaux montre qu'une perturbation de ces voies est suffisante pour induire une neurodégénérescence (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Boland et al., 2008; Lee et al., 2011).

Les protéines impliquées dans la pathogenèse des PND ont pour certaines été directement impliquées dans l'inhibition de l'autophagie. Premièrement, les protéines toxiques ayant propension à s'agréger induisent l'autophagie soit directement (Huntingtine) (Kegel et al., 2000), soit indirectement à travers un mécanisme compensatoire. Les protéines seraient dégradées soit par le SUP, soit par CMA. Avec le temps, des protéines altérées exerceraient leurs effets toxiques et le SUP et la CMA seraient touchées, de plus, une fois agrégées, les protéines pathologiques ne peuvent plus être éliminées par ces deux systèmes. Une phase compensatoire impliquant la macroautophagie se mettrait alors en place pour dégrader ces protéines. Mais après un temps plus ou moins long, selon la pathologie, il y aurait faillite du mécanisme et dégénérescence neuronale (Butler et al., 2006; Martinez-Vicente et Cuervo, 2007). Par exemple, les protéines α -synucléine et tau, substrats de la CMA en conditions physiologiques, l'inhibent lorsqu'elles sont anormales (mutation, clivage) (Vogiatzi et al., 2008; Xilouri et al., 2009; Wang et al., 2009; 2010). L'accumulation de protéines anormales est également délétère pour le SUP (Bence et al., 2001; Kirkin et al., 2009). L'induction compensatoire de l'autophagie suite à l'inhibition de la CMA et du SUP est un phénomène bien identifié (Rideout et al., 2004; Massey et al., 2006).

Enfin, plus directement, les protéines toxiques peuvent cibler l'autophagie. C'est le cas de la huntingtine qui provoque des anomalies de reconnaissance du substrat dans le cadre de l'autophagie spécifique résultant en des vésicules autophagiques vides (Martinez-Vicente et al., 2010). La forme $A\beta_{1-42}$ est toxique pour le processus autophagique dans des modèles de drosophile (Ling et al., 2009) et dans des cultures primaires corticales de rat (Song et al., 2011).

Dans les PND impliquant des mutations de CHMP2B, une protéine du complexe ESCRT-III fonctionnant dans la formation des MVBs, (SLA, démence fronto-temporale liée au chromosome 3), les anomalies de l'autophagie peuvent être directement imputées à un dysfonctionnement de CHMP2B ; les MVBs étant indispensables à la maturation autophagique neuronale (Filimonenko et al., 2007; Rusten et al., 2007; Rusten et Simonsen, 2008). Des mutations du gène ATP13A2/PARK9 qui code pour une ATPase lysosomale sont responsables de formes familiales autosomales récessives de la maladie de Parkinson. Cette protéine, lorsqu'elle est anormale, conduit à une dysfonction de l'autophagie et à l'agrégation d' α -synucléine (Deas et al., 2011).

ii. Perturbations du transport axonal

La séparation du site de formation des autophagosomes des vésicules du système endo-lysosomal constitue une barrière physique permettant la régulation de la maturation autophagique à travers le trafic vésiculaire. Ce dernier est d'une part régulé par les Rab et d'autre part est dépendant des mécanismes de transport le long des microtubules (Katsumata et al., 2010). Dans les neurones, les autophagosomes, comme les endosomes suivent un transport rétrograde en direction du corps cellulaire où est retrouvée la majorité des lysosomes (Zhou et al., 2011). Ce transport rétrograde est dépendant de la stabilité et du maintien de l'organisation des microtubules mais aussi de l'intégrité des dynéines (Kimura et al., 2008; 2007). Ainsi des modifications au niveau du transport rétrograde axonal en général ou une perturbation du transport des endosomes se répercutent sur la fonction autophagique, par exemple une déficience en snapine, protéine adaptatrice des endosomes tardifs aux dynéines sur le trafic endosomal a des conséquences sur la voie autophagique (Cai et al., 2010; Yuzaki, 2010; Cai et Sheng, 2011).

L'alsine 2 est mutée dans l'une des formes familiales de la SLA (forme 2, autosomale récessive). Cette protéine fonctionne en tant que GEF pour la protéine Rab5 impliquée dans le trafic vésiculaire des endosomes précoces, la macropinocytose et la croissance neuritique. La perte de fonction de cette protéine entraîne des dysfonctions importantes du système endosomal et de la fusion autophagosomes/endosomes dans des modèles murins et exacerbe la pathologie des neurones moteurs chez les souris exprimant la SOD1 mutée responsable d'une autre forme familiale de SLA (forme 1, dominante ou récessive en fonction de la mutation) (Hadano et al., 2010). Des mutations de la dynéine sont également connues pour être à l'origine de formes héréditaires de la SLA (Bruijn et al., 2004; Ravikumar et al., 2005).

Au cours de la maladie d'Alzheimer, l'organisation du réseau de microtubules est largement compromise par la perte de fonction de la protéine tau due à son hyperphosphorylation (Grundke-Iqbal et al., 1986; Drewes et al., 1995; Schneider et al., 1999). Ceci contribue fort probablement aux anomalies de la voie autophagique/lysosomale mais ne permet pas d'établir s'il s'agit là d'un phénomène précoce ou d'une des conséquences de l'avancée de la maladie contribuant à son amplification. Dans le cas de la maladie de Machado-Joseph (ou ataxie spinocérébelleuse de type 3), les inclusions protéiques axonales positives pour p62 et l'ubiquitine pourraient perturber le transport axonal (Seidel et al., 2010).

iii. *Âge, stress et mitochondries*

Pourquoi les neurones présentent-ils une sensibilité différentielle au stress ? En effet, en fonction de la protéine impliquée et du type de PND, les populations neuronales touchées sont très spécifiques : neurones hippocampiques et du néocortex pour la maladie d'Alzheimer, neurones moteurs dans le cas de la SLA, au cours de l'ataxie spino-cérébelleuse, ce sont les cellules de Purkinje qui sont affectées et les neurones dopaminergiques de la *pars reticulata* de la substance noire dégèrent au cours de la maladie de Parkinson. Plusieurs hypothèses ont été avancées à ce sujet :

- en fonction des types neuronaux, les réponses compensatoires en réponse à une abolition de l'activité autophagique sont différentes, par exemple dans les neurones corticaux, le flux autophagique serait élevé avec un nombre d'autophagosomes détectés faible alors que les neurones striataux présentent une activité autophagique plus élevée (Boland et al., 2008; Tsvetkov et al., 2009) ;

- la réponse peut également varier en fonction de l'environnement proche des populations neuronales étudiées (Clement et al., 2009; Deas et al., 2011),

- les niveaux d'activité autophagique basale diffèrent en fonction du type neuronal étudié, par ailleurs certains types de neurones sont exposés à de plus hauts niveaux de stress impliquant une activité autophagique plus élevée et un plus grand risque de lésion avec le temps. Par exemple, les neurones dopaminergiques de la substance noire présentent une population mitochondriale plus faible en comparaison avec les autres neurones contenus dans cette zone. Ils sont également sujets à un stress oxydatif plus élevé (Narendra et al., 2010; Deas et al., 2011).

Cependant, le cas de la maladie de Parkinson est particulier concernant le lien unissant mitochondries, stress oxydatif et autophagie par rapport aux autres PND.

- *Maladie de Parkinson, PINK1, parkine et mitophagie*

La maladie de Parkinson survient dans 90 à 95% des cas sous forme sporadique. Les 5 à 10% restants sont dus à des mutations concernant au moins six gènes autosomaux (nommés PARK), transmissibles de façon dominante pour deux d'entre eux : le gène de l' α -synucléine (PARK1/4) et le gène codant LRRK2 (*Leucine-Rich Repeat Kinase 2* ; PARK8). Les quatre autres mutations se transmettent de manière récessive. Il s'agit des mutations des gènes codant la parkine, une

ubiquitine-ligase (E3) de type RING (PARK2), PINK1, ou dardarine (*PTEN Induced protein Kinase 1*; PARK6), DJ-1 (PARK7), ATP13A2 (PARK9).

PINK1 et la parkine ont été impliquées directement dans l'homéostasie mitochondriale et plus particulièrement dans la régulation de la mitophagie (Narendra et al., 2008; Kawajiri et al., 2010). PINK1, la parkine et DJ-1 ont été aussi individuellement impliquées dans la protection contre le stress oxydatif et les anomalies de l'une ou l'autre entraînent des dysfonctionnements mitochondriaux (Dagda et al., 2009; Xiong et al., 2009; Irrcher et al., 2010). Par ailleurs, ces trois protéines fonctionnent au sein d'un complexe protéique présentant une activité E3 ligase, régulant la dégradation par le SUP de la parkine anormale et de la synphiline-1, une autre protéine impliquée dans la maladie de Parkinson (Xiong et al., 2009).

En conditions physiologiques, la protéine PINK1 serait rapidement clivée et dégradée (demi-vie de l'ordre de trente minutes) (Matsuda et al., 2010). Une chute du potentiel de membrane mitochondrial permet la stabilisation de PINK1 et provoque la relocalisation et l'accumulation de cette protéine au niveau de la mitochondrie altérée (Dagda et al., 2008; Matsuda et al., 2010; Vives-Bauza et al., 2010). L'activité kinase de PINK1 de même que sa localisation au niveau mitochondriale sont nécessaires et suffisantes pour le recrutement de la parkine, protéine normalement cytoplasmique (Narendra et al., 2009; Matsuda et al., 2010). La localisation de la parkine est donc également dépendante d'une chute du potentiel de membrane mitochondrial (Narendra et al., 2009; Vives-Bauza et al., 2010). A ce niveau, la parkine ubiquitinylye les mitofusines 1 et 2 (Gegg et al., 2010). L'ensemble de ces événements conduit à la dégradation spécifique de la mitochondrie par autophagie. La mitophagie est également dépendante de récepteurs autophagiques comme NIX/BNIP3L et p62. Cependant, si l'ubiquitinylation des mitofusines joue un rôle dans la reconnaissance des mitochondries endommagées par ces récepteurs ou si cela conduit à leur dégradation par le SUP afin de prévenir la fusion mitochondriale nécessite d'être clarifié (Gegg et al., 2010; Poole et al., 2010). Des observations similaires ont été faites dans un modèle de pathologie cardiovasculaire (Huang et al., 2011).

- *Vieillesse, stress oxydatif et PND*

L'avancée en âge est le facteur de risque commun aux PND. Au cours du vieillissement, on assiste à une diminution des fonctions cataboliques et de l'efficacité du contrôle-qualité protéique. L'accumulation de stress au cours de la vie associée à la présence de protéines toxiques contribuent largement au développement de PND. L'activité autophagique devient alors inadéquate pour

éliminer la quantité croissante de stimuli inducteurs d'apoptose (Nixon, 2006; Banerjee et al., 2010). A l'inverse un ralentissement de l'activité autophagique et des anomalies de la mitophagie accentuent les phénomènes de stress. Un déséquilibre de la balance fusion/fission, importante pour le maintien de l'homéostasie mitochondriale, est observé dans les neurones en dégénérescence au cours de la SLA, de la maladie de Parkinson (cf paragraphe précédent) et de la maladie d'Alzheimer. Dans ce dernier cas, le déséquilibre se fait en faveur de la fission, or, au cours de la mitophagie, il est nécessaire qu'il y ait fission des mitochondries pour que celles-ci soient séquestrées au sein des autophagosomes. Donc, cette augmentation du taux de fission mitochondrial au cours de la maladie d'Alzheimer pourrait refléter une tentative des cellules d'éliminer ces organites.

D'autre part, l'oxydation est une modification post-traductionnelle covalente qui est considérée comme pouvant favoriser l'agrégation (Ross et Poirier, 2004; Bosco et al., 2010). Par ailleurs, les lipides oxydés sont connus pour être des agents inducteurs de la rupture de la membrane lysosomale, la fuite des cathepsines en résultant pouvant être à l'origine du déclenchement des voies de mort (Boland et Nixon, 2006). Un relargage lent est relié à l'apoptose alors que la catastrophe lysosomale conduirait à la nécrose. En outre, la cathepsine B peut induire l'activation de Bid et le relargage de cytochrome c (Guicciardi et al., 2005; Luo et al., 2010; Zhang et al., 2009).

- *Stress du RE*

L'accumulation de protéines agrégées est un facteur déclencheur du stress du RE. Aussi, il n'est pas étonnant que ce type de stress soit impliqué dans la plupart des PND. Le stress du RE et l'autophagie sont intimement liés (Li et al., 2008). L'intégrité de chacune de ces voies étant nécessaire au fonctionnement de l'autre (Li et al., 2008).

iv. Métabolisme lipidique et autophagie

Un métabolisme lipidique correct semble être indispensable au bon fonctionnement de l'autophagie. Or, celui-ci est souvent modifié au cours de la pathogenèse des maladies du SNC (maladie d'Alzheimer, SLA, maladie de Niemann-Pick de type C...). Les céramides et les sphingolipides constituent d'importants régulateurs de l'autophagie (Lavieu et al., 2006; Patingre et al., 2009; Peralta et Edinger, 2009). Par exemple, l'altération des niveaux de sphingolipides observés au cours de la maladie d'Alzheimer conduisent à une induction de l'autophagie, facilitent la production d'A β mais pourrait aussi affecter l'élimination du matériel séquestré par les autophagosomes (Tamboli et al., 2011). Par ailleurs il existe des liens étroits entre fonction

lysosomale et lipides puisque la suppression de l'expression des LAMP-1 et 2 cause une accumulation de cholestérol dans les cellules (Eskelinen et al., 2004).

Des anomalies du métabolisme du cholestérol sont reliées à des résistances différentes au stress et des profils lipidiques intracellulaires différents pourraient expliquer la vulnérabilité différentielle des neurones à différents types de stress (Clement et al., 2009). Elles sont également associées à une induction de l'expression de Beclin-1 dans des fibroblastes mutés pour la protéine NPC1, résidente de la membrane des endosomes tardifs et impliquée également dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (Kågedal et al., 2010). La suppression de cette protéine chez les souris provoque une dégénérescence neuronale associée à l'accumulation de vésicules autophagiques (Liao et al., 2007).

En fait, les maladies liées à la surcharge lysosomale présentent des points communs avec les PND qui se reflètent par les retards mentaux et la dégénérescence neuronale associés à une accumulation de vésicules autophagiques et à une expansion générale du système lysosomal (Settembre et al., 2008; Bellettato et Scarpa, 2010). Au cours de ces pathologies, il y a une accumulation de cholestérol dans les membranes du système lysosomal et ceci conduit à une séquestration anormale des protéines SNARE inhibant ainsi les processus de fusion des vésicules appartenant au compartiment lysosomal (Fraldi et al., 2010).

C. Contrôle autonome de l'autophagie par la cellule

L'autophagie participe au développement, au contrôle de la prolifération cellulaire, au contrôle-qualité protéique et à l'homéostasie cellulaire, au métabolisme, est impliquée au cours du vieillissement et dans la défense contre les organismes pathogènes. Outre ces rôles, l'autophagie a des fonctions annexes au sein de la cellule comme par exemple dans la régulation de la qualité des membranes cellulaires. En effet, une étude récente menée *in vitro*, à partir de membranes du RE montre que les portions membranaires anormales (membranes cubiques) sont immédiatement séquestrées à l'intérieur de vésicules autophagiques (Lingwood et al, 2009).

Dans le cadre du système immunitaire, l'autophagie permet la dégradation de composés cytosoliques pour permettre la présentation des antigènes au niveau du CMH de classe II et ainsi permettre la constitution correcte du répertoire des lymphocytes T et d'éviter l'autoimmunité (Nedjic et al., 2008). Elle assure également la maturation et l'homéostasie des cellules immunitaires

(Pua et He, 2007; Pua et al., 2007; Miller et al., 2008) et régule la réponse inflammatoire (Saitoh et al., 2008a).

Il existe des données contradictoires concernant l'activité autophagique au cours de la mitose. Alors qu'il avait été exposé que l'autophagie était inhibée durant la ségrégation chromosomique pour éviter la séquestration accidentelle de chromatides sœurs (Eskelinen et al., 2002), une autre étude montre qu'au contraire, elle était induite au cours de ce processus (Liu et al., 2009). Cependant, dans ces derniers travaux, les substrats identifiés dans les autophagosomes sont principalement des mitochondries. En conséquence, on peut penser qu'au cours de la mitose, il n'est pas possible d'induire l'autophagie (la forme aspécifique de réponse au stress) mais qu'au contraire, l'autophagie basale, spécifique et plus particulièrement la mitophagie puisse être accomplie puisque sa spécificité intrinsèque constitue une sécurité. Lors de la séparation des cellules filles, le centre du fuseau mitotique se différencie en un organite particulier : le *midbody* au centre duquel se trouve un anneau protéique dense : l'anneau du *midbody*, ou corps de Flemming qui sert de plateforme fonctionnelle pour compléter la séparation des cellules filles (fermeture de la membrane,...) (Pohl, 2009).

D. Modulation de l'autophagie et stress cellulaire

La macroautophagie est induite par des stress protéotoxiques tels qu'une inhibition du protéasome (Rideout et al., 2004; Pandey et al., 2007; Rubinsztein, 2007) ou encore un stress du RE (Bernales et al., 2006; Yorimitsu et al., 2006; Yorimitsu et Klionsky, 2007). La plupart des stress cellulaires conduisent à l'inhibition de la signalisation liée au complexe mTORC1 (hypoxie, stress du RE, choc osmotique, privation nutritionnelle,...) (Brugarolas et al., 2004; Prick et al., 2006; Jin et al., 2009; Jung et al., 2010; Qin et al., 2010).

1. Stress du réticulum endoplasmique

Le RE est le lieu de synthèse d'une majorité de protéines, de la N-glycosylation, de la formation des ponts disulfures et de l'acquisition de leur structure tridimensionnelle (ou repliement).

Le repliement est aidé par des chaperons moléculaires dont notamment la protéine BiP/GRP78 (*heavy-chain Binding Protein/Glucose Related Protein 78*), dépendante de l'ATP et appartenant à la famille des HSP70 ainsi que la calnexine. BiP/GRP78 joue aussi un rôle dans la translocation post-

traductionnelle des protéines. La N-glycosylation nécessite l'intervention d'une enzyme membranaire : l'oligosaccharyl transférase (OST) dont le fonctionnement peut être bloqué par la tunicamycine, une toxine d'origine fongique (*Saccharomyces lysosuperficus*) provoquant un stress du RE. Celui-ci peut également être pharmacologiquement induit par la thapsigargine, un inhibiteur des pompes Ca²⁺-ATPases. L'identification et la prise en charge des protéines mal repliées peuvent également être réalisées par BiP/GRP78 qui reconnaît les régions hydrophobes exposées (Munro et Pelham, 1986; Fourie et al., 1994).

Un stress du RE se traduit par une accumulation de protéines mal repliées. La cellule déclenche alors une réponse adaptative, la réponse UPR (*Unfolded Protein Response*) qui a pour finalité d'augmenter l'expression de protéines chaperonnes et donc augmenter la capacité de repliement du RE, et d'enzymes de dégradation protéique (Kozutsumi et al., 1988). Cette réponse permet à la cellule de résister au stress mais peut déclencher un processus de mort cellulaire par apoptose si le stress est trop important (en durée ou en intensité) (Rao et al., 2004; Shore et al., 2011).

Si le stress du RE peut induire l'autophagie, une inhibition de l'autophagie par la 3-MA peut provoquer des anomalies de fonctionnement de cet organelle et inhiber le déclenchement de la réponse UPR donc l'autophagie régulerait la réponse cellulaire à un stress du RE (Li et al., 2008). Cependant, de façon surprenante cette inhibition de la réponse UPR serait indépendante de l'activité du complexe hVPS34-Beclin-1-p150.

2. Stress oxydatif

Des travaux mettent en évidence l'induction de l'autophagie par certaines ERO telles que le peroxyde d'hydrogène : H₂O₂ et l'anion superoxyde : O₂⁻. De ce fait, les toxines dirigées contre certains complexes de la chaîne de transporteurs d'électrons mitochondriale induisent la conduite d'un processus autophagique complet. Par ailleurs, il a également été mis en évidence que l'utilisation de ces substances provoquait plus particulièrement l'induction de la mort cellulaire autophagique ainsi que l'apoptose dans des lignées de cellules transformées ou dans des cellules cancéreuses telles que les cellules HeLa ou les U87-MG (TTFA, roténone) (Chen et Gibson, 2008). Une inhibition de la chaîne des transporteurs d'électron mitochondriale n'induit pas la mort cellulaire autophagique dans des astrocytes murins (contrairement aux cellules cancéreuses) (Chen et al., 2007).

De plus, toutes les espèces réactives de l'oxygène n'induisent pas cette réponse, en effet, le monoxyde d'azote NO et le ONOO⁻ (peroxynitrite) sont à l'origine d'un déclenchement de l'apoptose mais pas de la mort autophagique (n'induisent pas Beclin-1, Atg5 ni Atg12). En outre, l'origine même des ERO semble avoir un impact différent sur le déclenchement de l'autophagie, par exemple, au sujet de H₂O₂, s'il a été produit en extra-cellulaire ou en intra-cellulaire. Enfin, il a été mis en évidence que la catalase pouvait être dégradée spécifiquement par macroautophagie suite à certains signaux, favorisant ainsi la production d'ERO et par conséquent la survenue de la mort cellulaire (autophagique et/ou apoptotique) (Chen et al., 2008).

Les antioxydants tels que la vitamine C, les polyphénols et la vitamine E semblent promouvoir l'autophagie dans les cellules sans pour autant inhiber la synthèse protéique (Martin et al., 2002) (Karim et al., 2010) bien que cette donnée soit contredite par d'autres travaux arguant que puisque la présence d'ERO est nécessaire pour la mise en place de l'autophagie (Scherz-Shouval et al., 2007b; a) l'utilisation d'antioxydants inhibe l'autophagie (Au et al., 2010). Ce qui est apparemment vrai dans la modélisation de troubles dus à l'ischémie cérébrale où l'administration d'antioxydants réduit le taux de LC3-II.

3. Relations entre autophagie et mort cellulaire

a. Définition de la mort cellulaire autophagique

Les fonctions physiologiques de l'autophagie au niveau cellulaire vont majoritairement dans le sens de la protection et de la survie cellulaire. Néanmoins, il existe une mort cellulaire autophagique, classifiée en tant que mort cellulaire programmée de type II (Clarke, 1990; Kroemer et al., 2009). Cela ne signifie pas que l'autophagie est la seule responsable de la mort de la cellule mais qu'elle y est fortement associée. Ainsi, morphologiquement, une cellule engagée dans ce type de voie présente une importante vacuolisation liée à une induction robuste du processus autophagique. Cette mort correspond à une définition morphologique, car à l'inverse de l'apoptose, il n'existe pas de marqueur spécifique permettant de la caractériser. Elle est souvent observée lorsque le nombre de cellules à éliminer est important ou quand les cellules en dégénérescence sont difficiles d'accès pour les phagocytes (Shintani et Klionsky, 2004). D'autre part, les études montrant l'existence d'une mort cellulaire autophagique mettent en lumière d'une part l'existence d'un phénomène autophagique en utilisant les marqueurs classiques et d'autre part la mort cellulaire qui s'ensuit sans qu'il y ait forcément de relation de cause à effet (Eisenberg-Lerner et al., 2009) revenant à la notion de mort cellulaire avec autophagie.

b. Conditions de survenue de la mort cellulaire autophagique

Physiologiquement, la mort cellulaire de type II est souvent retrouvée au cours du développement dans de nombreux organismes et en particulier les invertébrés. En ce sens, l'autophagie tient une place importante dans le développement (embryogenèse et morphogenèse), au niveau cellulaire, ainsi que dans les processus d'adaptation. Ainsi, la mort cellulaire autophagique, induite par une hormone stéroïde, l'ecdysone, sera impliquée dans l'involution d'un certain nombre de structures obsolètes telles que les glandes salivaires (McPhee et Baehrecke, 2010), le corps gras, équivalent du foie chez les vertébrés, (Rusten et al., 2004) et l'intestin moyen larvaire (Denton et al., 2009; MCPhee et Baehrecke, 2009) au cours de la métamorphose des insectes. Pourtant, la suppression de l'expression d'Atg7 n'empêche pas la métamorphose mais la retarde (Juhász et Neufeld, 2008), indiquant que la participation de l'autophagie serait contributive mais pas directement effectrice. L'intervention des caspases et de la signalisation apoptotique sont nécessaires (Akdemir et al., 2006; Lehmann, 2008). Au contraire, la suppression de l'expression de la chaîne légère de la dynéine dans ce modèle conduit à la persistance des glandes salivaires due à un blocage de l'induction autophagique (Batlevi et al., 2010). La mort cellulaire associée à l'autophagie interviendrait également au cours de la vie de l'individu adulte lors du remodelage de certains tissus, par exemple la régression des glandes mammaires chez les femelles de mammifères après la période de lactation (Motyl et al., 2007; Gajewska et al., 2008), ou celle de la prostate des mammifères mâles après castration mais l'implication de l'autophagie dans la phase exécutive n'est pas avérée (Shen et Codogno, 2011). Cette mort cellulaire autophagique pourrait aussi survenir au cours de pathologies et a été décrite dans les neurones en dégénérescence au cours des maladies d'Alzheimer et de Parkinson (Nixon, 2006; Harrison et al., 2008). Une des causes suggérées correspondrait à une induction trop intense de l'autophagie (Scott et al., 2007).

c. Antinomie entre autophagie et mort cellulaire ? Réseau de voies de mort

Des processus de mort au cours desquels l'autophagie est nécessaire à l'activation des caspases ont déjà été décrits. Il a également été retrouvé des situations dans lesquelles l'autophagie était induite pour ralentir la survenue de l'apoptose (Abedin et al., 2007). De même il existe des formes de mort nécrotiques associées à un déclenchement intense de l'autophagie (Yu et al., 2006) et des cas où l'autophagie doit être induite pour « achever » la cellule apoptotique (Yue et al., 2003). L'autophagie est-elle réellement capable de causer la mort de la cellule ou est-ce un processus annexe (Nixon, 2006; Rami, 2009; Chen et Klionsky, 2011; Shen et Codogno, 2011) ? La question

est toujours d'actualité étant donné qu'il est très difficile de définir réellement ce qu'est la mort programmée de type II et qu'il existe un grand nombre de combinaisons possibles entre la survenue de l'autophagie et les différents acteurs connus pour être impliqués dans la mort cellulaire. En fait l'apoptose et l'autophagie sont des processus non exclusifs et un grand nombre de combinaisons existent en fonction du stress inducteur de mort cellulaire et du contexte cellulaire à ce moment. Ainsi, l'autophagie et l'apoptose peuvent fonctionner en tant que partenaires ayant pour but commun la mort de la cellule, ces deux événements pouvant survenir simultanément ou avec un certain délai, par exemple la défaillance de l'un entraînant l'induction de l'autre (Eisenberg-Lerner et al., 2009).

Les phénotypes observés dans le cas des souris mutantes pour des gènes impliqués dans la conduite de l'autophagie prouvent que lorsque l'activité autophagique est supprimée, l'apoptose continue de survenir normalement voire parfois de façon excessive (Fimia et al., 2007; Qu et al., 2007; Shen et Codogno, 2011). Les expériences menées à partir de cellules de souris *Atg5^{-/-}* mettent en évidence une nouvelle fonctionnalité de l'autophagie en relation avec la mort cellulaire : son accomplissement permet aux cellules apoptotiques d'exposer le signal « mangez-moi » en fournissant suffisamment d'énergie sous forme d'ATP pour ce faire. Yoshimori (Yoshimori, 2007) a extrapolé ce résultat en imputant à l'autophagie un rôle plus général dans le contrôle de l'apoptose en utilisant la métaphore de « Charon », gardien des Enfers dans la mythologie grecque, à qui les morts devaient donner une pièce pour pouvoir traverser le Styx sous peine de devoir errer des années durant. Dans ce cas l'autophagie contribue à l'apoptose en permettant l'accomplissement des événements apoptotiques dépendants de l'ATP (Eisenberg-Lerner et al., 2009).

Une étude montre que l'induction de la mort cellulaire par z-VAD, un inhibiteur des caspases, conduit à la mort cellulaire due à une induction de l'autophagie sélective prenant en charge sélectivement la catalase, une enzyme impliquée dans la détoxification des ERO. L'accumulation d'espèces oxydantes dans la cellule lèse les membranes cellulaires, cette perte d'intégrité conduisant à une mort de type nécrotique dont l'un des effecteurs est la cathepsine D (Yu et al., 2006). Cette induction de l'autophagie ne passe pas par la voie mTORC1 mais par la voie RIP/MKK7/JNK (Yu et al., 2004; 2006). Ainsi, certaines substances comme l'étoposide ou la staurosporine induisent préférentiellement la mort cellulaire autophagique, mais cet effet serait dépendant du type cellulaire considéré (Debnath et al., 2005).

Cette définition de la mort cellulaire autophagique est controversée car il existe de nombreuses configurations possibles conduisant à la mort de la cellule faisant intervenir de manière différentielle autophagie et apoptose. Par exemple, dans un modèle d'explants de rétine de rat en culture, l'inhibition de la synthèse protéique conduit à une mort des cellules post-mitotiques faisant intervenir l'autophagie puis l'apoptose (Guimarães et al., 2003). A l'inverse, l'autophagie peut également être considérée comme un mécanisme anti-apoptotique dans la mesure où elle peut prendre en charge et dégrader les mitochondries avant un effondrement de leur potentiel, signal déclenchant de la voie apoptotique intrinsèque.

Il est donc probable que le lien entre autophagie et mort cellulaire soit plus une question de niveau d'activité des différentes voies de signalisation et donc du taux d'activité autophagique cellulaire qu'un processus de type « activation-inhibition ». Aussi, un nouveau modèle intégratif a été présenté dans lequel les différentes formes de mort cellulaire sont contrôlées par un réseau de voies interconnectées pouvant spécifiquement conduire à l'une ou l'autre forme en fonction du contexte cellulaire et permettant d'expliquer toutes les combinaisons possibles de machineries de mort pouvant survenir (Norman et al., 2010; Shen et Codogno, 2011).

Ce concept de réseau permet d'expliquer également qu'en cas de faillite de l'un des systèmes, l'autre puisse être compensatoirement activé afin de pallier cela. Par exemple, la suppression de l'apoptosome au cours du développement du SNC cause une induction de l'autophagie (Moreno et al., 2006).

d. Connexions entre autophagie et apoptose

Certaines protéines essentielles pour l'autophagie sont directement impliquées dans la régulation de l'apoptose, comme Beclin-1, située à la charnière entre autophagie et apoptose (Kang et al., 2011). L'interaction, inhibitrice pour l'autophagie, entre Beclin-1 et Bcl-2 ou Bcl-XL n'empêche pas ces dernières de jouer leur rôle de protéines anti-apoptotiques. La dissociation de Beclin-1 d'avec Bcl-XL est régulée par DAPk, une sérine/thréonine kinase dépendante du calcium et de la calmoduline en phosphorylant Beclin-1 au niveau de son domaine BH3 (Zalckvar et al., 2009). Cette kinase est impliquée dans la survenue de la mort cellulaire suite à un stress du RE, cette mort étant dépendante à la fois de l'apoptose et de l'autophagie (Gozuacik et al., 2008). Donc, dans ce cas, autophagie et apoptose agissent en tant que partenaires avec un but commun, la mort de la cellule.

Il a été suggéré que Beclin-1 puisse réguler spatialement l'autophagie spécifique d'organites par interaction avec Bcl-2 ou BclXL (Patingre et al., 2005). Patingre et al. ont montré en 2005 que l'interaction entre Beclin-1 et Bcl-2 augmentait en cas de conditions nutritives favorables (donc en conditions physiologiques) (Patingre et al., 2005). Beclin-1 est clivé par les caspases au cours de l'apoptose (Cho et al., 2009; Luo et Rubinsztein, 2010; Wirawan et al., 2010; Zhu et al., 2010), ce qui inhiberait l'autophagie d'une part et, d'autre part, le fragment C-terminal en résultant serait ensuite transporté à la mitochondrie où il favoriserait le relargage de molécules pro-apoptotiques (Djavaheri-Mergny et al., 2010; Wirawan et al., 2010) bien qu'il puisse demeurer dans le cytoplasme alors que le fragment N-terminal passerait dans le noyau (Luo et Rubinsztein, 2010). Un grand nombre de protéines Atg peuvent être clivées par les protéases associées à la mort cellulaire (caspases et calpaïnes) (Norman et al., 2010) mais la signification de ces clivages n'a été élucidée que pour un petit nombre d'entre-elles dont Atg4D, clivée par la caspase-3 (Betin et Lane, 2009) et Atg5, substrat des calpaïnes 1 et 2 (Yousefi et al., 2006). Le clivage d'Atg5 lui conférerait une fonction pro-apoptotique, le fragment en résultant, relocalisé à la mitochondrie facilitant le déclenchement de l'apoptose suite au relargage du cytochrome c. Atg5 pourrait également jouer un rôle de facteur pro-apoptotique dans la mort cellulaire liée à l'interféron γ par une interaction avec FADD (*Fas Associated protein with death domain*) (Pyo et al., 2005).

II. CARACTÉRISTIQUES DE L'AUTOPHAGIE NEURONALE

A. Particularités du système nerveux central

Les neurones sont des cellules particulières compte-tenu de leur mode de fonctionnement, de leur état de différenciation et de leur vulnérabilité. De plus, le maintien de la protéostasie est crucial dans ces cellules post-mitotiques comme nous avons pu le voir dans les paragraphes précédents. Aussi, le déroulement de l'autophagie dans les neurones est particulièrement pris en considération.

Au niveau de l'organisme, le système nerveux est un organe privilégié. En terme de proportion, alors qu'il représente autour de 2% du poids corporel, le cerveau est responsable de la consommation de plus de 20% du glucose présent dans l'organisme. Ce dernier est aussi particulièrement fragile. Le SN est un système complexe et organisé dont les cellules effectrices, les neurones, communiquent au moyen de signaux électrochimiques, qui, au niveau des synapses

sont convertis en signaux chimiques par l'action des neurotransmetteurs. Il contient également les cellules de la névroglie qui ont un rôle de soutien, principalement des astrocytes et des oligodendrocytes, au niveau du SNC.

Les neurones sont des cellules quasiment insensibles aux stress dus à une privation en nutriments (Mizushima et Kuma, 2008; Nixon et Yang, 2011). Du fait de l'existence de la barrière hémato-encéphalique, les fonctions de l'autophagie envers des organismes pathogènes et des stress environnementaux pourraient être reléguées au second plan. Alors, il est hautement probable que les neurones se reposent en partie sur des cellules de soutien pour la lutte contre ce type de stress comme les cellules gliales (Alirezai et al., 2008; Deas et al., 2011).

A l'inverse, les neurones sont particulièrement sensibles à l'accumulation de protéines anormales et d'organites altérés, en particulier les mitochondries dont les lésions peuvent entraîner le relargage d'EOR et donc induire un stress oxydatif mais aussi être à l'origine de la survenue de l'apoptose. L'autophagie spécifique basale et en particulier la mitophagie et l'agrégation sont donc très importantes (Mizushima et Hara, 2006; Jaeger et Wyss-Coray, 2009; Deas et al., 2011; Yamamoto et Simonsen, 2011a). Les neurones ont donc besoin de système de contrôle qualité et de dégradation particulièrement efficaces.

B. Système lysosomal neuronal

Les neurones sont des cellules totalement asymétriques avec un corps cellulaire qui peut être à une distance importante des prolongements neuritiques (axone et dendrites). Elles nécessitent donc un mécanisme de transport vésiculaire et un cytosquelette robustes. Ces cellules possèdent un système lysosomal très développé (Nixon et al., 2000). Outre son action dans le catabolisme cellulaire, le système lysosomal, a un rôle important dans la signalisation neuronale et dans le métabolisme des neurotransmetteurs. Le système lysosomal neuronal est lui aussi polarisé et des études de l'acidité des compartiments vésiculaires ont établi que les lysosomes (compartiments les plus acides) avaient une localisation restreinte dans le compartiment somato-dendritique et plus particulièrement en région périnucléaire tandis que les vésicules précoces de la voie endolysosomale étaient préférentiellement retrouvées dans la portion axonale distale (Parton et al., 1992; Overly et al., 1995; Nixon et al., 2000; Korolchuk et Rubinsztein, 2011). L'acidification des vésicules augmente au fur et à mesure qu'elles se rapprochent du corps cellulaire neuronal (Overly et Hollenbeck, 1996). Les vésicules endocytaires sont transportées de manière unidirectionnelle

vers le soma (Overly et Hollenbeck, 1996). Il existe localement des zones où des vésicules de dégradation acides sont retrouvées et coïncident avec des zones où le réseau de microtubules est interrompu (zones de jonction avec des collatérales axonales par exemple). Une étude morphologique montre que les autophagosomes se forment majoritairement dans les axones et sont transportés majoritairement de manière antérograde le long des microtubules (Kaasinen et al., 2008).

C. Autophagie canonique et autophagie neuronale

1. Rôles de l'autophagie neuronale

L'autophagie est essentielle pour le maintien de l'homéostasie axonale, le trafic membranaire local ainsi que pour le recyclage des organites et des protéines (Komatsu et al., 2007b) ainsi que dans la signalisation neuronale puisqu'il existe une convergence des endosomes de signalisation (permettant le recyclage des récepteurs synaptiques) et de l'autophagie (Jaeger et Wyss-Coray, 2009; Webber et Tooze, 2010). Elle joue également un rôle important dans la croissance synaptique et la plasticité et peut avoir un effet sur l'apprentissage et les mécanismes de mémorisation : la LTP (long term potentiation) et la LTD (Shen et Ganetzky, 2009; 2010). Il s'agit d'un mécanisme protecteur qui ralentit l'avancée des PND et dont l'inhibition est associée à la neurodégénérescence (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006; Rubinsztein, 2007).

L'autophagie constitutive aurait un rôle clé dans le remodelage des neurites et la structure du cône de croissance durant l'extension neurale (Fimia et al., 2007). Elle pourrait également servir de mécanisme neuroprotecteur à travers la dégradation de protéines et d'organites pouvant s'accumuler au niveau axonal. En effet, l'existence d'un transport vésiculaire bidirectionnel et d'un mécanisme de signalisation rétrograde est primordial pour la survie neuronale (Kaasinen et al., 2008; Kimura et al., 2008; Jaeger et Wyss-Coray, 2009; Katsumata et al., 2010).

2. Voies neuronales de contrôle de l'autophagie

In vivo, un stress nutritionnel ne semble pas induire la voie autophagique au niveau cérébral (Mizushima, 2004; Komatsu et al., 2007a). Dans les neurones en culture, les données sont plus contradictoires, mais de nombreux facteurs rendent ce modèle différent de l'organe *in situ*, comme la suppression de la barrière hémato-encéphalique, la contribution des autres organes existant chez l'individu, l'influence des cellules associées au fonctionnement des neurones et le degré de pureté

en neurones des cultures. L'existence d'une autophagie déclenchée par un stress nutritionnel a pu être mise en évidence dans des neurones en culture suite à une privation en un composant riche en facteurs de croissance nécessaires à la culture primaire neuronale : le B27, sans pour autant augmenter le taux d'apoptose (Young et al., 2009; Young et La Spada, 2009) ou par privation totale en nutriments (Alirezaei et al., 2010). Le fait que les neurones ne répondent pas *in situ* aux stress métaboliques mais qu'ils le font en culture, situation artificielle les privant de leur environnement proche, fait tendre à penser que les neurones se reposent sur les autres cellules/tissus pour leur fournir les nutriments nécessaires à leur survie. En effet, les neurones sont alimentés par le transport sélectif du glucose, des aa et des hormones à travers la barrière hémato-encéphalique et par la glie qui fournit les facteurs trophiques nécessaires à leur survie. Il a également été avancé que les neurones ne répondaient que très moyennement à la rapamycine en comparaison avec d'autres types cellulaires (Nixon et Yang, 2011).

Plusieurs hypothèses concernant l'activité autophagique neuronale, son induction et sa régulation ont été alors émises. Elles mettent en avant une potentielle résistance des neurones vis-à-vis d'un stress nutritionnel et la possibilité d'une régulation de l'autophagie alternative aux voies canoniques classiquement énoncées. Il est probable que les voies de régulation mettent en jeu des acteurs différents ou tout du moins que les influences des différentes voies connues pour moduler les niveaux d'activité autophagique diffèrent en faveur d'une régulation très fine basée sur le rôle de l'autophagie dans le contrôle de la qualité protéique. Ces mécanismes diffèreraient également entre chaque type neuronal voire entre les différents compartiments du neurone.

Une étude menée par Komatsu et al, 2007 montre que l'autophagie semble avoir un rôle dans le transport, la régulation et le maintien de l'homéostasie membranaire au niveau des terminaisons axonales. Etant donné que l'autophagie est impliquée dans des mécanismes de remodelage cellulaire, il semble qu'elle soit également impliquée dans le contrôle de la taille cellulaire. Elle constituerait également une réponse adaptative pour le remodelage axonal en vue de sa régénération. L'axone est un compartiment neuronal hautement spécialisé qui a de nombreuses fonctions indépendantes du corps cellulaire.

3. Spécificités de l'autophagie dans les neurones

Une des raisons pour lesquelles la question de l'origine de la membrane autophagosomale n'est pas encore tranchée réside dans le fait que dans les cellules des eucaryotes supérieurs, contrairement

aux cellules de levure, les autophagosomes semblent se former en des localisations cytoplasmiques multiples et ce, de façon aléatoire.

Dans les neurones, cellules polarisées à l'extrême, la question même du lieu de formation des autophagosomes est matière à débat. Dans les souris Lürcher, pour lesquelles le récepteur au glutamate GluR δ 2, localisé au niveau des épines dendritiques, est muté on assiste à une dégénérescence des cellules de Purkinje. Or, il y a dans ces cellules une survenue rapide de l'accumulation d'autophagosomes au niveau des portions distales des axones dystrophiques et de façon plus robuste en comparaison avec les dendrites et le corps cellulaire de ces cellules où l'apparition d'autophagosomes est plus tardive et moins marquée (Wang et al., 2006). Une observation similaire est faite dans les neurones de patients atteints par la maladie d'Alzheimer (Nixon et al., 2005; Lee et al., 2011).

La maturation autophagique serait plus facilement bloquée dans les neurones en comparaison avec les autres types cellulaires (Settembre et al., 2008).

Les cellules de mammifères exhibent des niveaux basaux d'autophagie différents en fonction du type cellulaire (Mizushima et al., 2004). En revanche, les ponctuations positives pour LC3 sont très difficiles à détecter dans les neurones suggérant un niveau autophagique basal extrêmement faible (Boland et al, 2008, Young et al, 2009). Toutefois, il est indiscutable que l'existence d'une activité autophagique fonctionnelle est indispensable à l'homéostasie neuronale dans la lutte contre l'accumulation de protéines susceptibles de s'agréger, stress envers lesquels les neurones différenciés sont très vulnérables. En effet, la suppression de l'activité autophagique au niveau du SNC de souris cause une neurodégénérescence rapide associée à la présence d'inclusions intracellulaires de protéines positives pour l'ubiquitine et p62 (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006).

Par ailleurs de nombreuses études mettent en lumière le rôle neuroprotecteur de l'autophagie dans le système nerveux central.

D'un point de vue fonctionnel, la macroautophagie est particulièrement importante pour protéger les neurones du vieillissement. Les neurones sont des cellules consommatrices d'énergie sous forme d'ATP. Cette énergie est utilisée pour le transport axonal d'organites et de neurotransmetteurs. Elle est essentiellement produite au niveau de la mitochondrie par la phosphorylation oxydative. Celle-ci est accompagnée par la formation de radicaux libres qui, par le

biais du stress oxydatif, altèrent des organites et des protéines à longue demi-vie. Ces protéines et organites lésés doivent être éliminés par autophagie. Dans les neurones, en cas de déficit de l'autophagie, on peut s'attendre à une accumulation de protéines anormales (oxydées, mal conformées) et à une persistance d'organites lésés. Ces phénomènes peuvent conduire à la dégénérescence neuronale. En conséquence, le besoin d'un mécanisme autophagique fonctionnel s'accroît avec l'âge des neurones. L'efficacité des voies cataboliques diminuant avec l'âge, cela explique d'une part la vulnérabilité grandissante des neurones avec le temps et d'autre part que l'âge constitue le facteur de risque majeur d'un grand nombre de PND.

Par ailleurs, il est possible que les dysfonctionnements neuronaux affectent le mécanisme autophagique ou que ce mécanisme ne soit pas suffisant : dans les neurones : à l'état basal, peu de vésicules autophagiques sont observées ce qui suggère que l'autophagie constitutive dans les neurones est un mécanisme faiblement actif et doit être induit (Boland et al., 2006).

Concernant l'autophagie basale neuronale, de nombreuses contradictions existent. Bien que les niveaux de LC3-I soient particulièrement importants dans ce type cellulaire, il est notoire qu'il est particulièrement difficile de détecter des autophagosomes au niveau neuronal. Alors deux conclusions majeures sont possibles :

- les neurones ont un niveau d'autophagie constitutive extrêmement bas expliquant cette difficulté à détecter les vésicules autophagiques ;
- l'autre explication envisageable est que le flux autophagique, c'est-à-dire la vitesse d'exécution de cette voie catabolique dans sa totalité est particulièrement efficace. Dans ce cas, les autophagosomes sont difficiles à détecter non pas du fait de leur rareté mais ceci serait dû à la demi-vie extrêmement courte des autophagosomes dans la cellule (Boland et al., 2008).

PARTIE 4 : MALADIE D'ALZHEIMER ET AUTOPHAGIE

Le facteur de risque majeur de survenue de la maladie d'Alzheimer, comme pour la plupart des PNDs, est le vieillissement. La maladie d'Alzheimer se caractérise sur le plan neuropathologique par une perte neuronale associée à la formation de dépôts extracellulaires de peptides β -amyloïdes issus du clivage d'un précurseur : l'APP. Elle se caractérise également par l'accumulation intracellulaire de protéine tau anormalement hyperphosphorylée (phosphorylation au niveau de sites pathologiques) sous forme de DNF (figure 30).

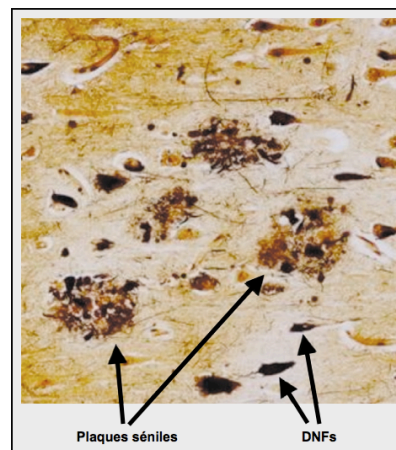


Figure 30 : Caractéristiques histopathologiques de la maladie d'Alzheimer (d'après Blennow et al., 2006).

A. La maladie d'Alzheimer est une amyloïdopathie

L'APP est une protéine *trans*-membranaire ubiquiste. Son ARNm, sujet à l'épissage alternatif, est à l'origine de huit isoformes distinctes dont trois (de 695, 751 et 770 aa) prédominent dans le tissu cérébral (Takahashi et al., 2002). Le clivage séquentiel de l'APP (figure 31) par une β -sécrétase puis par un complexe γ -sécrétase, au niveau du compartiment endo-lysosomal, conduit à la production d' $A\beta$, toxique, il s'agit de la voie dite amyloïdogénique (Yan et al., 1999). Deux formes toxiques fibrillogènes, les peptides $A\beta$ peuvent être ainsi produits : une forme de 40 aa notée $A\beta_{1-40}$ et une forme de 42 aa, $A\beta_{1-42}$, plus fibrillogénique. Le peptide $A\beta_{1-40}$ est le plus abondant, cependant, la forme $A\beta_{1-42}$ a été reliée à la pathologie puisqu'elle est augmentée dans les formes sporadiques et familiales ainsi que dans les cerveaux de patients atteints du syndrome de Down. Il existe également une voie dite non-amyloïdogénique, ayant lieu en conditions physiologiques, et consistant en un clivage de l'APP par l' α - puis par la γ -sécrétase (Selkoe, 2000). L'activité α -sécrétase est due à des enzymes appartenant à la famille ADAM (*A Disintegrin And Metalloprotease*) (Allinson et al., 2003). Le clivage dépendant des β -sécrétases résulte majoritairement de l'activité de la protéine BACE-1 (*β -Site APP-Cleaving Enzyme-1*). La γ -

sécrétase consiste en un complexe protéique composé par quatre protéines (De Strooper, 2003): la préséniline (1 ou 2), qui lui confère son activité catalytique, la nicastrine, PEN-2, et APH-1.

Dans la voie non-amyloïdogénique, le premier clivage par l' α -sécrétase, au niveau de l'extrémité amino-terminale de l'APP donne un premier fragment dit α -APPs (s : soluble) d'une part et α -CTF (*α -Carboxy-Terminal Fragment*) d'autre part, à son tour clivé par la γ -sécrétase conduisant à l'obtention des peptides p3 et AICD (*$A\beta$ PP Intracellular Domain*). En conditions pathologiques, le clivage de l'APP par la β -sécrétase génère un premier fragment amino-terminal β -APPs et β -CTF/C99. Ce dernier est ensuite pris en charge par la γ -sécrétase qui va alors séparer le peptide A β de l'AICD (figure 31).

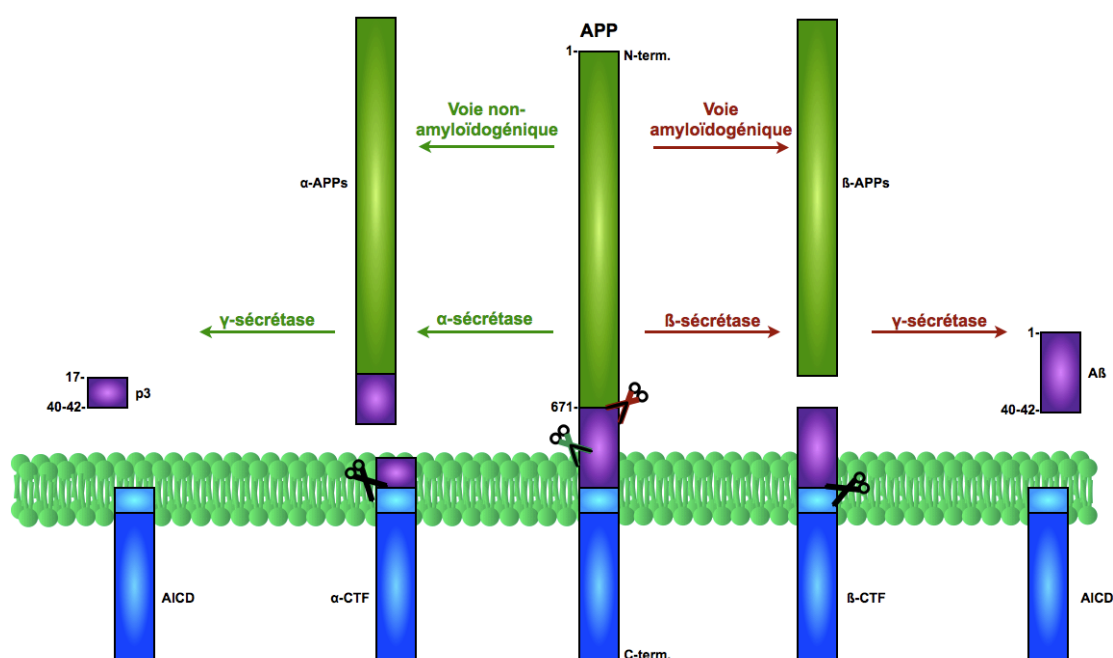


Figure 31 : Métabolisme de l'APP

Au cours de la voie non-amyloïdogénique (à gauche), physiologique, l'APP est successivement prise en charge par l' α -sécrétase puis par la γ -sécrétase donnant tour à tour les fragments α -APPs, p3 et l'AICD. La voie amyloïdogénique (à droite) génère le fragment pathologique amyloïdogène A β (40 ou 42 aa) par clivage de l'APP dans un premier temps par la β -sécrétase, puis par la γ -sécrétase résultant également en la formation des peptides β -APPs et AICD.

Avec l'avancée en âge, la plupart des voies cataboliques voient leur activité décliner (Cuervo et Dice, 2000c; 1998; Keller et al., 2000a; b; 2002). Les mécanismes de dégradation peuvent également être affectés par les stress cellulaires. Par conséquent, il est probable que la diminution de leur activité puisse être en relation avec l'accumulation du peptide A β . Dans le cas des formes familiales le point de départ est relié aux mutations observées chez les patients touchant les gènes APP, PS1 ou PS2 et conduisant à un accroissement de la production d'A β (Scheuner et al., 1996; Gómez-Isla et al., 1999). Dans les deux cas, cet accroissement des niveaux d'A β conduit à son

oligomérisation, forme sous laquelle sa toxicité semble être maximale (Tomiyama et al., 2010) et cause des lésions au niveau synaptique (Scheff et Price, 2003; Tanzi, 2005). Lui fait suite l'installation d'un processus inflammatoire au travers de l'activation de la microglie et des astrocytes (Salminen et al., 2008). Il s'ensuit une accélération et une progression des lésions conduisant à des perturbations de l'homéostasie ionique neuronale, à des perturbations des voies de signalisations conduisant en parallèle à la pathologie de tau puis à la mort neuronale et à la démence (figure 32).

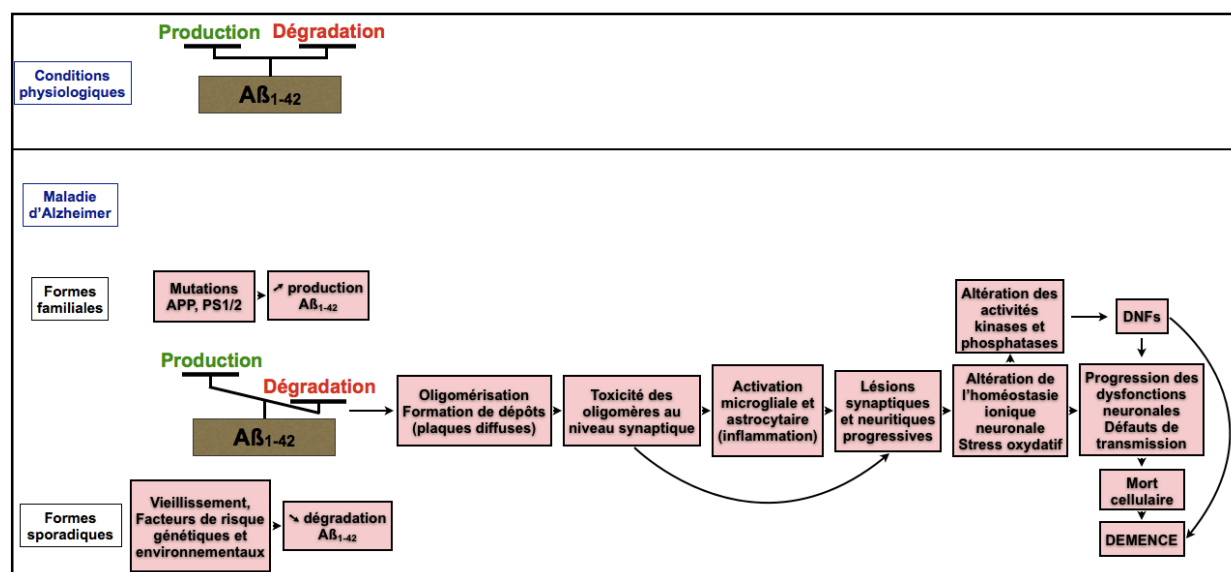


Figure 32 : Hypothèse de la cascade amyloïde

Selon cette hypothèse, le peptide $A\beta$ est à la base de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer. Une dérégulation de l'équilibre production/dégradation du peptide $A\beta$ favorise son oligomérisation et son accumulation et conduit à la formation de dépôts extracellulaires diffus. Les oligomères $A\beta$ exercent leur toxicité au niveau synaptique entraînant une cascade de dysfonctionnements conduisant à la mort cellulaire et à la démence. L'altération de la balance entre kinases et phosphatases découlant de l'oligomérisation de l' $A\beta$ serait parallèlement à l'origine de l'hyperphosphorylation de la protéine tau et à son agrégation au sein de DNF qui participeraient alors à l'établissement de la démence. D'après Blennow et al., 2006, Hardy et Selkoe, 2002.

B. La maladie d'Alzheimer est aussi une tauopathie

Les tauopathies sont des PND caractérisées par l'agrégation de protéines tau sous forme hyperphosphorylée dans les neurones en dégénérescence. La présence de telles structures est l'un des traits neuropathologiques observés dans les neurones de patients atteints par Alzheimer faisant de cette maladie une tauopathie (Grundke-Iqbal et al., 1986; Sergeant et al., 2005; Maeda et al., 2006).

1. Généralités sur la protéine tau

La protéine tau (*tubulin-Associated unit*) (Weingarten et al., 1975) est une protéine conservée interagissant avec le cytosquelette neuronal existant exclusivement dans les espèces animales eucaryotes supérieures et codée par le gène MAPT (*Microtubule-Associated Protein Tau*), au niveau du locus 17q21.1 (Neve et al., 1986). L'ARNm issu de la transcription de ce gène composé de 16 exons permet la génération de six variants par épissage alternatif des exons 2, 3 et 10 dans le SNC (Buee et al., 2000; Martin et al., 2011a) (figure 33).

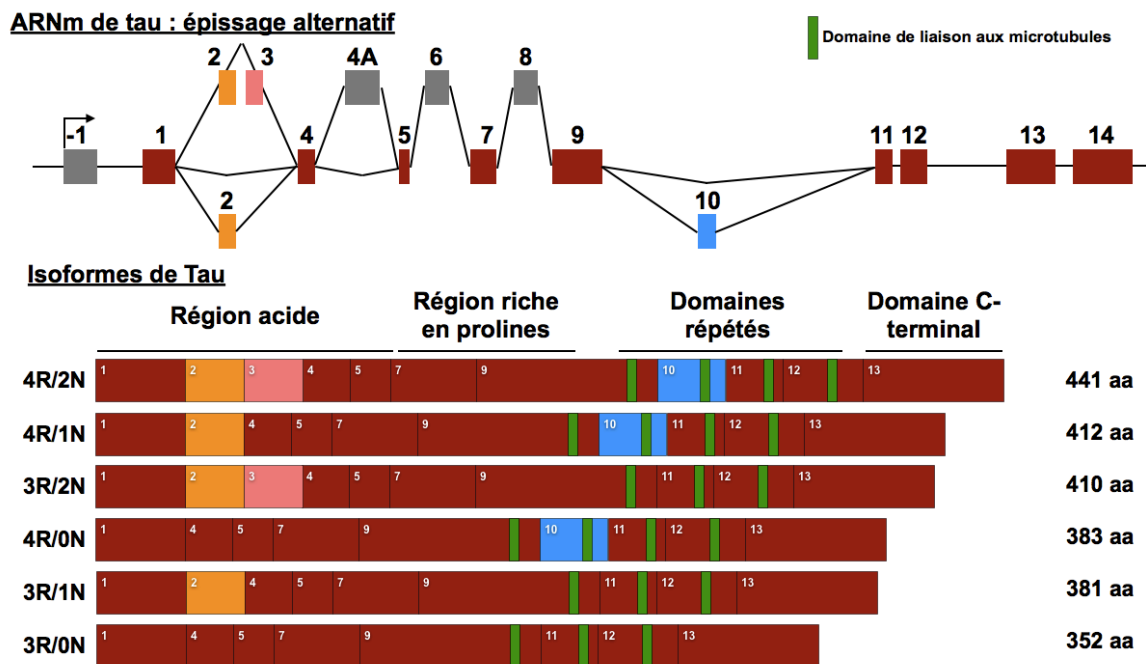


Figure 33 : Epissage alternatif de l'ARNm MAPT et isoformes retrouvées dans le SNC. D'après Buée et al., 2000 et Martin et al., 2011a

ARNm de tau : épissage alternatif : en rouge sont représentés les exons toujours traduits dans le SNC, en orange, rose et bleu sont ceux soumis à épissage alternatif. En gris sont représentés les exons non traduits dans le SNC. Il est à noter la présence dans l'exon 14 d'un codon stop prématuré conduisant à l'arrêt de la traduction des exons 15 et 16.

Isoformes de tau dans le SNC : leur séquence protéique varie de 352 à 441 aa pour un poids moléculaire apparent compris entre 60 et 74 kDa). En orange et rose sont représentés les exons 2 et 3 appartenant à la région acide (domaine de projection) de la protéine tau (0N : épissage des deux exons, 1N présence uniquement de l'exon 2, 2N présence des exons 2 et 3) ; l'exon 10 contenant un motif R (MBD, en vert) de liaison aux microtubules, la protéine tau en contenant 3 (3R) en l'absence de l'exon 10, 4 lorsqu'il est présent (4R).

Tau est une protéine cytosquelettique, essentiellement neuronale, trouvée principalement dans les axones et appartenant à la famille des MAP. De par sa nature, elle participe à l'organisation et à la stabilisation des microtubules, et permet le maintien de l'homéostasie axonale. Elle fonctionne au cours du transport axonal par régulation des moteurs dynéines et kinésines (régulation négative) contrôlant ainsi l'homéostasie synaptique (Mandelkow et al., 2003; Dixit et al., 2008; Spires-Jones et al., 2009). Elle est impliquée dans la croissance neuritique et la neurogenèse. Tau peut être présente dans le noyau où elle présente la capacité de se lier à l'ADN et participerait ainsi à la

médiation de la réponse cellulaire au stress oxydatif et possiblement aux chocs thermiques modérés en protégeant l'ADN (Sultan et al., 2011).

Tau contient de très nombreux sites cibles de modifications post-traductionnelles de différentes natures (phosphorylation, O-glycosylation, nitration, ubiquitinylation, clivage, prolyl-isomérisation, glycation et polyamination) (Sergeant et al., 2008; Martin et al., 2011a).

2. Phosphorylation des protéines tau

Le niveau de phosphorylation de la protéine tau régule son affinité pour les microtubules. Il est à noter que chaque domaine MBD contient un motif KXGS dont la phosphorylation au niveau de la sérine favorise le détachement de tau du cytosquelette (Biernat et al., 1993; Drewes et al., 1995). A l'inverse, certains sites de phosphorylation accroissent l'affinité de tau pour les microtubules et promeuvent leur assemblage ce qui est le cas du site T150 ciblé par p38^{MAPK}δ (Feijoo et al., 2005).

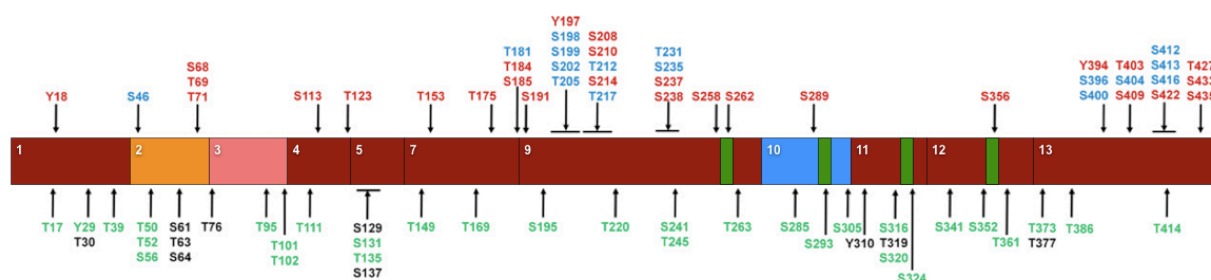


Figure 34 : Sites de phosphorylation de la protéine tau. D'après Martin et al., 2011a

Représentation des sites de phosphorylation sérine (S), thréonine (T) et tyrosine (Y) de la protéine tau, d'après Martin et al., 2011a. L'isoforme représentée est l'isoforme 4R/2N, la plus longue (441).

Sont représentés en vert les sites phosphorylés en conditions physiologiques, en rouge les sites phosphorylés chez les patients atteints de maladie d'Alzheimer; en bleu sont les sites phosphorylés en conditions physiologiques comme pathologiques, enfin, en noirs sont représentés des sites putatifs de phosphorylation mais non prouvés in vivo ou in vitro.

La protéine tau est physiologiquement phosphorylée, en particulier au cours du développement. Les fonctions de tau associées à ses différents états de phosphorylation sont loin d'être établies (Ittner et Götz, 2011). Certains sites sont décrits pour l'être spécifiquement en conditions pathologiques comme au cours de la maladie d'Alzheimer (figure 34, sites de phosphorylation représentés en rouge). Certaines de ces phosphorylations pathologiques constituent un événement précoce au cours de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer (Braak et Braak, 1991; Johnson et Stoothoff, 2004) et l'intensité de la pathologie de tau est directement corrélée au déclin des fonctions cognitives (Gómez-Isla et al., 1997; Spires-Jones et al., 2009). Parmi ces phosphorylations pathologiques, certaines d'entre elles favorisent l'agrégation de la protéine

particulièrement au niveau de l'extrémité carboxy-terminale et d'autres provoquent la mort neuronale par apoptose (Abraha et al., 2000; Haase et al., 2004).

Les niveaux de phosphorylation de tau sont régulés par un équilibre entre l'activité de protéines kinases et de protéines phosphatases.

Au niveau cérébral, PP2A (cf **Partie 2-II-B-3-b-i**) est particulièrement abondante puisqu'elle constitue près de 1% de la masse protéique cellulaire totale et contribue à plus de 70% de l'activité phosphatase (Liu et al., 2005b; Xu et al., 2008). Aussi, il est logique que cette enzyme constitue la phosphatase majeure de la protéine tau (Goedert et al., 1995; Sontag et al., 1996; 1999).

Tau a été reconnue comme pouvant être un substrat *in vitro* des protéines PP1, PP2B et PP5 (Liu et al., 2005a; b) et de PP2B *in vivo* mais seules PP1, PP2A et PP2B semblent être à même de déphosphoryler tau lorsqu'elle est sous forme hyperphosphorylée (Hernández et Avila, 2007).

3. Agrégation de tau et maladie d'Alzheimer

Des mutations de la protéine tau sont responsables de la survenue de PND comme la démence fronto-temporale avec parkinsonisme liée au chromosome 17 (FTDP-17 ; *Frontotemporal Dementia with Parkinsonism linked to chromosome 17*). Par ailleurs l'expression de formes mutées de tau dans des modèles animaux suffit à induire le développement de PND caractérisées par la présence d'enchevêtrement neurofibrillaires et de la plupart des événements pathologiques associés à la pathologie à l'exception de la formation des plaques séniles (Ramsden et al., 2005). Donc des anomalies de tau sont suffisantes pour causer une cascade d'événements pathologiques.

Le point de départ du processus d'agrégation n'est pas clairement établi mais il semble que l'augmentation du taux de phosphorylation de tau cause son détachement des microtubules (et provoque leur déstabilisation). Cependant, cette relation de cause à effet demeure floue, et à l'inverse, une désorganisation primaire des microtubules peut provoquer l'hyperphosphorylation et l'accumulation de tau (Miyasaka et al., 2010). Tau alors soluble peut se dimériser puis s'oligomériser et former des protofilaments qui s'apparient deux à deux résultant en la formation de paires de filaments hélicoïdales (PHF ; *Paired Helicoidal Filament*) s'agrégeant sous la forme d'inclusions intraneuronales positives pour d'autres protéines comme p62 et l'ubiquitine et correspondant aux DNF, stade ultime de l'accumulation de tau (Babu et al., 2005; Martin et al.,

2011a). Il est à noter que le clivage de tau par les caspases augmente sa capacité à s'agréger (Gamblin et al., 2003).

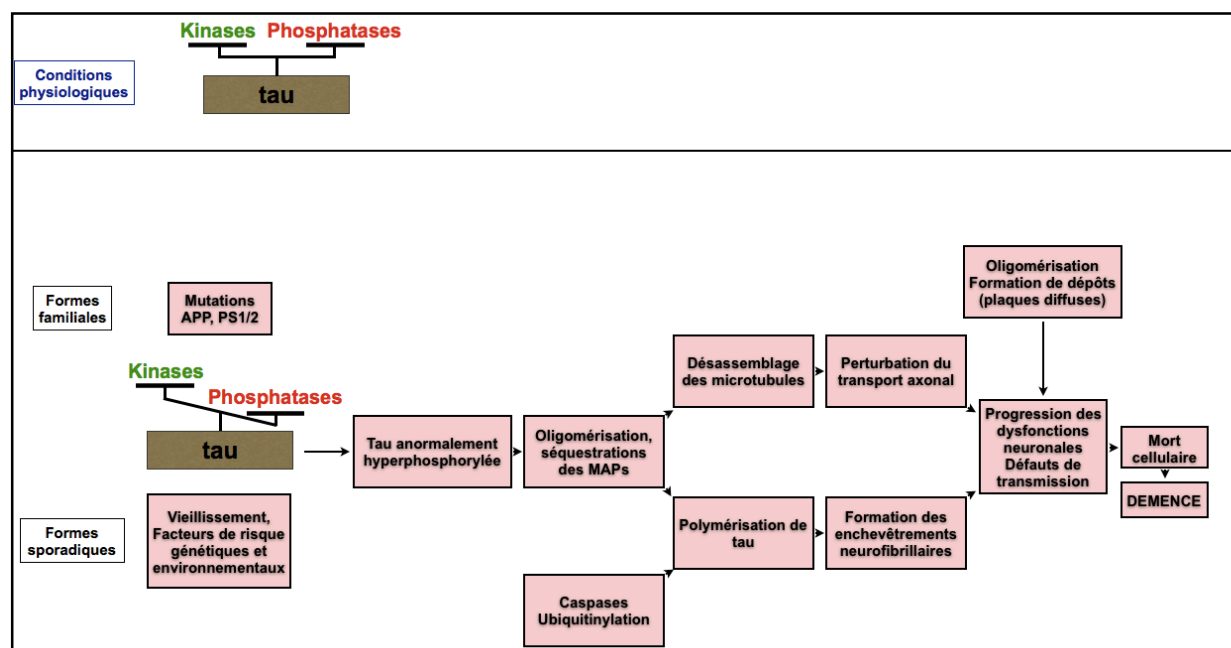


Figure 35 : Pathologie de tau au cours de la maladie d'Alzheimer.

Les facteurs de risques génétiques et environnementaux influent déséquilibrent la balance kinases/phosphatases de tau conduisant à l'hyperphosphorylation et à l'oligomérisation de la protéine, suivies par le processus d'agrégation pouvant en découler d'une part, la déstabilisation du cytosquelette d'autre part, le tout conduisant à la dysfonction et à la mort neuronale causant la survenue de la démence. Parallèlement à cela se produirait la formation des plaques séniles. D'après Blennow et al., 2006.

L'activité de certaines kinases de tau est altérée au cours de la pathologie comme GSK3 β , CDK5, Akt/PKB qui voient leurs activités augmentées et celles de la PKA et PKC diminuées (Chung, 2009). Dans les cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer, les ARN messagers de la PP2A (sous-unité B55 α) ainsi que l'activité enzymatique de la protéine sont diminués (Gong et al., 1993; Vogelsberg-Ragaglia et al., 2001) alors qu'à l'inverse, la présence de l'inhibiteur endogène-1 de la PP2A, I $_1$ PP2A est accrue (Tanimukai et al., 2005; Chen et al., 2008a). Cette décroissance de l'activité de la PP2A contribuerait à l'hyperphosphorylation de la protéine tau de même qu'à la production de peptide A β au cours de la maladie d'Alzheimer (Sontag et al., 2007). La perte de l'activité de la PP2A est suffisante pour causer une hyperphosphorylation robuste de la protéine tau (Martin et al., 2009) et entraîner des conséquences sur l'assemblage du cytosquelette (Nunbhakdi-Craig et al., 2007). PP2A régule aussi l'activité de certaines kinases de tau, ainsi des perturbations de l'activité de la PP2A entraînent une modification de l'activité de kinases de tau et accentuent le déséquilibre kinases/phosphatases observé en conditions pathologiques (Lin et al., 2007; Meske et al., 2008; Iqbal et al., 2009). Dans les neurones, la pathologie de tau débute au niveau axonal conduisant à une perte de l'intégrité des microtubules

dans les neurites et à l'accumulation de tau anormale dans le compartiment somato-dendritique (Ittner et Götz, 2011).

Basée sur la dérégulation de tau causée par un déséquilibre entre les activités kinases et phosphatases suite à la pression des facteurs de risques, est développée l'hypothèse de la pathologie de tau au cours de la maladie d'Alzheimer (figure 35). Il existe cependant des liens entre pathologies de tau et peptide A β (Hardy et Selkoe, 2002). En effet, le peptide A β peut induire la pathologie de tau (Tomiyama et al., 2010). Des co-occurrences entre les deux pathologies peuvent être spatialement observées (Takahashi et al., 2010), et de manière réciproque, chaque espèce protéique sensibilise les neurones à la toxicité de l'autre (Jin et al., 2011). Par exemple la toxicité du peptide A β au niveau synaptique, par l'intermédiaire de récepteurs au glutamate, semble dépendre de la fonction de la protéine tau (Ittner et Götz, 2011). Une surexpression de tau diminuerait le trafic vésiculaire et le transport d'organites comme les peroxysomes (ce qui augmente le risque de stress oxydatif). Tau inhiberait également le transport d'APP contenue dans des vésicules vers les dendrites et les axones (Stamer et al., 2002). La pathogenèse de la maladie d'Alzheimer est un processus complexe nécessitant une vision intégrée des protéines ayant une fonction dans la cascade d'évènements conduisant à la démence (Ittner et Götz, 2011). La phosphorylation pathologique de tau et la production du peptide A β sont des évènements précoces conduisant à l'expression phénotypique de la maladie impliquant qu'en amont, les facteurs environnementaux et génétiques soient identiques. Ces facteurs influent sur la physiologie neuronale jusqu'à un seuil qui marque le passage d'un état physiologique altéré à des conditions pathologiques. La compréhension de la nature des changements s'opérant à ce niveau est primordiale dans la compréhension de la maladie et l'établissement de stratégies thérapeutiques efficaces.

C. La maladie d'Alzheimer : une pathologie lysosomale ?

Au cours de la maladie d'Alzheimer comme dans la plupart des PND, surviennent des anomalies de la voie autophagique, néanmoins dans ce cas particulier, la pathologie autophagique/lysosomale est particulièrement importante (Okamoto et al., 1991; Cataldo et al., 1996; 1997; Boland et Nixon, 2006). Elle se traduit par l'accumulation précoce de vacuoles autophagiques immatures dans les portions distales des neurites dystrophiques pouvant résulter d'une élévation de l'activité autophagique et/ou par une anomalie des processus de fusion (Nixon, 2006).

Les pathologies de surcharge lysosomale sont dues à des mutations affectant des gènes codant des protéines lysosomales, la plupart d'entre elles affectant des hydrolases (Settembre et al., 2008). Elles se caractérisent par une diminution de la capacité des lysosomes à prendre en charge certains substrats résultant en des défauts affectant la totalité du compartiment lysosomal cellulaire et conduisent à l'accumulation de vésicules autophagiques anormales proches de ce qui peut être observé dans des cellules exposées *in vitro* à des inhibiteurs de la fusion autophagosomes/lysosomes. Un certain nombre d'entre elles sont associées à une neurodégénérescence comme par exemple la maladie de Niemann-Pick de type C. Selon un modèle établi par Settembre et al., en 2008, certains mécanismes pathologiques caractéristiques aux pathologies de surcharge lysosomale peuvent être rapportés aux PND, qui présentent des traits pathologiques communs, et en particulier à la maladie d'Alzheimer au cours de laquelle l'accumulation d'autophagosomes est proche de ce qui est obtenu pour des cultures neuronales exposées par exemple à la leupeptine (Boland et al., 2008; Settembre et al., 2008; Nixon et Yang, 2011). En ce sens, l'activation des enzymes lysosomales dans des modèles de souris transgéniques de la maladie d'Alzheimer exprimant une forme humaine de gène APP muté restaure l'activité autophagique et a un effet bénéfique sur la progression de la pathologie (Yang et al., 2011).

L'élévation des niveaux de marqueurs de l'autophagie constitue un événement très précoce dans la pathogenèse et apparaît avant la formation des plaques amyloïdes et des DNF (Cataldo et al., 1996; Nixon et al., 2005; Yu et al., 2005). En même temps que la maladie progresse, l'efficacité autophagique diminue, en particulier au niveau de la maturation des autophagosomes (Yu et al., 2005). La perturbation du mécanisme autophagique va aussi contribuer indirectement à la pathologie puisque ce mécanisme constitue une voie de dégradation de protéines impliquées dans la pathogenèse.

L'inhibition du SUP par l'accumulation de protéines anormales (Korolchuk et al., 2009b), le stress du RE ainsi que les autres stress comme le stress oxydatif sont connus pour être des inducteurs de l'autophagie (Scheper et al., 2011).

1. Liens entre autophagie et toxicité du peptide A β

Les vésicules autophagiques immatures possèdent la machinerie nécessaire à la production de peptide β -amyloïde et leur accumulation constitue autant de sites supplémentaires de production (Yu et al., 2005; Mizushima, 2005; Cataldo et al., 2008). De manière additive, les anomalies de l'autophagie induisent une augmentation de l'activité γ -sécrétase (Ohta et al., 2010). Par ailleurs, il

a été montré que la PS1 était impliquée dans le trafic d'une certaine catégorie de protéines membranaires et qu'indépendamment du complexe γ -sécrétase elle pouvait intervenir dans le *turn-over* de certaines protéines (télencéphaline) par un mécanisme d'autophagie (Esselens et al, 2004). L'APP et ses métabolites sont des substrats de l'autophagie. Ces données ont été contredites récemment concernant l'implication des autophagosomes dans le métabolisme de l'APP (Boland et al., 2010), n'excluant pourtant pas un effet indirect. Les anomalies de la voie autophagique se répercutant sur le compartiment lysosomal, clairement impliqué dans le clivage de l'APP. Chez la souris, la perte d'un allèle de Beclin-1 est suffisante pour diminuer l'activité autophagique neuronale et potentialiser la pathologie amyloïde alors qu'à l'inverse, l'expression de Beclin-1 est protectrice (Lee et Gao, 2008; Pickford et al., 2008; Jaeger et al., 2010). Par ailleurs, l'activité de Beclin-1 est diminuée de façon précoce dans les cerveaux de patients touchés par la maladie d'Alzheimer.

Une publication récente met en évidence, par des techniques d'extraction lipidique dans des lignées cellulaires, le fait que le peptide A β est plus fréquemment associé à la PE dont l'inhibition de la synthèse serait protectrice (Cazzaniga et al., 2011). Bien que dans cette étude aucune relation avec l'autophagie n'ait été faite, l'importance de ce lipide dans le mécanisme autophagique suggère néanmoins une connexion. Des travaux menés en 2009 chez la drosophile mettent en évidence un autre lien entre le peptide β -amyloïde et l'autophagie. L'une ou l'autre forme de peptide A β ont été surexprimées chez des mouches, et il a été observé chez les animaux exprimant le peptide A β_{1-42} un raccourcissement de la durée de vie associée à une neurodégénérescence et à l'accumulation de vésicules autophagiques dans les neurones contrairement aux mouches exprimant A β_{1-40} . Ces animaux présentent une durée de vie normale malgré des dépôts extracellulaires d'A β (Ling et al., 2009). Ces résultats concernant la toxicité du peptide A β_{1-42} pour la voie endolysosomale et autophagique ont été confirmés dans des cultures primaires corticales de rat (Song et al., 2011).

De façon plus générale l'activité de la PS1 est requise pour la maturation des vésicules autophagiques.

Hung et al, en 2009, ont mis en évidence que l'induction de l'autophagie protégeait les neurones contre la cytotoxicité induite par le peptide β -amyloïde (Hung et al., 2009).

2. Protéine tau et autophagie

Plusieurs aspects semblent être importants concernant les relations entre tau et le mécanisme autophagique. Premièrement, considérons tau en tant que substrat de voies cataboliques. En conditions physiologiques, la protéine tau endogène est un substrat connu du protéasome (David et al., 2002; Delobel et al., 2005) et présente deux motifs de type KFERQ conduisant théoriquement à sa prise en charge par la CMA (Wang et al., 2009). Les formes exogènes, mutantes ou non, (surexpression) et pathologiques de tau (hyperphosphorylées, clivées et/ou agrégées) sont dégradées par macroautophagie (Berger et al., 2006; Wang et al., 2009; Dolan et Johnson, 2010). De plus, les anomalies de la protéine tau causent l'inhibition de la CMA conduisant à une activité macroautophagique compensatoire (Wang et al., 2009; 2010c). De même, différentes données mettent en évidence que l'activité du protéasome peut être perturbée par l'accumulation de protéines ubiquitinyllées et/ou agrégées, conditions où l'autophagie est également induite de manière compensatoire. Tau peut être dégradée par les calpaïnes, *in vitro* et *in vivo* de manière indépendante de la pathologie amyloïde (Garg et al., 2011). Une inhibition de l'autophagie permettrait l'activation des calpaïnes, peut-être par le biais de la dégradation d'un régulateur de ces protéases : la calpastatine, conduisant à la protéolyse de tau (Zhang et al., 2009b). Dans des modèles animaux de tauopathie, l'induction de l'autophagie permet la dégradation de la protéine tau (Berger et al., 2006). En 2008, Hamano et al., ont prouvé qu'une perturbation lysosomale provoquée par la chloroquine inhibait l'élimination de tau et favorisait son accumulation ainsi que son agrégation. Cette agrégation ne semble pas être causée par une altération du niveau de phosphorylation de tau (Hamano et al., 2008). L'ensemble de ces points permet d'affirmer que l'autophagie est un acteur important du catabolisme de tau et représente un mécanisme neuroprotecteur important contre les formes pathologiques de la protéine.

Maintenant en prenant en compte les fonctions cellulaires de tau, aucun lien direct avec l'autophagie n'a été établi mais certains faits suggèrent qu'un tel lien puisse exister. Parmi les fonctions physiologiques de la protéine tau figure la régulation du transport axonal le long des microtubules et le maintien de l'intégrité de cette entité cytosquelettique. Tau interagit avec les différentes protéines motrices impliquées (kinésines et dynéines). Tau a une action inhibitrice sur le transport antérograde et favorise la voie rétrograde dépendante des dynéines. Des perturbations de l'homéostasie de tau entraînent des défauts importants à ce niveau. Au niveau neuronal, le transport rétrograde est particulièrement important pour l'activité autophagique (Rubinsztein et al., 2005b; Kimura et al., 2008; Katsumata et al., 2010) et des perturbations du fonctionnement des dynéines et/

ou une désorganisation des microtubules affectent ce processus catabolique en particulier en fixant la barrière spatiale entre les autophagosomes, qui se forment préférentiellement au niveau axonal et les lysosomes majoritairement localisés dans le péricaryon (Webb et al., 2004; Ravikumar et al., 2005; Boland et al., 2008). Ajoutée à cela, la localisation des lysosomes, dépendante des microtubules, va elle-même influencer sur l'autophagie à travers le contrôle de la voie mTOR (Korolchuk et al., 2011; Korolchuk et Rubinsztein, 2011). Compte-tenu de l'effet de la pathologie de tau sur la désorganisation des microtubules et le transport axonal, il serait logique que ces perturbations puissent être impliquées dans les anomalies autophagiques. A l'inverse, des perturbations au niveau autophagique/lysosomal entraînent un dysfonctionnement du transport axonal et de la stabilité des microtubules (Lee et al., 2011). Cette instabilité des microtubules a été rapportée pour causer une hyperphosphorylation de la protéine tau (Miyasaka et al., 2010). Par ailleurs, la protéine LC3 appartient, comme tau, à la famille des MAP. LC3 peut interagir avec la protéine ubiquitaire MAP1S dont la fonction au cours de l'autophagie est avérée (Xie et al., 2011). Tau, en tant que MAP essentiellement neuronale pourrait également intervenir dans le fonctionnement de l'autophagie dans ce type cellulaire particulier

De façon intéressante, la progression de la pathologie autophagique est spatialement parallèle à la progression de tau, débutant au niveau axonal pour se déplacer ensuite dans le compartiment somato-dendritique (Ittner et Götz, 2011; Nixon et Yang, 2011).

Plus d'une trentaine de kinases, dont certaines sont impliquées dans la signalisation autophagique, sont impliquées dans la phosphorylation en conditions physiopathologiques de tau dont GSK3 β , CDK5, CKI, ERK1/2 et SAPK/JNK (Iqbal et al., 2009) et voient leur activité perturbée. La signalisation liée à mTOR, principal régulateur négatif de l'autophagie est altérée dans des modèles animaux et dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Griffin et al., 2005; Lafay-Chebassier et al., 2005). La perturbation de l'équilibre des activités kinases/phosphatases ne doit donc pas être uniquement observée sous l'angle de la pathologie de tau et les conséquences sur les autres processus cellulaires doivent être prises en considération.

3. Modèle incluant la pathologie autophagique lysosomale à la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer

L'intégration des avancées sur l'implication de l'autophagie dans la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer en considérant que des anomalies de la voie autophagique constituent un changement précoce antérieur à la formation des plaques séniles et des DNF, que des anomalies de l'APP et/ou du fonctionnement des présénilines peuvent affecter l'autophagie et enfin que le vieillissement, facteur de risque majeur de la maladie d'Alzheimer, associé à l'exposition chronique à des facteurs de stress cellulaires (facteurs de risques environnementaux et génétiques) conduisent à une perte progressive de la capacité des cellules à maintenir leur homéostasie dans des cellules particulièrement vulnérables (neurones). Ceci se reflétant par une diminution de l'activité des voies cataboliques cellulaires et des modifications du réseau protéostatique résultant en une perturbation de l'équilibre kinases/phosphatases.

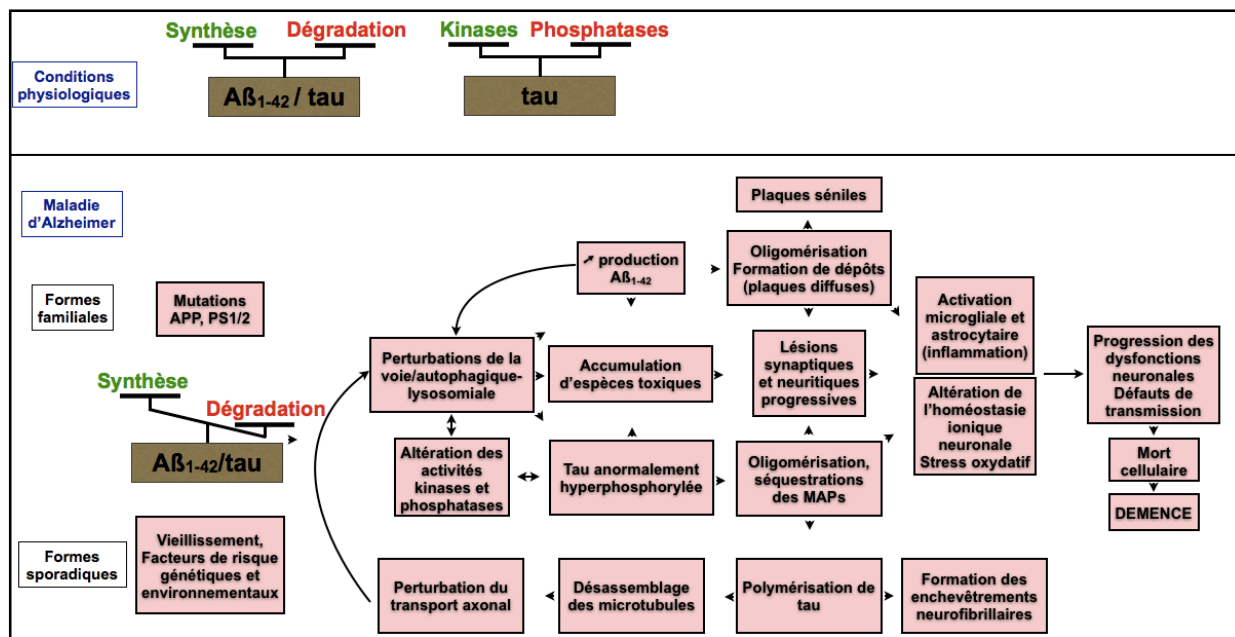


Figure 36 : Modèle hypothétique de la pathogenèse de la maladie d'Alzheimer basé sur une perturbation primaire de la voie autophagique/lysosomale.

Les mutations génétiques (formes familiales), le vieillissement et les facteurs de risques environnementaux et génétiques (formes sporadiques) conduisent à l'altération de l'autophagie en affectant cette voie à différents niveaux (signalisation, déroulement, maturation). Dans le cadre de la signalisation, toutes les voies sont probablement affectées. Cette somme d'anomalies favorise la production de peptide Aβ et de formes pathologiques de tau, et leur oligomérisation. Leur séquestration au sein d'agrégats insolubles (plaques séniles et enchevêtrement neurofibrillaires, respectivement) constituant une stratégie de protection adoptée par la cellule. Les formes oligomériques toxiques seraient à l'origine de la plupart des conséquences observées au niveau synaptique et neuronal. Au cours de la progression de la pathologie, on assiste à une accentuation du phénomène par effet boule de neige, le tout conduisant à la perte neuronale et à la survenue de la démence.

Ces éléments permettent d'établir un modèle pathogénétique basé sur une altération primaire de la voie autophagique/lysosomale et représenté dans la [figure 36](#). La perturbation de l'activité autophagique lysosomale survient lorsque le seuil physiologie/pathologie est franchi. Ce seuil correspond à l'accumulation d'anomalies légères dues à l'environnement et associées à des variations génétiques propres à chaque individu. Il est probable que ces anomalies consistent en des altérations des voies de signalisation et à un ralentissement du flux causé par une diminution de l'activité des enzymes lysosomales. L'ensemble de ces phénomènes fournit un environnement favorable à la production de peptide A β , dont la forme A β ₁₋₄₂ est un potentialisateur. La phosphorylation pathologique de tau découlerait de la perturbation de l'homéostasie des voies de signalisation protéiques. L'accumulation d'espèces protéiques toxiques favorise la progression de la pathologie en exerçant leur toxicité sur le fonctionnement synaptique, l'altération de l'homéostasie ionique, l'activation microgliale et astrocytaires déclencheur de l'inflammation. A chaque étape, une boucle d'amplification est possible. Par exemple, l'altération de l'homéostasie calcique influe sur l'autophagie, de même que le stress du RE découlant de l'oligomérisation de protéines anormales ou encore, la protéine tau hyperphosphorylée en perturbant l'organisation des microtubules et le transport axonal.

Hypothèses et objectifs

Le vieillissement est le premier facteur de risque inhérent à la plupart des PND et en particulier à la maladie d'Alzheimer. Plusieurs mécanismes participant au maintien de l'homéostasie cellulaire et plus précisément à celui de la protéostasie voient leur activité décliner avec le temps et en conditions pathologiques. Parmi ces mécanismes figurent le SUP (Keller et al., 2000b) et la CMA (Zhang et Cuervo, 2008). Il a été montré qu'une déficience de l'une de ces voies pouvait conduire à l'induction compensatoire de la macroautophagie.

Les neurones sont des cellules particulières pour lesquelles le mécanisme autophagique n'est pas parfaitement compris et les données de la littérature convergent vers l'idée selon laquelle la régulation autophagique neuronale divergerait des voies de régulations canoniques observées dans les autres types cellulaires de l'organisme. Deux « types » d'autophagie ont été décrits : l'autophagie induite, permettant à la cellule de s'adapter et de survivre à des stress d'origines diverses, et l'autophagie basale, constitutive, indispensable au maintien de l'homéostasie cellulaire. Il est possible que ces deux formes soient à ce point dissociées et que les neurones se reposent sur leurs relations particulières avec les cellules gliales afin de se protéger contre des stress à l'échelle du SNC (privation nutritionnelle, hypoxie ...).

Si l'activité autophagique est intrinsèquement « moindre » dans les neurones en comparaison avec d'autres types cellulaires du SNC (les cellules gliales), une perte de cette activité pourrait potentialiser l'agrégation de protéines anormales et accroître la vulnérabilité des neurones face à des stress induits par des facteurs environnementaux et génétiques et ainsi participer à la pathogenèse des PND. Différentes constatations plaident en faveur de cette hypothèse. La première réside dans le fait que la suppression de l'autophagie au niveau du SNC est suffisante à induire la neurodégénérescence quel que soit le gène ciblé expérimentalement : Atg5, Atg7 voire Beclin-1 qui potentialise la pathologie amyloïde dans les souris APP (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006a; Pickford et al., 2008). Deuxièmement, l'induction de l'autophagie favorise la survie neuronale, même en conditions pathologiques (expression exogène de protéines anormales ayant propension à s'agréger). Enfin, dans la plupart des PND, le processus autophagique présente des anomalies importantes bien que l'on ne sache pas si ces anomalies font directement partie du processus de pathogenèse ou si elles en sont une conséquence.

En utilisant majoritairement les cultures primaires établies à partir de cortex cérébraux prélevés sur des embryons de rat, nous projetons de réaliser une analyse détaillée de l'autophagie dans les neurones et de la comparer à d'autres cellules du SNC et plus particulièrement aux astrocytes. S'il

s'avère que l'induction de l'autophagie est plus faible dans les neurones, existe-t-il des substances capables de l'induire dans ces cellules sans toxicité et de procurer ainsi une neuroprotection ? En ce sens, nous avons caractérisé les propriétés pro-autophagiques d'une substance connue, l'amphotéricine B dans les cellules de la lignée COS-7. Cette caractérisation sera étendue au modèle présenté ci-dessus, et nous tenterons, si les résultats sont positifs, d'étudier les mécanismes engagés et de caractériser son mode d'action à ce niveau.

Les causes de l'agrégation de la protéine tau et du peptide A β , respectivement sous la forme de DNF et de plaques séniles, ainsi que la contribution de ces lésions à la dégénérescence demeurent inconnues à l'heure actuelle. Quel est le rôle de l'autophagie ou de ses dysfonctionnements dans la pathogenèse ? A l'inverse, il a été montré que le peptide A β pouvait être impliqué dans la dérégulation et les anomalies de l'autophagie, en est-il de même pour la protéine tau pathologique ?

Aussi, dans une troisième partie, nous nous attacherons à étudier les mécanismes pouvant être à l'origine des dysfonctionnements de l'autophagie observés dans les modèles animaux et dans les cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer *in vitro* dans le modèle biologique de cultures primaires corticales enrichies en neurones préparées à partir d'embryons de rat. Cette étude sera basée sur l'utilisation d'une substance modélisant certains aspects de la pathologie Alzheimer, en particulier le versant « tauopathie » de cette maladie : l'acide okadaïque (OKA). L'OKA est un inhibiteur connu de la PP2A. Deux démarches sont envisagées : une première partie cherchera à expliquer comment l'activité autophagique est influencée par l'exposition des cellules à l'OKA et s'il existe un lien entre les modifications de la protéine tau et la dérégulation de l'autophagie, et une deuxième partie consistera à établir s'il est possible de protéger les neurones de l'effet de l'OKA en induisant le processus autophagique.

Résultats et discussion

PARTIE 1 : ANALYSE COMPARATIVE DE L'AUTOPHAGIE DANS DIFFÉRENTS TYPES CELLULAIRES DU SYSTÈME NERVEUX CENTRAL

La suppression de l'autophagie dans les cellules du SNC est suffisante pour induire la formation d'inclusions de protéines ubiquitinylées et la neurodégénérescence (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006a). La diminution de l'expression de Beclin-1 potentialise la pathologie β -amyloïde chez les souris APP (Pickford et al., 2008). L'induction de ce mécanisme catabolique est protectrice contre l'expression de protéines anormales ayant propension à s'agréger.

Des anomalies de l'autophagie sont observées dans la majorité des PND, à quoi sont dues ces anomalies ? Quelles contributions ont-elles dans la pathogenèse de ces maladies ? Existe-t-il des liens réciproques entre ces anomalies et la présence d'agrégats de protéines au cours des PND ? Est-ce que les anomalies de l'autophagie adaptative considérée comme « aspécifique » contribue à la neuroprotection ? L'autophagie est un mécanisme qui, comme dans le cas des autres voies cataboliques déclinerait avec l'âge. N'est-il pas concevable que ce déclin concerne plus particulièrement l'autophagie constitutive, ce qui pourrait causer en retour une induction compensatoire (pouvant être considérée comme paradoxale) de l'autophagie adaptative avec finalement des effets néfastes pour les neurones ?

Il est également possible que dans les neurones, cellules extrêmement spécialisées, la régulation de l'autophagie diverge des voies de régulation canoniques retrouvées dans les autres types cellulaires. Les neurones sont dépendants des cellules gliales qui comptent pour environ 90% des cellules du SNC chez l'humain. Quelle est la contribution de ces cellules dans le maintien de l'homéostasie neuronale ? Dans la première partie de ce travail, nous nous sommes attachés à caractériser les conditions d'induction de l'autophagie neuronale et de la comparer aux conditions d'induction de ce processus dans les cellules gliales et plus particulièrement dans les astrocytes.

I. CARACTÉRISATION DES CULTURES PRIMAIRES CORTICALES

Des cultures primaires corticales mixtes d'embryons de rat enrichies en neurones ou en astrocytes ont été utilisées afin d'établir les comparaisons de l'activité autophagique entre les neurones et les autres cellules du SNC. Nous avons caractérisé le taux d'enrichissement de ces cultures par immunofluorescence en utilisant des anticorps dirigés contre la GFAP en tant que marqueur des astrocytes et contre la protéine tau en tant que marqueurs neuronaux (figure 39). Un contre-marquage nucléaire a été réalisé en utilisant le DAPI afin de mettre en évidence toutes les cellules présentes dans les cultures.

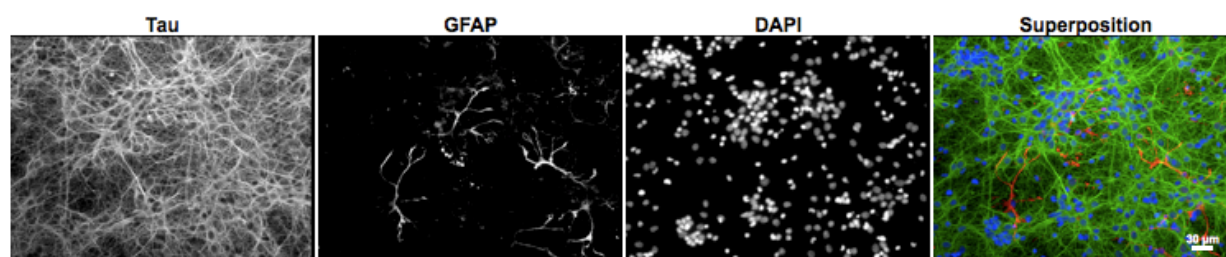


Figure 37 : Caractérisation des cultures primaires corticales enrichies en neurones par immunofluorescence
Le marquage de la β -III-tubuline (vert) est spécifique des neurones, celui de la GFAP (rouge) caractérise les astrocytes.
Barre d'échelle : 30 μ m.

Ainsi, les cultures primaires enrichies en neurones contiennent en moyenne 82% de neurones, environ 15% d'astrocytes et autour de 3% de cellules non-marquées correspondant à d'autres types cellulaires (figure 37).

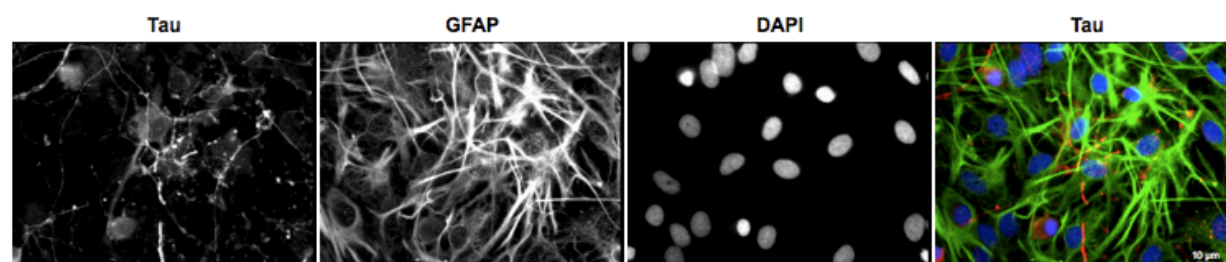


Figure 38 : Caractérisation de la composition des cultures primaires corticales enrichies en astrocytes
Les neurones sont visualisés grâce au marquage de la protéine tau (rouge) et les astrocytes par celui de la GFAP (vert). Barre d'échelle : 10 μ m.

Les cultures enrichies en astrocytes comptent, quant à elles, en moyenne, 2% de neurones, 92% d'astrocytes et 6% d'autres types cellulaires (figure 38).

II. ANALYSE DE L'AUTOPHAGIE BASALE ET INDUITE DANS LES NEURONES EN COMPARAISON AVEC LES ASTROCYTES

A. Immunofluorescences dans les cultures primaires corticales enrichies en neurones.

1. Détection des autophagosomes *in situ*

La conjugaison de LC3 à la PE augmente la mobilité électrophorétique de LC3-II par rapport à LC3-I. LC3-I est une forme plus abondante que LC3-II, autophagosomale, en conditions basales. L'induction de l'autophagie provoque un changement dans cette distribution. En imagerie (immunofluorescence indirecte ou expression exogène d'une protéine LC3 couplée à une protéine fluorescente), LC3-II, apparaît sous forme de ponctuations définies, alors que la forme non-liée présente une localisation cytoplasmique diffuse qui peut parfois suivre la répartition des microtubules (Mizushima, 2009). LC3 constitue donc un bon marqueur qualitatif et quantitatif de l'état autophagique cellulaire (Mizushima, 2004; Kawai et al., 2006). Néanmoins, des anomalies de la maturation autophagique peuvent causer une accumulation des autophagosomes dans la cellule et donc une augmentation artificielle de la présence de LC3-II (Kuma et al., 2007). Cela implique de prendre des précautions dans l'interprétation des variations de LC3-I et LC3-II et d'utiliser des contrôles supplémentaires (voir plus loin). En outre, la plupart des anticorps dirigés contre LC3 présentent une meilleure affinité pour LC3-I par rapport à LC3-II. Par conséquent, en western-blot, il est recommandé de présenter les densités relatives des signaux LC3-I et LC3-II sous la forme d'un rapport LC3-II/LC3-I, des variations de ce rapport étant alors plus pertinentes que les variations de LC3-II seules (Mizushima et Yoshimori, 2007).

Afin de visualiser les autophagosomes, des doubles immunofluorescences ont été réalisées dans des cultures primaires corticales enrichies en neurones. Les astrocytes sont mis en évidence grâce au marquage de la GFAP et les neurones par celui de la protéine tau. Les autophagosomes correspondent à des structures ponctiformes positives pour LC3. Ainsi il est possible de comparer les densités autophagosomales entre ces deux types cellulaires en conditions basales et suite à une exposition de 24h des cellules à 500 nM de rapamycine.

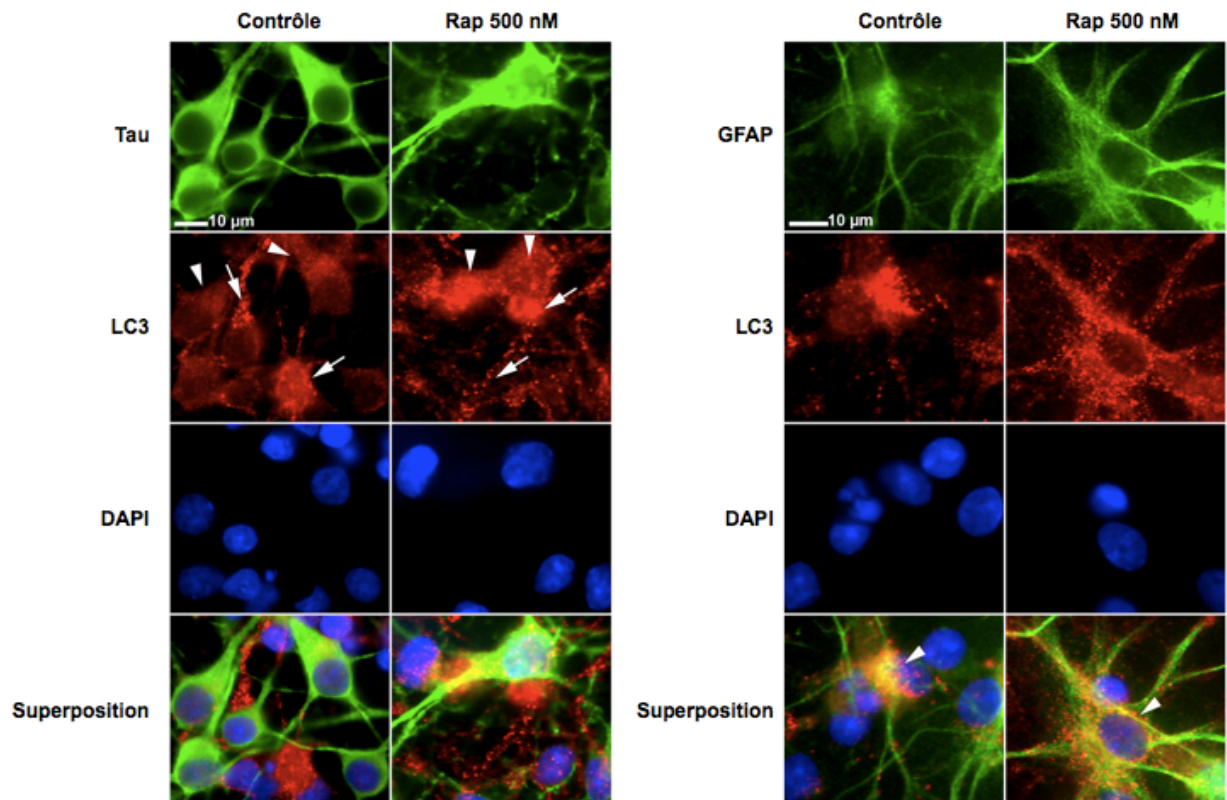


Figure 39 : Détection in situ des vésicules autophagiques dans les cultures primaires neuronales dans les neurones (panel de gauche) et dans les astrocytes (panel de droite)

La détection de tau (en vert, à gauche), a été utilisée en tant que marqueur neuronal et celle de GFAP (panel de droite, en vert) en tant que marqueur astrocytaire. La détection de LC3 (rouge) permet la mise en évidence des vésicules autophagiques. L'analyse de la présence des vésicules autophagiques a été réalisée en conditions basales (contrôle) à des conditions inductrices de l'autophagie (rapamycine 500 nM ; rap 500). Les têtes de flèches indiquent des cellules avec un marquage LC3 diffus sont positives pour tau alors que les têtes de flèches montrent des clusters d'autophagosomes, ces cellules étant non-neuronales (négatives pour tau).

En conditions basales, l'intensité globale du marquage LC3, de même que la densité apparente des autophagosomes est plutôt basse dans les neurones (figure 39, panel de gauche, première colonne) par rapport aux cellules non-neuronales. La rapamycine induit une augmentation de l'expression de LC3 à la fois dans les neurones (cellules positives pour tau) et dans les cellules non-neuronales (cellules tau-négatives) (figure 39 panel de gauche, deuxième colonne). Les astrocytes correspondent au type majoritaire de cellules non-neuronales dans ce type de cultures. Ils correspondent donc probablement aux cellules tau-négatives présentant une forte activité autophagique. Les doubles immunofluorescences révélant le marqueur astrocytaire, GFAP, et autophagique, LC3 confirment cette observation (figure 39, panel de droite). En effet les cellules positives pour GFAP présentent un marquage LC3 ponctiforme plus fort en comparaison avec les cellules négatives pour la GFAP, que ce soit en conditions basales ou lorsque l'autophagie est induite.

2. Profils d'expression de Beclin-1

L'induction de l'expression de Beclin-1 peut-être utilisée en tant que marqueur d'activité autophagique (Liang et al., 1999; Scarlatti et al., 2004; Shintani et Klionsky, 2004b; Wang et al., 2010a) puisque suite à une signalisation inductrice de l'autophagie, Beclin-1 forme un complexe avec hVPS34 et p150 nécessaire à la nucléation du phagophore. Cependant, une forme d'autophagie indépendante de Beclin-1 a été décrite (Chu et al., 2007).

Des doubles immunofluorescences ont été réalisées avec des anticorps dirigés contre Beclin-1 et tau, d'une part, ainsi qu'envers Beclin-1 et GFAP d'autre part, dans des cultures primaires enrichies en neurones. Dans ces cultures, la présence de Beclin-1 est essentiellement retrouvée dans les cellules tau-négatives et présentant une morphologie astrocytaire, en conditions basales (figure 40, panel de gauche). Les neurones présentent quant à eux un marquage Beclin-1 plus faible. L'exposition des cellules à la rapamycine augmente l'intensité du marquage de Beclin-1 dans les deux types cellulaires (figure 40, panel de gauche, deuxième colonne).

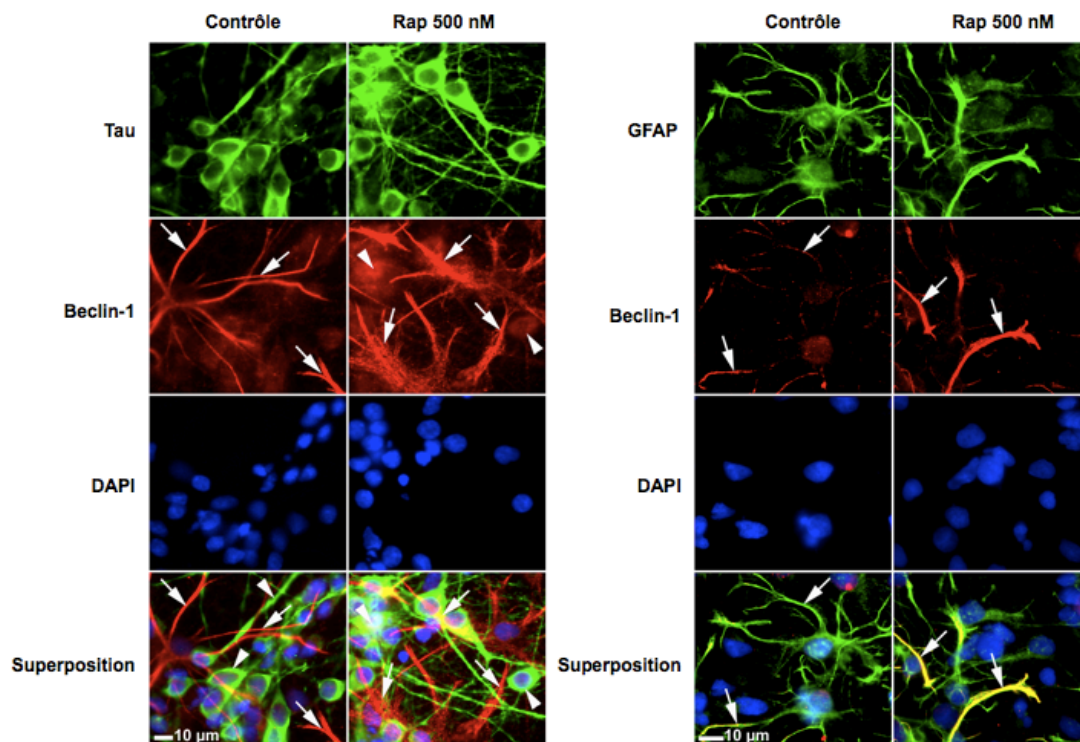


Figure 40 : Détection in situ de Beclin-1 dans les neurones et les astrocytes issus de cultures primaires corticales enrichies en neurones.

La détection de tau (en vert, à gauche), a été utilisée en tant que marqueur neuronal et celle de GFAP (panel de droite, en vert) en tant que caractéristique des astrocytes. Beclin-1 est révélée en rouge. Dans les deux types de cultures, un fort marquage Beclin-1 a une morphologie astrocytaire a été détecté (flèches), ces cellules étant négatives pour tau dans les cultures neuronales et positives pour GFAP dans les cultures enrichies en astrocytes. En conditions inductrices d'autophagie (rap 500 nM), Beclin-1 est bien détectée dans la région cytoplasmiques de cellules positives pour tau (neurones ; têtes de flèches).

Ces observations sont confirmées par les marquages en double immunofluorescence mettant en évidence Beclin-1 et GFAP (figure 40, panel de droite) où les marquages sont superposés. Le marquage est intensifié suite à l'exposition des cellules à la rapamycine (figure 40, panel de droite, deuxième colonne). La localisation de Beclin-1 dans les astrocytes, paraît plus intense dans les prolongements alors que le corps cellulaire est moins marqué. L'expression de Beclin-1 dans les neurones est donc inductible par la rapamycine.

B. Immunofluorescences dans les cultures primaires corticales enrichies en astrocytes

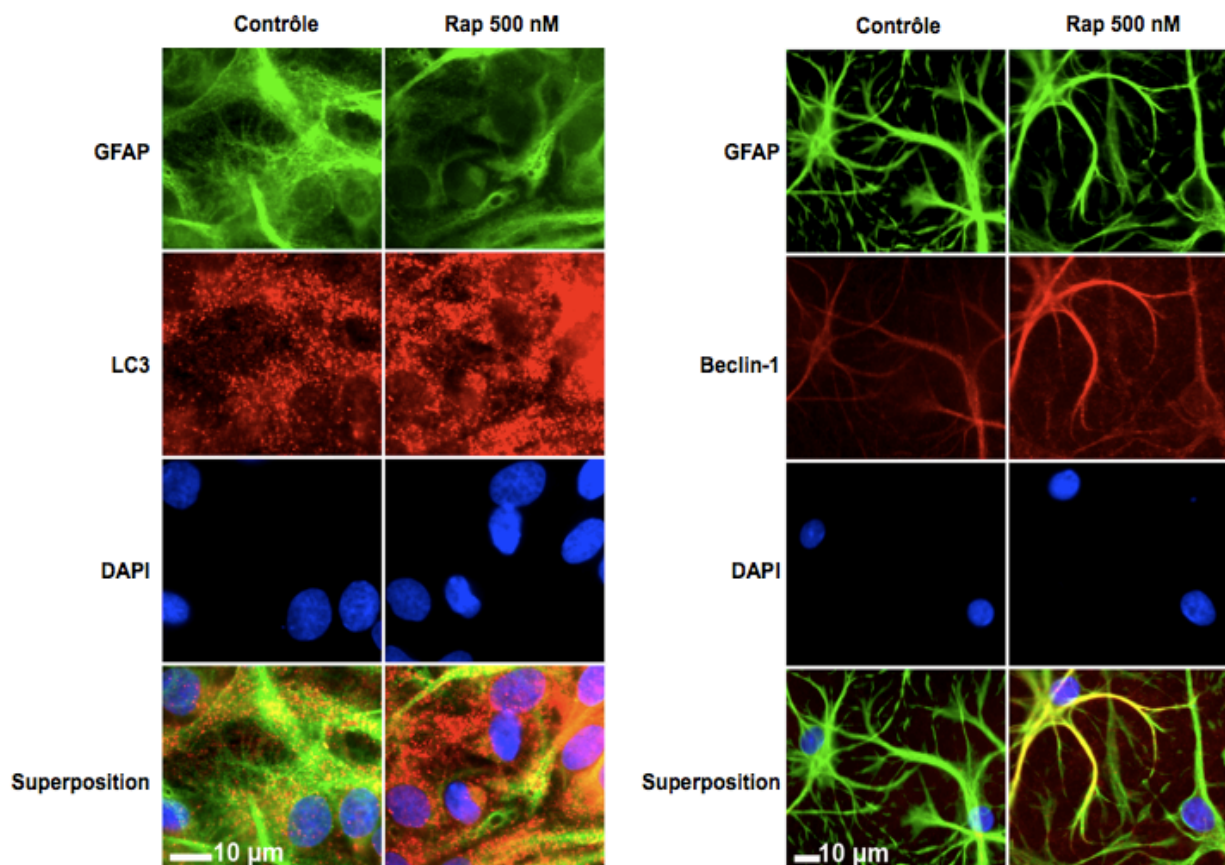


Figure 41 : Détection in situ des vésicules autophagiques (panel de gauche) et de Beclin-1 (panel de droite) dans les cultures primaires enrichies en astrocytes
 GFAP (panel de droite, en vert) est utilisé en tant que marqueur astrocytaire. L'analyse de la présence des vésicules autophagiques a été réalisée en conditions basales (contrôle) à des conditions inductrices (rapamycine 500 nM ; rap 500 nM). La détection de LC3 (rouge) permet la mise en évidence des vésicules autophagiques (panel de gauche), marquage apparemment plus fort en condition d'exposition à la rapamycine. Le panel de droite présente des cultures astrocytaires dans lesquelles Beclin-1 a été détectée, son expression étant augmentée dans les conditions en présence de rapamycine

Afin de confirmer si la fréquence des autophagosomes et l'expression de Beclin-1 sont plus élevées dans les astrocytes, des doubles immunofluorescence révélant LC3 et GFAP d'une part et

Beclin-1 et GFAP d'autre part, ont été réalisées dans des cultures corticales enrichies en astrocytes (figure 41).

En conditions basales, l'intensité de la densité de ponctuations positives pour LC3 est en effet très nette dans les cellules astrocytaires (figure 41, panel de gauche, première colonne). Celle-ci est accrue suite au traitement par la rapamycine (figure 41, panel de gauche, deuxième colonne).

De façon similaire, la présence d'une forte expression de Beclin-1 dans les cellules positives pour GFAP est retrouvée dans ces cultures primaires enrichies en astrocytes (figure 41, panel de droite), en conditions basales (figure 41, panel de droite première colonne) comme en conditions d'exposition des cellules à la rapamycine (figure 41, panel de droite, deuxième colonne).

Dans les deux types de cultures cellulaires, la morphologie des noyaux, marqués par le DAPI, indique l'absence d'induction de la mort cellulaire de type apoptotique (peu de cellules dont le noyau présente une condensation de la chromatine ou une fragmentation nucléaire) (figures 39 à 41).

Ces données vont donc dans le sens des résultats précédents : les marqueurs autophagiques sont plus facilement détectables dans les cellules négatives pour tau essentiellement ; les astrocytes sont des cellules pour lesquelles ces mêmes marqueurs sont relativement abondants. D'autre part, on peut noter que puisqu'il y a augmentation de la détection des marqueurs liés à l'activité autophagique dans les neurones suite à leur exposition à la rapamycine, la machinerie autophagique y est présente et fonctionnelle.

III. ANALYSE DES MARQUEURS AUTOPHAGIQUES PAR WESTERN-BLOT

Afin de confirmer les données issues de l'analyse *in situ*, nous avons analysé l'expression de Beclin-1 et le taux de conversion de LC3-I en LC3-II comme marqueurs autophagiques en western-blot sur des extraits cellulaires issus de cultures primaires corticales enrichies en neurones ou en astrocytes. Tau était utilisée en tant que contrôle du taux d'enrichissement des cultures (figure 42 A). Pour induire l'autophagie, les cultures ont été traitées pendant 24 heures avec 500 nM de rapamycine (figure 42 A). La différence observée entre neurones et astrocytes en imagerie est

retrouvée dans les analyses en western-blot. L'analyse semi-quantitative de la variation du ratio LC3-II sur LC3-I correspondant au taux de conversion de LC3-I en LC3-II (figure 42 B) montre qu'en conditions basales, ce rapport est plus élevé dans les cultures enrichies en astrocytes (1,07 en unités arbitraires) par rapport aux cultures enrichies en neurones (0,14) soit une augmentation d'environ 7,6 fois du taux de lipidation de LC3 dans les astrocytes par rapport aux neurones.

Dans les cultures enrichies en neurones, l'exposition des cellules à 500 nM de rapamycine pendant 24 heures provoque un accroissement du taux de conversion de LC3 de 0,14 à 0,93 unités arbitraires soit un rapport d'environ 6,7 fois. Dans les cultures enrichies en astrocytes, dans les mêmes conditions, ce taux passe de 1,07 à 1,33, soit une augmentation du taux de conversion de seulement 1,2 fois. Par conséquent, lorsqu'on induit l'autophagie par la rapamycine, l'induction de la lipidation de LC3 est de près de 5,6 fois plus importante (6,7/1,2) dans les neurones en

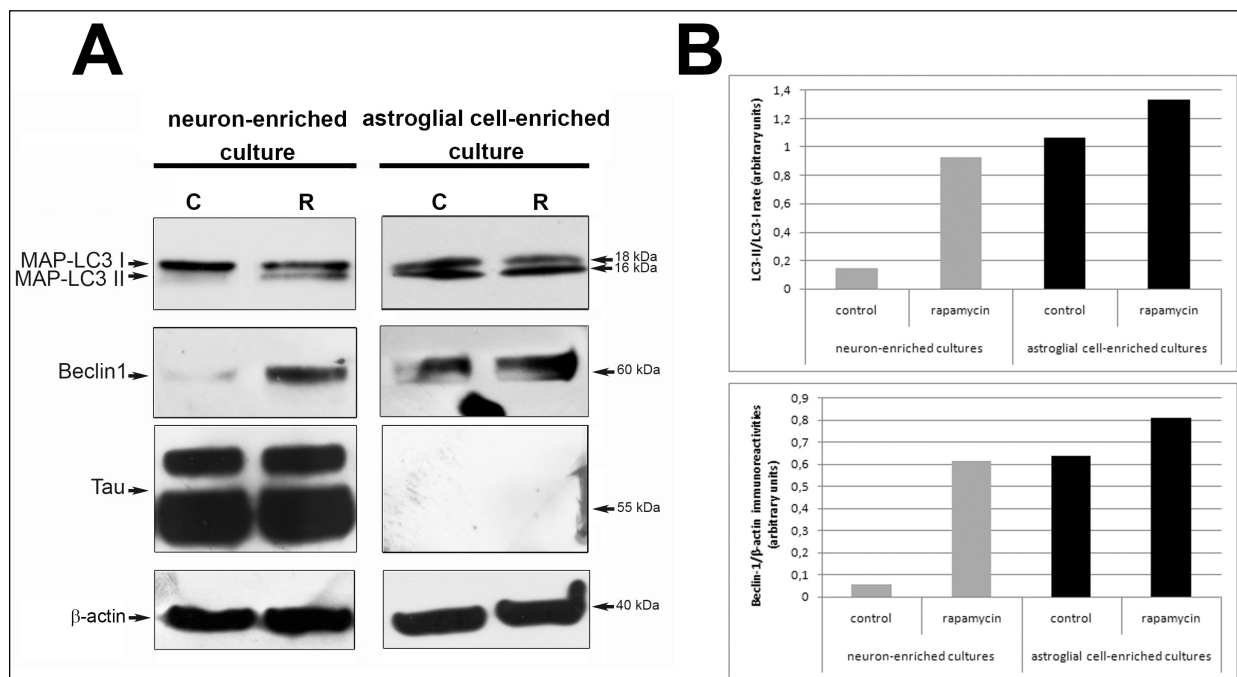


Figure 42 : Analyse des marqueurs autophagiques (LC3 et Beclin-1) en western blot

A- Immunodétection de Beclin-1 et de LC3 en western-blot pour des extraits de cultures primaires neuronales (à gauche) en conditions basales (C) et en présence de 500 nM de rapamycine (R). A droite, cultures enrichies en astrocytes.

B- Analyse semi-quantitative des western-blot. Graphe du haut rapport de la densité optique du signal pour LC3-II/LC3-I (en unités arbitraires), graphe du bas, analyse du signal correspondant à Beclin-1 normalisé sur celui de l'actine.

comparaison avec les astrocytes. Concernant l'expression de Beclin-1, en conditions basales, l'immunoréactivité de Beclin-1 (normalisée sur le signal correspondant à la détection de l'actine) est de 0,05 (en unités arbitraires) dans les cultures primaires corticales enrichies en neurones et de 0,63 dans les cultures enrichies en astrocytes, soit un rapport d'environ 12,6 fois. Lorsque les

cellules sont exposées à la rapamycine, l'expression de Beclin-1 est de 0,61 (en unités arbitraires) dans les cultures enrichies en neurones et de 0,81 dans les cultures enrichies en astrocytes (rapport de 1,3). Par conséquent, l'induction de l'expression de Beclin-1 suite à l'exposition des cellules à la rapamycine est plus marquée dans les cultures à prédominance neuronale ($0,61/0,05 = 12,2$) par rapport aux cultures enrichies en astrocytes ($0,81/0,63 = 1,3$). En conclusion, quel que soit le marqueur considéré (LC3 ou Beclin-1), et bien que d'activité basale plus faible dans les neurones en comparaison avec les astrocytes, la capacité relative d'induction de l'autophagie dans ces cellules y est beaucoup plus élevée.

Au moment où nous obtenions ces résultats, nous avons déduit de ces données que les niveaux d'autophagie basale dans les neurones étaient plus faibles dans les neurones en comparaison avec les cellules gliales et plus particulièrement les astrocytes. Par ailleurs, l'exposition des cultures primaires à la rapamycine permettait d'augmenter cette activité dans les neurones confirmant l'existence d'une machinerie autophagique fonctionnelle dans ces cellules. Ce qui soulève des interrogations concernant la régulation de l'autophagie basale neuronale et sur la nature des facteurs responsables de ce phénomène. On pouvait alors penser que comme l'avait proposé R. Nixon, la faible activité autophagique basale neuronale était compensée par une très haute efficacité du processus (Nixon, 2007).

Lorsqu'on replace ces observations dans le contexte des PND au cours desquelles les causes de l'agrégation de protéines anormales et de la perte neuronale sont inconnues, on peut raisonnablement penser que les propriétés intrinsèques des neurones peuvent se superposer aux facteurs génétiques et environnementaux favorisant la survenue de ces maladies, ce qui pourrait apporter une explication à la vulnérabilité neuronale en conditions de stress protéotoxiques. Les neurones sont en effet des cellules qui requièrent l'apport d'énergie en quantité suffisante pour leur permettre d'assurer leur rôle de cellules communicantes à travers l'exocytose des neurotransmetteurs et la transmission de l'influx nerveux. La synthèse d'ATP par les mitochondries est accompagnée par la formation d'ERO qui endommagent les macromolécules cellulaires (protéines, lipides, ADN). De plus, comme les neurones sont des cellules post-mitotiques, les protéines anormales résistantes à la dégradation ne peuvent être « dispersées » entre cellules filles au cours de la division. Tous ces facteurs font que les neurones sont plus susceptibles à l'agrégation protéique. Ceci pourrait être aggravé par un niveau autophagique basal faible pouvant être alors plus facilement altéré et expliquant ainsi la plus grande vulnérabilité des neurones en conditions pathologiques. L'accumulation de vésicules autophagiques dans le tissu cérébral est observée dans

un grand nombre de modèles et de patients atteints de PND. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, le compartiment autophagique est à la fois fortement induit et anormal, ce qui conduit à l'accumulation d'autophagosomes producteurs d'A β dans les neurones atteints (Nixon, 2007; Yu et al., 2005). L'accélération des processus de fusion membranaire et par conséquent de la dégradation lysosomale des autophagosomes pourrait alors inverser cet événement pathologique et favoriser la dégradation de l'A β . Il est admis que l'induction de l'autophagie constitue une stratégie de neuroprotection et plus particulièrement au cours du vieillissement où son activité est diminuée (Cuervo et Dice, 1998). En ce sens, l'induction de l'autophagie par la rapamycine permet l'élimination des agrégats (induits par la surexpression de huntingtine ou de tau) dans des modèles établis chez la drosophile (Berger et al., 2006; Ravikumar et al., 2006). Les agrégats de huntingtine peuvent également être éliminés suite à l'induction de l'autophagie par le chlorure de lithium grâce à son action inhibitrice sur l'inositol monophosphatase (Sarkar et al., 2005). En conclusion, les neurones présentent un niveau autophagique basal faible leur conférant une susceptibilité accrue envers des stress de nature protéotoxique. Cependant, les données ont été obtenues dans un modèle cellulaire *in vitro* et il est donc nécessaire de reproduire cette étude *in vivo* dans des modèles animaux.

Ces données ont conduit à la soumission d'un manuscrit au journal *Autophagy* en 2008 (cf Annexes). Le rapport des relecteurs est joint dans la partie Annexes. Il fait état d'une soumission prématurée, les résultats présentés étant préliminaires et nécessitant une caractérisation plus poussée du processus autophagique avec une analyse quantitative (quantification des vésicules positives pour LC3) et une analyse du flux autophagique. Plus précisément, le premier relecteur pointe le fait que Beclin-1 serait exprimée principalement dans les neurones et non dans les astrocytes et se réfère aux travaux de Arsov et al., et de Pickford et al., tous deux publiés en 2008 (Arsov et al., 2008; Pickford et al., 2008). Les niveaux d'expression retrouvés dans les neurones en culture seraient alors le résultat d'un artefact.

Le second relecteur nous a indiqué que selon lui, les conclusions découlant de ces résultats ne sont pas en rapport avec les niveaux différentiels d'activité autophagique entre neurones et cellules gliales. Le point important réside dans le fait qu'il est possible d'induire l'autophagie dans les neurones par la rapamycine. Ce qui, jusque là, n'avait pas été directement démontré en dépit des nombreuses études rapportant l'effet protecteur de cette substance dans divers modèles de PND. Par conséquent, il ne serait pas correct d'affirmer que l'autophagie soit plus faible dans les neurones et puisse constituer un facteur de vulnérabilité. Ce relecteur est ensuite revenu sur les méthodes de

quantification des vésicules positives pour LC3. Il nous a également demandé de quantifier l'intensité du marquage correspondant à Beclin-1 en microscopie confocale, d'améliorer la qualité de la détection de LC3 en western-blot en précisant qu'il était plus pertinent de quantifier la densité du signal pour LC3-II et de la normaliser sur celle de l'actine à la place de LC3-I dont l'expression est variable d'un type cellulaire à l'autre. De plus, LC3-II peut être reconvertie en LC3-I (suite à l'action d'Atg4) et enfin parce que la détection de LC3-II est plus sensible en comparaison avec celle de la forme libre cytosolique. Il nous est également conseillé d'utiliser la bafilomycine afin d'analyser le flux autophagique et de permettre la comparaison des niveaux d'induction de l'autophagie entre types cellulaires.

Afin de répondre à ces différents points, nous avons conduit des expériences supplémentaires présentées ci-après.

IV. ANALYSE DU FLUX AUTOPHAGIQUE DANS LES CULTURES PRIMAIRES MIXTES

1. Analyse en western-blot

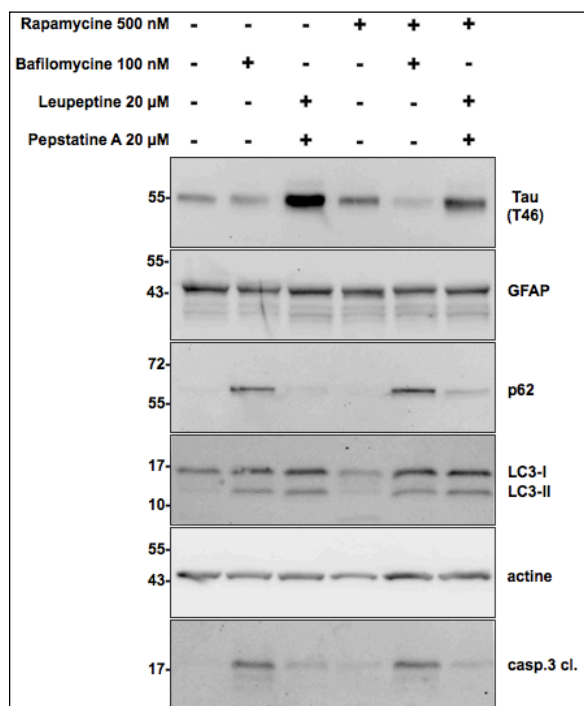


Figure 43 : Analyse en western-blot du flux autophagique dans les cultures primaires corticales enrichies en astrocytes

Afin de déterminer si la faible détection de vésicules autophagiques dans les neurones est due à une activité autophagique basale réduite ou si elle est la conséquence d'une meilleure efficacité de dégradation des vésicules autophagiques (flux plus rapide) par rapport aux cellules non neuronales, nous avons inhibé le flux autophagique par la bafilomycine (B) à une concentration de 100 nM ou par une combinaison de leupeptine et de pepstatine A (LP), toutes deux utilisées à une concentration de 20 µM. Dans cette étude, l'incubation des cellules avec les inhibiteurs de la maturation autophagique était d'une durée de 12 h.

Les variations des différents marqueurs autophagiques ont été analysées en western-blot (figures 43). L'expression de tau et de la GFAP ont été étudiées afin de confirmer la présence des types cellulaires d'intérêt. Concernant la détection de LC3, nous observons une hausse du signal correspondant à LC3-II lorsque les cellules sont en présence des inhibiteurs du flux ($1,0$ contre $1,2 \pm 0,1$ ou $1,8 \pm 1,1$ lorsqu'on compare le contrôle aux conditions bafilomycine ou leupeptine/pepstatine ; $p < 0,001$ et $p < 0,03$, respectivement). De même, le signal correspondant à p62 est globalement plus intense. Par conséquent, on peut en conclure qu'il existe une activité autophagique basale dans les cultures primaires corticales. Lorsque les cellules sont exposées à 500 nM de rapamycine (R), le rapport LC3-II/LC3-I est significativement augmenté en présence des inhibiteurs du flux ($1,9 \pm 0,6$ contre $4,3 \pm 0,8$ ou $6,0 \pm 2,1$ lorsqu'on compare la condition rapamycine aux conditions rapamycine et bafilomycine ou leupeptine/pepstatine ; $p < 0,02$ et $p < 0,01$, respectivement - statistiques non représentées sur le graphe) (figure 44).

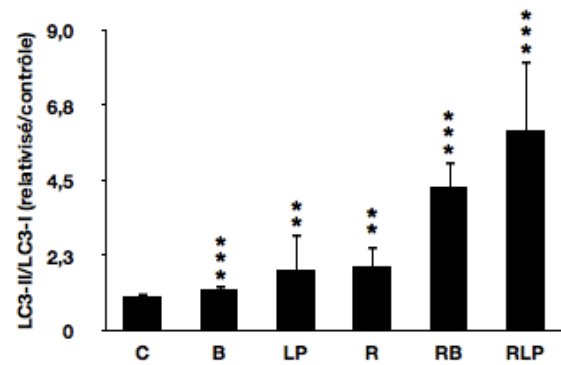


Figure 44 : Analyse semi-quantitative du rapport LC3-II/LC3-I.

Analyses statistiques : test T de Student (comparaison par rapport au contrôle), n.s : non significatif ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; $n=3$
 C : contrôle ; B : bafilomycine ; LP : leupeptine/pepstatine ; R : rapamycine

p62/SQSTM1 fonctionne en tant que récepteur autophagique et est impliquée dans l'autophagie sélective d'agrégats protéiques, ou agréphagie (Knaevelsrud et Simonsen, 2010). p62 se lie aux protéines ubiquitinylées et s'auto-oligomérisse pour former des inclusions (agrésomes) destinées à être séquestrées sélectivement au sein d'autophagosomes par le biais d'une intraction avec LC3-II à travers son domaine LIR. Ainsi, p62 elle-même est un substrat de l'autophagie (Bjørkøy et al., 2006). Les niveaux de p62 sont donc inversement corrélés aux niveaux d'activité autophagique (figure 43). Ici, en conditions basales, le signal correspondant à p62 est augmenté en conditions d'inhibition de l'acidification des vésicules du compartiment lysosomal. Ce niveau est également augmenté mais en moindre mesure en présence de la leupeptine et de la pepstatine confirmant l'efficacité des inhibiteurs du flux. Lorsque les cellules sont exposées à la rapamycine, la détection de ce signal est légèrement augmentée. La rapamycine induit donc bien l'autophagie dans ces conditions mais jouerait également sur la vitesse d'accomplissement du processus. En effet, s'il ne s'agissait que d'une simple induction, l'élévation de p62 serait plus importante.

Par ailleurs, une variation des niveaux de détection de la protéine tau est mise en évidence alors que la GFAP reste stable (figure 43). La diminution de tau en présence de la bafilomycine pourrait être due à la toxicité de cette substance reflétée par l'accroissement du clivage de la caspase-3. A l'inverse, l'immuno-détection de tau est intensifiée en présence de la pepstatine A et de la leupeptine. Cela peut signifier que tau serait dégradée dans les lysosomes mais pas forcément par autophagie car lorsque celle-ci est induite par la rapamycine (500 nM, 12 h), le niveau de tau ne varie pas par rapport au contrôle.

2. Densité autophagosomale en fonction des types cellulaires en microscopie confocale

Afin de compléter les résultats préalablement obtenus en microscopie à épifluorescence, la répartition des vésicules autophagiques après inhibition de la dégradation lysosomale a été analysée *in situ* en immunofluorescence confocale. Comme précédemment, les marquages consistaient en l'association d'un anticorps dirigé contre LC3 avec un anticorps ciblant la protéine tau (T46, marquage des cellules neuronales) ou la GFAP (astrocytes) (figures 45 à 49).

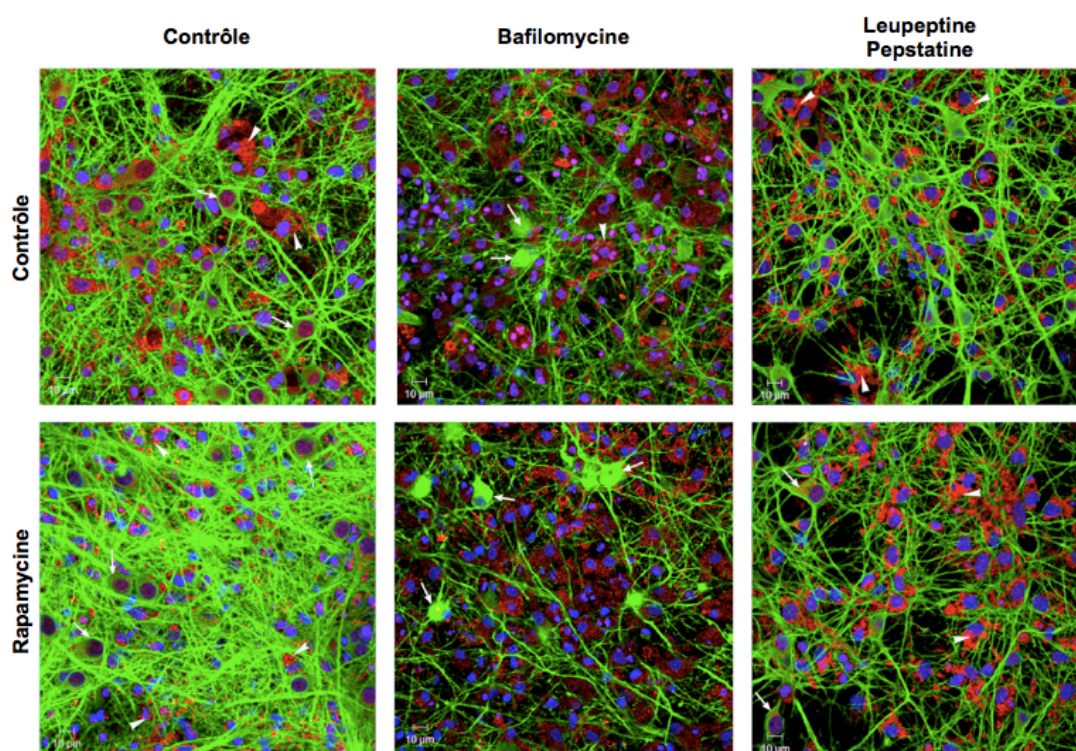
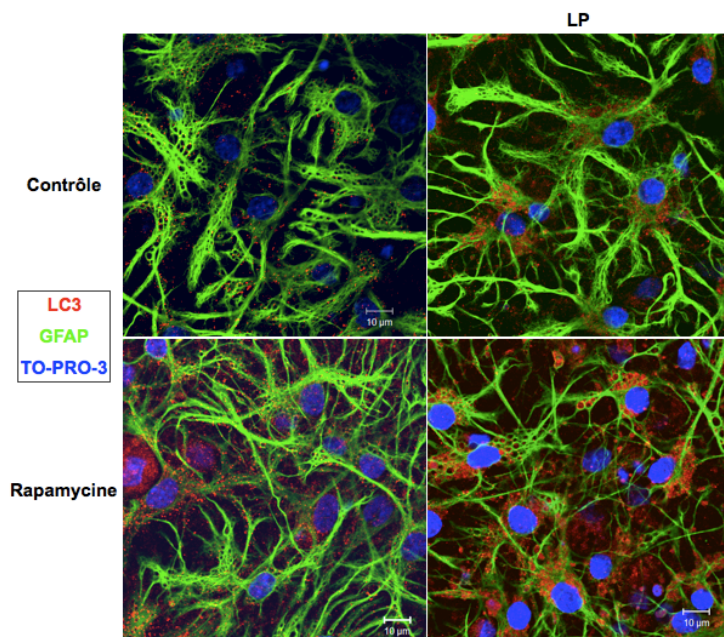


Figure 45: Détection in situ des vésicules autophagiques dans des cultures primaires corticales mixtes en microscopie confocale en conditions basales et d'induction de l'autophagie (rapamycine 500 nM) en présence ou non d'inhibiteurs du flux autophagique (bafilomycine à 100 nM ou leupeptine et pepstatine, toutes deux à 20 µM)

Les vésicules autophagiques sont détectées par le marquage de LC3 (rouge), les neurones sont marqués en vert (tau ; flèches) et les noyaux sont en bleus (TO-PRO-3), les têtes de flèche mettent en évidence des cellules négatives pour tau

Visuellement, les cellules positives pour tau présentent un marquage LC3 ponctiforme faible, restreint aux corps cellulaires et un marquage de fond (probablement LC3-I) important (figures 45 et 49). L'effet toxique de la bafilomycine est particulièrement bien visible sur ces images, caractérisé par une forte quantité de cellules présentant des noyaux condensés ou fragmentés. En effet, les cellules positives pour tau sont moins nombreuses, le marquage des prolongements est plus faible alors que l'on distingue facilement les cellules négatives pour tau (figure 45). Cette toxicité semble donc s'exercer plus particulièrement sur les neurones et ceci confirme les données observées en western-blot, c'est-à-dire que parallèlement à une augmentation du clivage de la



*Figure 46 : Détection in situ des vésicules autophagiques dans les cultures primaires corticales mixtes en conditions de blocage du flux autophagique, en présence ou non de rapamycine à 500 nM
LP : leupeptine 20 µM et pepstatine 20 µM*

inhibiteurs des cathepsines quant à eux n'agissent pas directement sur la fusion vésiculaire mais empêchent la dégradation du contenu de ces vacuoles. L'induction de l'autophagie par la rapamycine observée en western-blot est également visible en immunofluorescence confocale et affecte tous les types cellulaires en présence.

Dans ces cultures primaires mixtes, les cellules positives pour la GFAP (astrocytes) présentent un marquage correspondant à LC3 essentiellement ponctiforme et périnucléaire (figures 46 et 48). Ces cellules semblent réagir à l'application de la rapamycine et/ou de la leupeptine et de la pepstatine puisque le marquage rouge est apparemment plus intense. Les différences concernant le marquage LC3 entre neurones et astrocytes sont plus visibles sur les grossissements présentés dans

de l'expression de tau, caractéristique des neurones, mais pas de la GFAP, spécifique des astrocytes (figure 43). L'inhibition de l'autophagie par 20 µM de leupeptine et de pepstatine provoque l'accumulation de vésicules autophagiques de grande taille, ce qui n'est pas le cas de la bafilomycine. Ceci est probablement dû à leurs modes d'actions divergents. En effet, la bafilomycine a une action plus précoce en bloquant l'acidification des vésicules de la voie lysosomale et en inhibant leur fusion. Les

les figures 47 et 48. Les cultures primaires mixtes sont constituées de plusieurs couches dont la plus proche du support de culture (la plus « profonde ») contient principalement des astrocytes. Les neurones reposent sur cette dernière. Ceci explique la différence de « pureté » des plans selon qu'ils sont focalisés sur les neurones ou sur la couche astrocytaire.

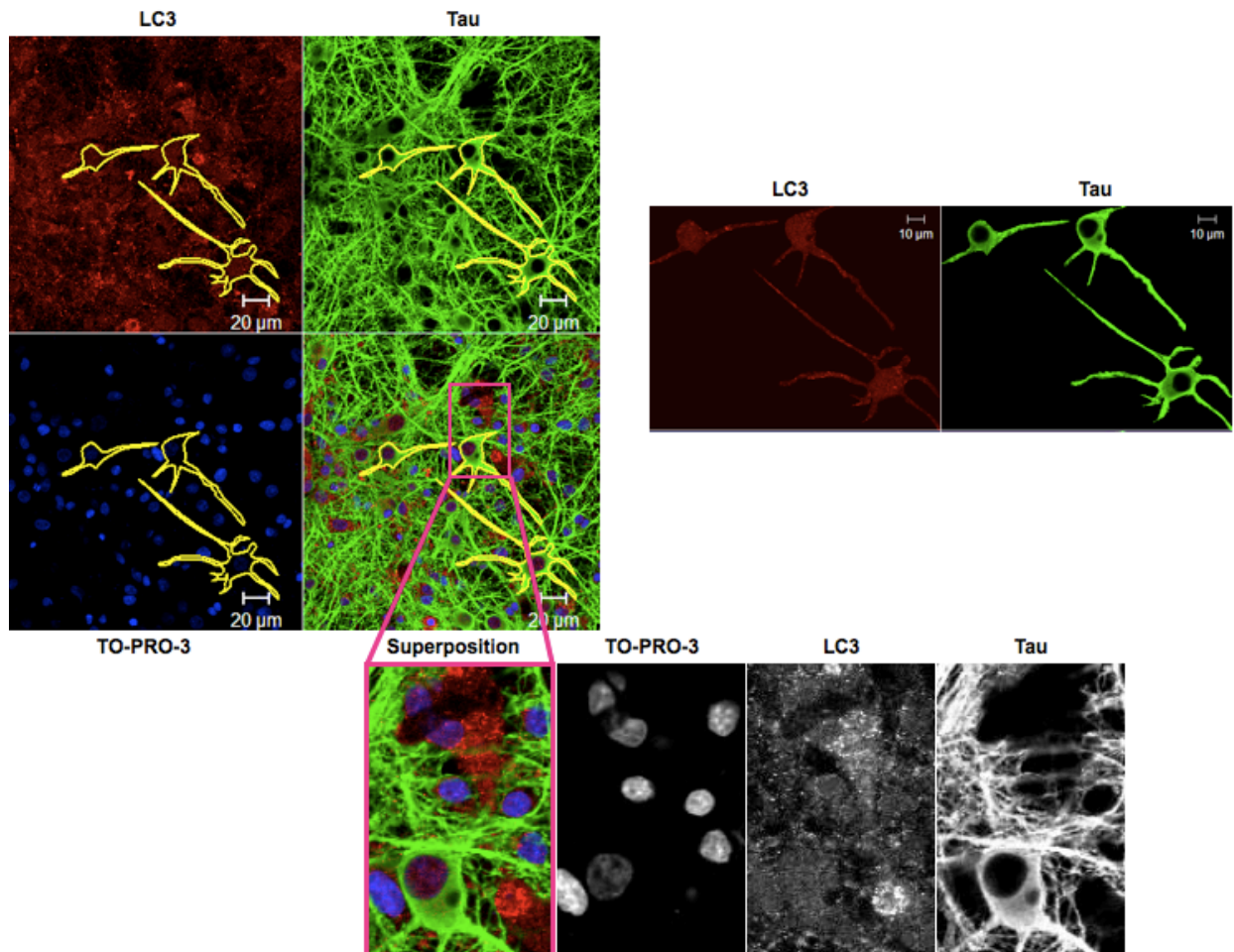


Figure 47: Détails de la condition contrôle : en haut à droite par « extraction » des neurones (entourés en jaune), en bas détail de la zone encadrée en rose

La quantification du nombre de vésicules autophagiques par cellule et en fonction de leur type (figure 49) montre que le nombre de ponctuations positives pour LC3 est significativement plus faible dans les neurones ($5,3 \pm 1,2$) par rapport aux cellules négatives pour tau ($15,4 \pm 1,6$, $p < 0,001$) (figure 49). Il est possible que le nombre de vésicules autophagiques dans les cellules non-neuronales soit sous-estimé (figure 48) du fait de la technique de comptage utilisant la sélection de zones d'intérêt (ces cellules sont uniquement repérées grâce au contre-marquage nucléaire). Lorsque la dégradation lysosomale est inhibée par la leupeptine et la pepstatine, le nombre de vésicules autophagiques est significativement augmenté dans les neurones ($5,3 \pm 1,2$ contre $8,7 \pm$

3,3 ; $p < 0,05$). Il est également augmenté dans les cellules négatives pour tau mais de manière non-significative ($15,4 \pm 1,6$ contre $17,3 \pm 6,8$; $p = 0,059$). Ces données suggèrent que le flux autophagique est plus élevé dans les neurones en comparaison avec les autres types cellulaires

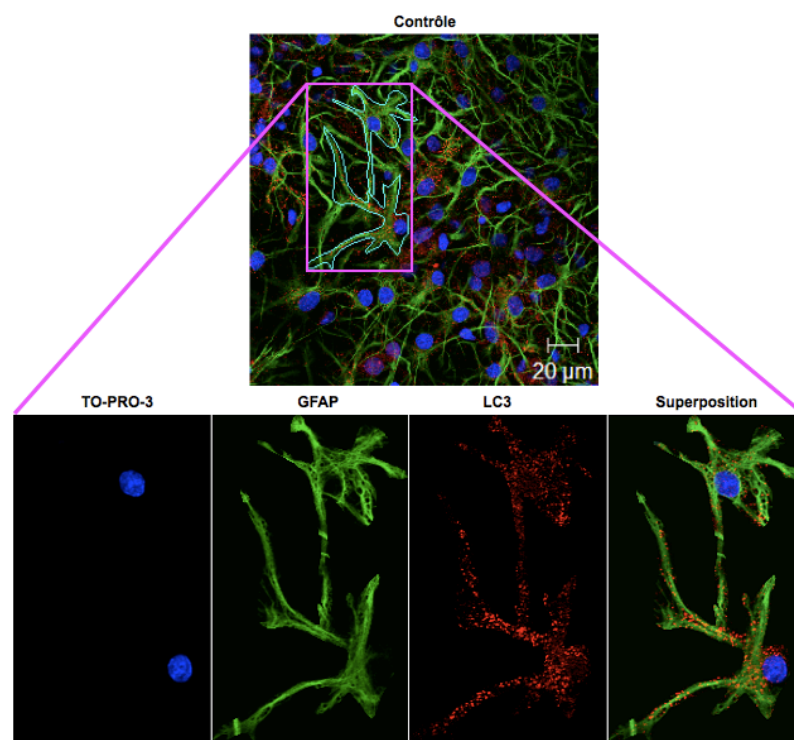


Figure 48 : Détail (en bas) du marquage des vésicules autophagiques dans des astrocytes (en haut, entourés en bleu) en conditions basales.

2008). Ces travaux montrent en effet que le processus autophagique constitutif dans les neurones est particulièrement rapide et robuste.

Le thème de l'autophagie étant nouveau pour le laboratoire, la mise au point des techniques permettant l'obtention de données plus correctes et une meilleure appréhension des méthodes d'évaluation de l'activité autophagique étaient alors nécessaires. Au cours de cette période de mise au point, nous avons rencontré des difficultés techniques qui ont considérablement ralenti l'avancée de ce projet. Par ailleurs, la publication des travaux de Boland *et al.*, portant sur l'étude de l'autophagie neuronale dans le même modèle cellulaire, à cette période, nous a poussé à nous consacrer de façon

présents dans notre modèle biologique. Il est à noter que la catégorie « cellules tau-négatives » est constituée par une population hétérogène (astrocytes, microglie), en conséquence, il serait utile de réaliser une comparaison de l'activité autophagique entre les types cellulaires négatifs pour tau afin d'affiner cette étude. L'existence d'un processus autophagique neuronal efficace est en accord avec les données de la littérature (Boland *et al.*,

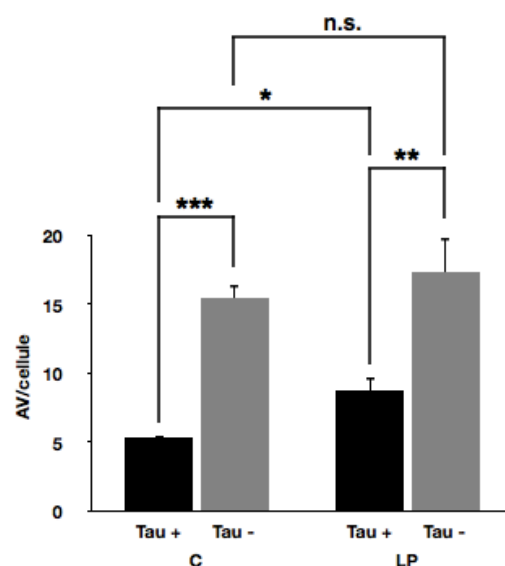


Figure 49 : Quantification du nombre d'autophagosomes par cellule en fonction de leur type (neurones, cellules non-neuronales)
 Analyses statistiques : n.s. : non significatif ; * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; $n = 3$
 C : contrôle ; LP : leupeptine/Pepstatine 20 μM ; Tau + : cellules positives pour tau ; Tau - : cellules tau-négatives.

prioritaire à des travaux menés en parallèle. Pour compléter cette étude, il est nécessaire de comparer les résultats obtenus dans les cultures corticales mixtes à des cultures enrichies en astrocytes. Des analyses quantitatives de l'expression différentielle de Beclin-1 entre neurones et cellules gliales sont indispensables pour pouvoir confirmer ce qui a été observé dans la première partie de ce travail. Cependant, les données préliminaires présentées ici ne vont pas à l'encontre des travaux cités dans le rapport de lecture du manuscrit. En effet, dans les travaux de Arsov *et al.* et de Pickford *et al.*, tous deux datant de 2008 (Arsov et al., 2008; Pickford et al., 2008), il n'est en aucun cas fait mention d'une expression plus importante de Beclin-1 dans les neurones par rapport aux cellules gliales puisque les résultats présentés concernent des expression tissulaires et le tissu cérébral est composé en majorité de cellules gliales et les modulations de l'expression de Beclin-1 observées dans les conditions pathologiques sont relatives. Ce fait est par ailleurs relevé dans un article de commentaire concernant la deuxième publication (Lee et Gao, 2008). Concernant la possibilité selon laquelle le marquage de Beclin-1 en immunofluorescence serait artefactuel : l'anticorps utilisé¹⁸ (couramment retrouvé à travers la littérature) conduit à l'obtention en western-blot, d'un signal présentant peu de bruit de fond et dont la hauteur correspond au poids moléculaire apparent de Beclin-1 (entre 55 et 60 kDa) ce qui suggère que le marquage observé est spécifique de la protéine étudiée.

L'utilisation de la rapamycine en tant qu'inducteur de l'autophagie montre qu'il existe une forte capacité d'induction autophagique dans les neurones *in vitro*. En effet, non seulement la rapamycine, induit l'autophagie mais favoriserait aussi l'achèvement du processus en accélérant les phases de maturation. Pour illustrer cette idée, si l'on compare la valeur des rapports LC3-II/LC3-I en présence des inhibiteurs lysosomaux (leupeptine et pepstatine) sur les rapports obtenus lorsque la dégradation lysosomale est efficace, nous obtenons : $1,8/1,0 = 1,8$ pour le contrôle (LP/C) contre $6,0/1,9 = 3,2$ lorsque les cellules sont exposées à la rapamycine (RLP/R). Les variations sont d'un ordre de grandeur proche lorsque l'acidification du compartiment lysosomal est inhibée par la bafilomycine : $1,2/1,0 = 1,2$ pour le contrôle (B/C) contre $4,3/1,9 = 2,26$ dans les conditions « rapamycine » (RB/R) soit une élévation de ce taux d'environ 1,5 fois. L'accélération du flux autophagique dans les neurones a été décrit récemment dans la littérature (Rubinsztein et Nixon, 2010).

Les cellules de la glie sont particulièrement importantes pour le fonctionnement des neurones. En effet, de plus en plus d'études mettent en avant des dysfonctions au niveau astrocytaire au cours

¹⁸ Cell Signalling Technology, référence #3738 (polyclonal produit chez le lapin)

de la pathogenèse des PND. Afin d'évaluer la contribution des astrocytes dans le soutien des neurones en cas de stress et leur participation à l'homéostasie neuronale, il serait intéressant de travailler sur un modèle de culture primaire différentielle issu d'embryons de souris de génotype différent (souris de génotype sauvage et souris pour lesquelles l'autophagie a été supprimée dans le SNC). Cette technique consisterait en la culture des neurones en présence d'inhibiteurs de la division cellulaire sur une couche d'astrocytes prélevés auparavant sur un animal du génotype à comparer (astrocytes provenant de souris pour lesquelles l'autophagie a été invalidée au niveau du SNC et neurones provenant d'une souris « sauvage » et inversement). Ces cultures seraient ensuite soumises à divers stress neurotoxiques et d'étudier l'impact de l'autophagie en fonction des configurations.

En outre, puisqu'il est possible d'induire l'autophagie dans les neurones, il est nécessaire de trouver des outils moléculaires capables de la stimuler (à un niveau modéré, un niveau autophagique trop élevé est délétère pour les cellules) dans la perspective de les utiliser en tant qu'agents neuroprotecteurs. Cet aspect justifie la conduite de la deuxième partie de nos travaux.

PARTIE 2 : ETUDE DE L'EFFET DE L'AMPHOTÉRICINE B SUR L'AUTOPHAGIE

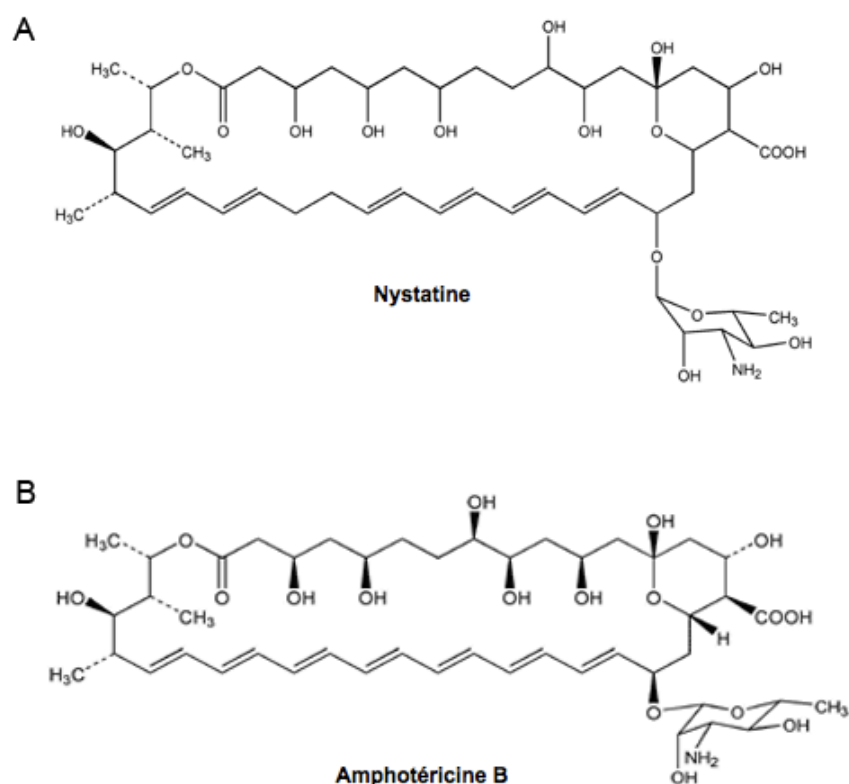


Figure 50 : Comparaison des structures chimiques de la nystatine (A) et de l'amphotéricine B (B). La différence entre ces deux molécules repose principalement sur la position des groupements hydroxyyles par rapport au cycle macrolide.

Le cholestérol est un composant essentiel des membranes cellulaires des eucaryotes supérieurs. Du fait de ses caractéristiques biochimiques uniques, le cholestérol participe aux fonctions membranaires, plus particulièrement dans la régulation de leur fluidité et dans la signalisation *trans*-membranaire (Ikonen, 2008). Bien que le cholestérol apparaît être impliqué dans le trafic vésiculaire, peu d'éléments plaident en faveur de connections existant entre le cholestérol et la voie autophagique. Cependant, dans le cas de la maladie de **Niemann-Pick de type C**, a été décrite une dysfonction de la voie autophagique/lysosomale associée à une accumulation de cholestérol. Par ailleurs, dans les animaux modèles pour cette pathologie, les niveaux protéiques des marqueurs autophagiques LC3-II et Beclin-1 sont significativement élevés (Pacheco et Lieberman, 2007).

L'autophagie peut être induite dans des fibroblastes humains en culture suite à une déplétion cellulaire en cholestérol induite par des substances pharmacologiques telles que la nystatine (Cheng et al., 2006) (figure 50, A). L'amphotéricine B (AmB), ou Fungizone® (Dutcher et al., 1956), est une substance de structure moléculaire très proche de celle de la nystatine (figure 51, B) (Hapala et al., 2005). Ces molécules appartiennent au groupe des polyènes macrolides et ont des propriétés antifongiques bien caractérisées. Ces deux substances forment des complexes stables avec les stérols des membranes biologiques et présentent une meilleure affinité pour l'ergostérol (forme majoritaire des espèces fongiques), contrepartie du cholestérol des membranes des métazoaires (Czub et Baginski, 2006). Ces complexes sont à l'origine de la formation de pores aqueux au travers de la membrane plasmique, responsables d'une fuite d'ions monovalents (en particulier du potassium intracellulaire) conférant ainsi leurs activités antifongiques à la nystatine et à l'AmB (Brajtburg et al., 1990). L'AmB est utilisée en thérapeutique humaine et animale en tant qu'agent antifongique à large spectre et ses effets secondaires sont bien identifiés. L'AmB est aussi couramment utilisée en culture cellulaire pour éviter les contaminations dues à des moisissures et aux levures.

Compte-tenu des propriétés neuroprotectrices de l'autophagie, et de la capacité de la nystatine à induire l'autophagie dans les fibroblastes humains, nous avons dans un premier temps étudié les effets globaux de l'AmB sur les marqueurs de l'autophagie dans les cellules COS-7. L'autophagie étant considérée comme étant un mécanisme neuroprotecteur, nous avons ensuite transposé cette étude aux cultures corticales primaires. En effet, considérant que cette molécule est relativement bien caractérisée et si elle s'avère induire l'autophagie dans nos modèles, alors elle pourrait constituer un outil permettant l'établissement de stratégies de neuroprotection.

I. EFFETS DE L'AMB SUR L'AUTOPHAGIE DANS LES CELLULES DE LA LIGNÉE COS-7

A. Analyse de la toxicité de l'AmB

1. Effet de l'AmB sur la viabilité cellulaire

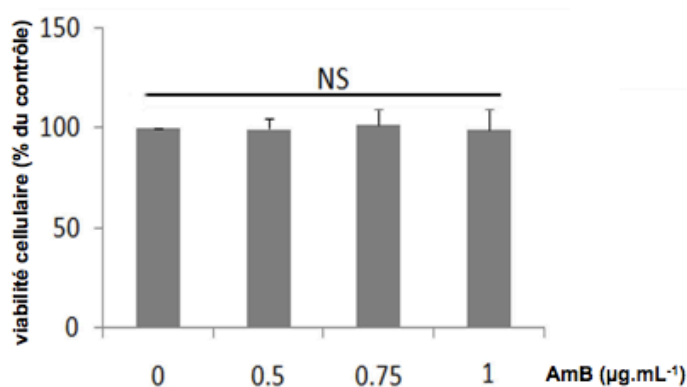


Figure 51 : Effet de l'AmB sur la viabilité cellulaire (test MTT) dans la lignée cellulaire COS-7.

Analyses statistiques : n.s : non significatif.

Nous avons examiné la possibilité que l'AmB puisse affecter la viabilité cellulaire et induire la mort cellulaire. Dans un premier temps, les cellules ont été exposées à des doses croissantes d'AmB (de 0,5 à 1 µg/mL) pendant 12 heures et la viabilité cellulaire a été estimée en réalisant un test MTT reflétant l'activité de la succinate deshydrogénase (figure 51).

Ce dernier est couramment utilisé en tant que test d'estimation de la viabilité cellulaire. Quelle que soit la concentration d'AmB considérée, aucune variation significative de l'activité de la succinate deshydrogénase n'est observée indiquant que l'AmB n'affecte pas la viabilité cellulaire.

2. Clivage de la caspase-3

Afin de confirmer ces observations, une analyse en western-blot du clivage de la caspase-3 a été réalisée (figure 52). Des extraits protéiques issus de cellules traitées par une dose toxique de bréfeldine A (BFA ; 0,25 µg/mL) ont été utilisés en tant que contrôle positif. Aucun

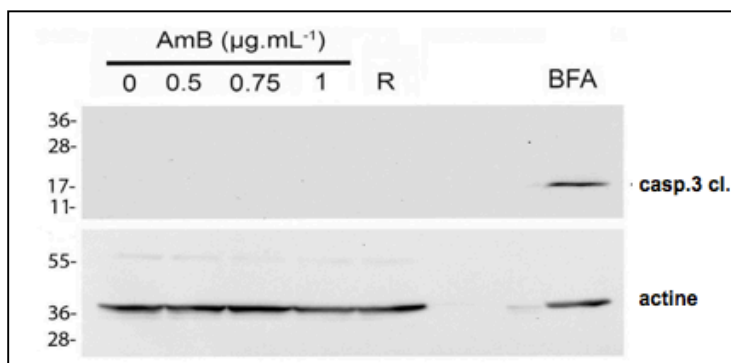


Figure 52 : Etude de l'effet de doses croissantes d'AmB sur le clivage de la caspase-3 en western-blot

clivage de la caspase-3 n'est détecté dans nos conditions de traitement, impliquant que l'AmB ne cause pas l'induction de l'apoptose aux doses considérées pour les cellules de la lignée COS-7 .

B. Variations des marqueurs autophagiques causées par l'AmB

1. Détection des autophagosomes *in situ*

a. Par immunofluorescence

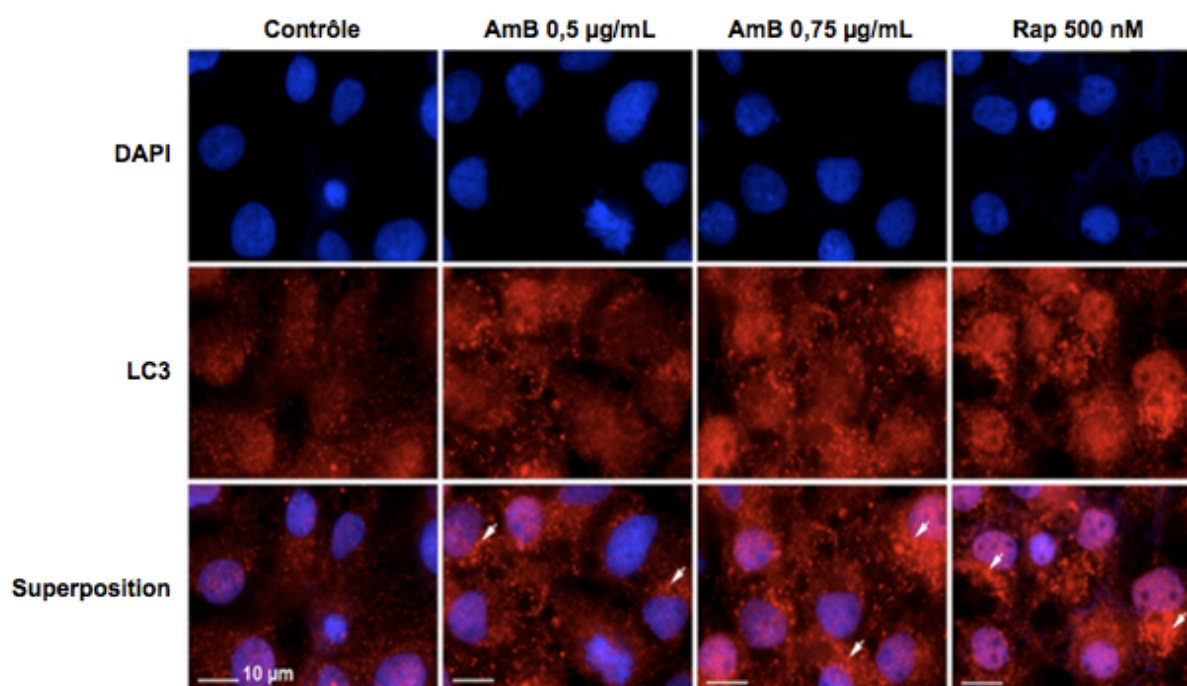


Figure 53 : Effets de l'AmB sur les autophagosomes dans les cellules de la lignée cellulaire COS-7 en immunofluorescence

Afin de déterminer si l'AmB provoque une variation de la densité des vésicules autophagiques, une immunofluorescence utilisant un anticorps dirigé contre LC3 a été réalisée (figure 53). L'exposition des cellules COS-7 à la rapamycine 500 nM pendant 12 heures a été utilisée en tant que contrôle positif de l'induction de l'activité autophagique (figure 53, dernière colonne).

On peut noter que l'exposition des cellules à l'AmB ne provoque pas de changement de la morphologie nucléaire en comparaison avec le contrôle, ce qui est en accord avec une absence de toxicité de cette substance dans nos conditions d'expérimentation.

Dans les cellules contrôle, un marquage ponctiforme est détecté à un faible niveau par rapport aux cellules exposées à 0,5 et 0,75 $\mu\text{g/mL}$ d'AmB ou à la rapamycine. Dans ces trois conditions

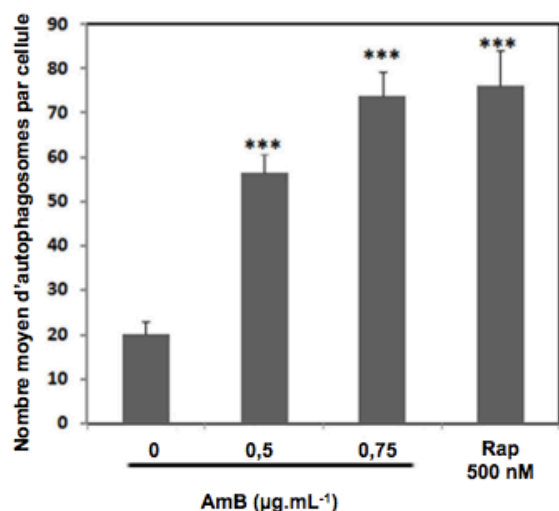


Figure 54 : Influence de l'exposition des COS-7 à l'AmB sur le nombre cellulaire moyen de vésicules autophagiques

Analyse statistique : test T de Student. *** : $p < 0,001$

nous assistons à une augmentation de ce type de marquage suggérant que l'AmB affecte la densité autophagosomale dans le même sens que la rapamycine.

L'analyse quantitative du nombre de ponctuations par cellule montre une élévation significative et dépendante de la dose de la présence de vésicules autophagiques dans les cellules traitées à l'AmB (figure 54). Dans les cellules contrôle, le nombre d'autophagosomes par cellule est en moyenne de 20 ± 3 et passe à 56 ± 4 ($p=0,0024$, $n=4$), 73 ± 5 ($p=0,0004$) et 76 ± 7 ($p=0,0025$) dans les cellules exposées, respectivement, à l'AmB à 0,5 ou 0,75 $\mu\text{g/mL}$ et à la rapamycine 500 nM. L'AmB affecte donc le déroulement du processus autophagique, des analyses du flux sont nécessaires pour déterminer la nature de cet effet.

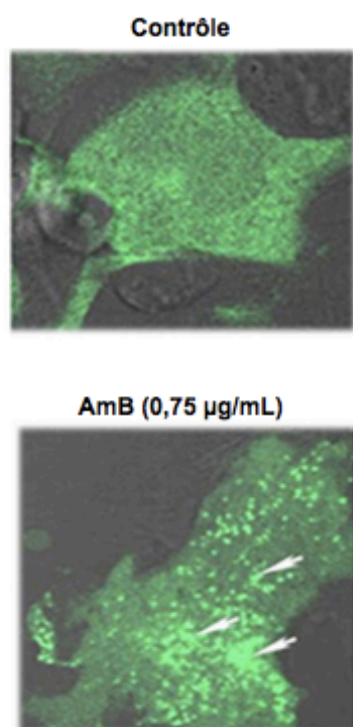


Figure 55 : Cellules COS-7 exprimant eGFP-LC3 après 12 heures d'exposition à 0,75 $\mu\text{g/mL}$ d'AmB observées en microscopie confocale

b. Dans des COS-7 eGFP-LC3

La redistribution de LC3 a été suivie au cours du temps en microscopie confocale dans des cellules COS-7 exprimant la protéine LC3 fusionnée à une protéine fluorescente : eGFP-LC3 (*enhanced Green Fluorescent Protein*) (figure 55). Les cellules COS-7 eGFP-LC3 non-traitées présentent une distribution diffuse homogène de la protéine de fusion alors que des structures ponctiformes correspondant à des vésicules autophagiques apparaissent dans le cytoplasme des cellules exposées à l'AmB 0,75 $\mu\text{g/mL}$.

c. En microscopie électronique

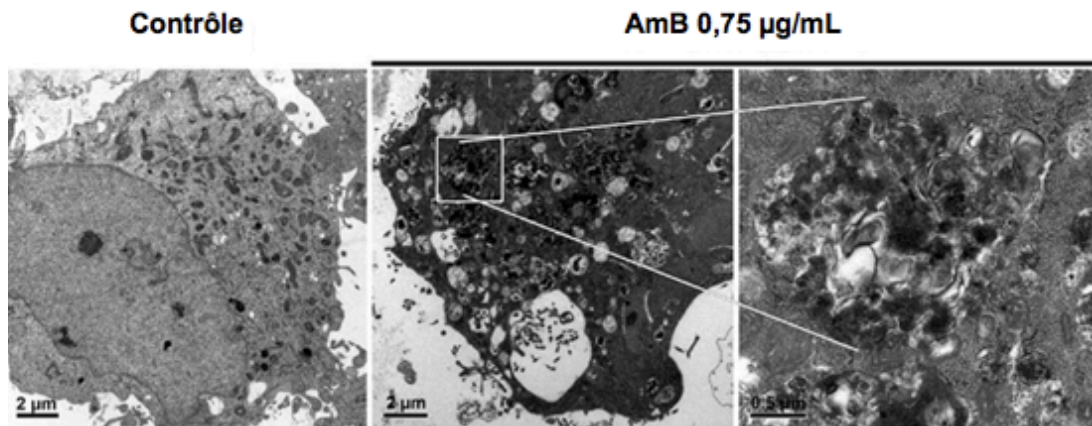


Figure 56 : Aspect des cellules exposées à l'AmB en microscopie électronique à transmission.

En microscopie électronique en transmission (figure 56), les cellules COS-7 exposées à 0,75 µg/mL d'AmB présentent des vacuoles cytoplasmiques avec un contenu polymorphe dense pouvant correspondre à des autophagosomes.

d. En microscopie à contraste de phase...

Suite au traitement à l'AmB, des changements visibles en microscopie de phase peuvent être observés. De larges vacuoles luminescentes apparaissent dans le cytoplasme des cellules (figure 57).

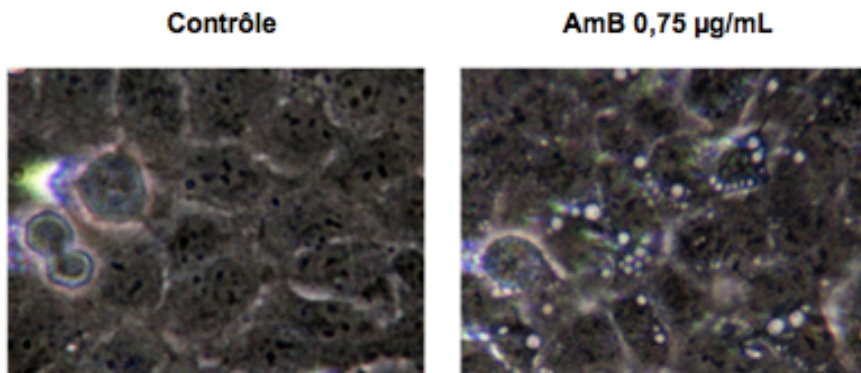


Figure 57 : Photographies des cellules COS-7 exposées à 0,75 µg/mL d'AmB prises au microscope à contraste de phase

observés. De larges vacuoles luminescentes apparaissent dans le cytoplasme des cellules (figure 57). Ces vacuoles disparaissent lorsque le traitement à l'AmB est arrêté par remplacement du milieu de culture indiquant que l'effet de

l'AmB sur la formation de ces structures est réversible. Ces vésicules, apparemment vides, ne sont pas retrouvées en immunofluorescence suggérant qu'elles ne correspondent pas à des autophagosomes.

2. Visualisation de Beclin-1 en immunofluorescence

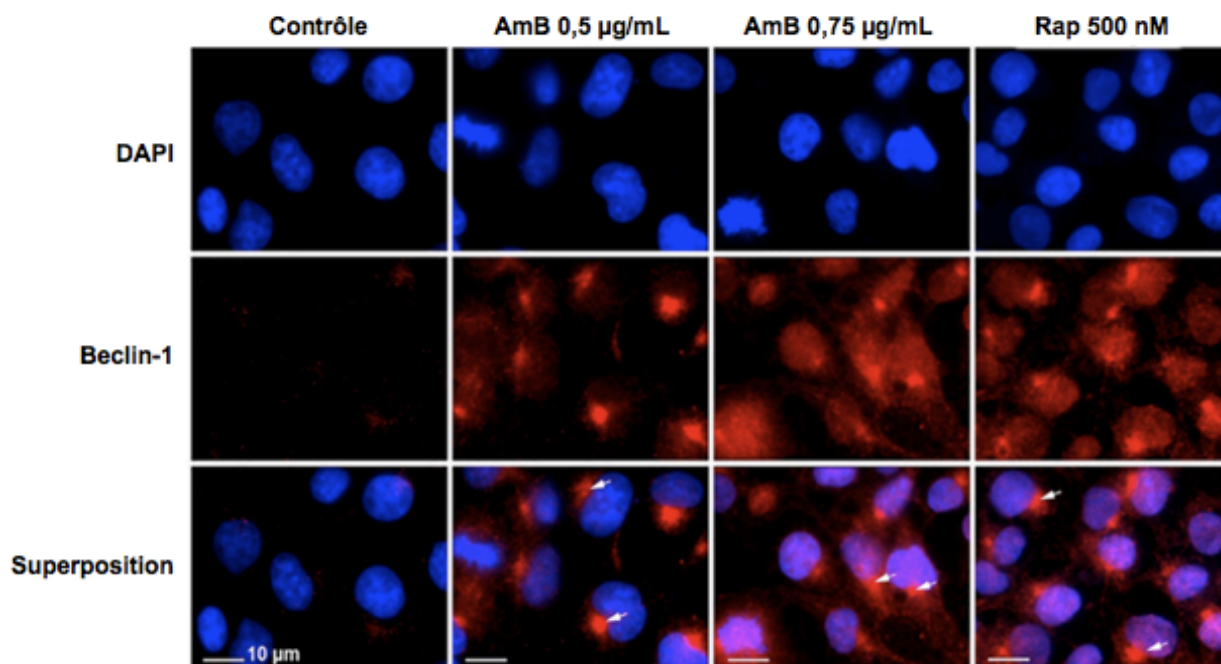


Figure 58 : Expression de Beclin-1 dans les COS-7 suite à leur exposition à l'AmB à 0,5 ou 0,75 µg/mL en immunofluorescence

Le marquage de Beclin-1 montre une induction de l'expression de cette protéine suite à l'exposition des cellules à l'AmB à 0,5 et 0,75 µg/mL (figure 58 deuxième et troisième colonnes) ou à la rapamycine (figure 58, quatrième colonne) par rapport à la condition contrôle (figure 58, première colonne) où la protéine est à peine détectable. Ce marquage est polarisé et correspond à une localisation en partie *trans*-golgienne de cette protéine. L'induction de l'expression de Beclin-1 doit être confirmée par western-blotting.

C. Analyse des marqueurs autophagiques en western-blot

L'analyse de la conversion de LC3-I en LC3-II en western-blot (figure 59, partie de gauche) montre un accroissement du signal correspondant à LC3-II. L'analyse semi-quantitative du signal montre une augmentation significative dépendante de la dose du rapport LC3-II sur l'actine qui peut être également utilisé pour représenter l'activité autophagique (figure 59, partie de droite). En effet, ce rapport est d'environ $0,134 \pm 0,09$ (unités arbitraires) dans les contrôles contre $0,780 \pm 0,15$ ($p=0,0004$, $n=4$), $1,11 \pm 0,25$ ($p<0,0001$) pour les cultures exposées à 0,5 et 0,75 µg/mL d'AmB, respectivement.

L'étude des niveaux de Beclin-1 confirme de façon nette que l'exposition des cellules de la lignée COS-7 à l'AmB cause une hausse de l'expression de cette protéine (figure 59, partie de gauche). La représentation des valeurs correspondant à l'estimation de l'immunoréactivité pour Beclin-1 normalisée sur celle de l'actine montre une intensification significative de l'expression de Beclin-1 d'environ 1,3 et 2 fois par rapport au contrôle ($1,29 \pm 0,09$; unités arbitraires) lorsque les cellules sont traitées avec 0,5 $\mu\text{g/mL}$ ($1,64 \pm 0,15$; $p=0,0004$, $n=4$) ou 0,75 $\mu\text{g/mL}$ d'AmB ($2,65 \pm 0,25$; $p>0,0001$), respectivement (figure 59, partie de droite).

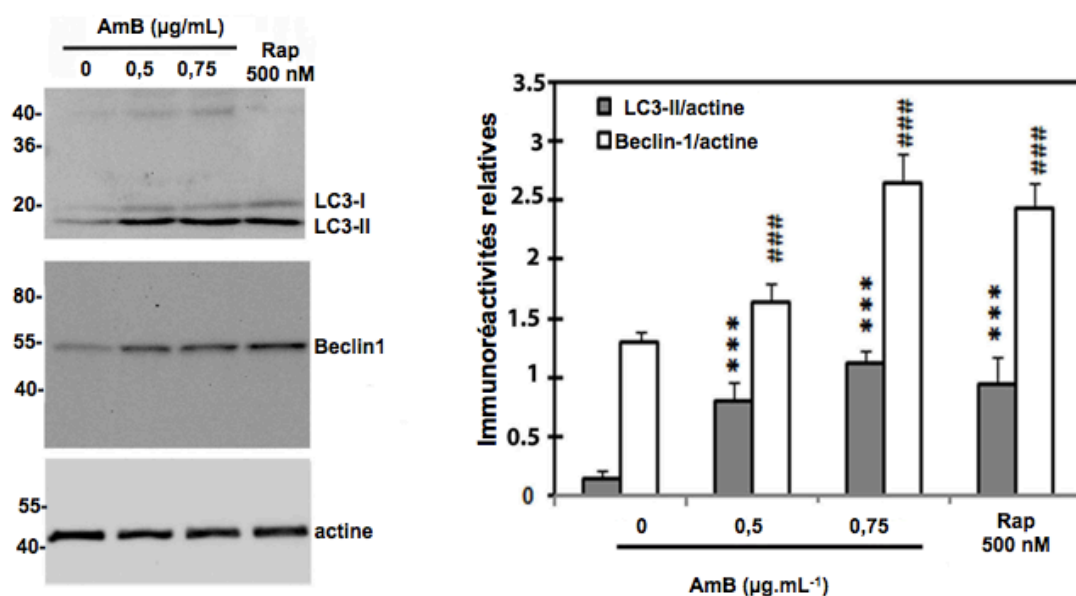


Figure 59 : Analyse de l'effet de l'AmB à 0,5 ou 0,75 $\mu\text{g/mL}$ sur les marqueurs autophagiques en western-blot.

LC3 : Rapport des densité des signaux correspondant à LC3-II/actine ; Beclin-1 : Densité du signal correspondant normalisée sur celui de l'actine.

Analyses statistiques : n.s : non significatif ; */# : $p<0,05$; **/## : $p<0,01$; ***/### : $p<0,001$; $n=4$.

* : comparaison au contrôle du rapport LC3-II/LC3-I ; # : comparaison au contrôle des valeurs obtenues pour Beclin-1

Cette partie, conduite en parallèle avec la partie précédente, plaide en faveur d'une action inductrice de l'autophagie par l'AmB (induction de l'expression de Beclin-1 et augmentation de la présence d'autophagosomes).

Ces résultats ont été rassemblés sous la forme d'un manuscrit soumis au journal *Autophagy* (Annexe). Cependant, à ce stade, nous ne pouvions affirmer qu'il s'agissait d'une induction nette de l'autophagie ou si cette molécule avait un effet négatif sur les étapes de maturation. C'est ce qui a été mis en avant dans le rapport des relecteurs (annexe). Dans ce rapport, le premier relecteur nous demande d'étudier les effets de cette substance dans d'autres modèles cellulaires et de réaliser une analyse du flux autophagique. Par ailleurs, les résultats obtenus en microscopie électronique ne convainquent pas. Le second relecteur confirme la nécessité d'étudier l'effet de l'AmB en présence

d'inhibiteurs lysosomaux et de prendre en compte l'expression de p62 et demande si les effets de l'AmB sur l'autophagie sont imputables à son activité fongicide.

A ce stade de l'étude et au regard du mode d'action de l'AmB sur les cellules plusieurs hypothèses peuvent être émises concernant les modalités d'induction de l'autophagie. L'AmB forme des complexes avec le cholestérol membranaire à l'origine de la formation de pores de diamètre compris entre 7 et 10 Å responsables de la fuite d'ions et de métabolites (Lemke et al., 2005; Baginski et al., 1997). Ceci provoque une induction compensatoire de l'activité des pompes Na^+/K^+ ATPases et l'accélération de la respiration mitochondriale dans le but de maintenir de limiter la fuite ionique et de maintenir les niveaux d'ATP cellulaires (Raatikainen et al., 1991), cependant la substance en elle-même peut avoir un effet inhibiteur sur cette enzyme (Vertut-Doi et al., 1988). Cet accroissement du métabolisme cellulaire devrait conduire à une activation de l'AMPK. Ensuite, comme c'est le cas de la nystatine dans le cadre de l'étude menée en 2005 (Cheng et al., 2006), l'induction de l'autophagie par l'AmB pourrait être liée à la séquestration du cholestérol par l'AmB dans le cadre de la formation des pores aqueux membranaires. La formation des canaux provoque en outre une augmentation de la concentration de calcium libre cytosolique (Cohen et al., 1990; Rogers et al., 1999), or une augmentation du calcium cytosolique est un signal inducteur d'activation de l'autophagie (Høyer-Hansen et al., 2007; Grotemeier et al., 2010).

Dans la seconde partie de ces résultats, nous avons étudié l'effet de l'AmB sur l'autophagie dans les cultures primaires corticales enrichies en neurones et testé plusieurs des hypothèses présentées ci-dessus.

II. EFFETS DE L'AMB DANS LES CULTURES PRIMAIRES NEURONALES

Les niveaux d'autophagie basale et la capacité d'induction de l'autophagie pouvant varier d'un type cellulaire à l'autre, nous avons cherché à savoir si cette hausse des marqueurs reflétant l'activité autophagique observée dans les cellules COS-7 suite à l'ajout d'AmB au milieu de culture pouvait être reproduite dans des cultures corticales primaires. Une exposition à l'AmB a été également faite en conditions d'inhibition du flux autophagique par la bafilomycine à 50 nM pendant 12 heures (compte-tenu de la toxicité de cette substance observée dans la première partie des résultats).

A. Cultures primaires corticales d'embryons de rat

1. Gamme de concentrations

Une gamme de concentrations croissantes (allant de 0,5 à 10 $\mu\text{g/mL}$) d'AmB a été testée sur 12 heures dans les cultures corticales primaires enrichies en neurones afin de vérifier si cette substance peut avoir un effet sur l'autophagie dans ce modèle. Les différentes protéines marqueurs ont été visualisées par western-blot (figure 60).

Le premier paramètre analysé est la détection de LC3. Suite à l'exposition des cellules à des doses croissantes d'AmB, on assiste à une légère augmentation des niveaux de LC3-II tandis que LC3-I reste plutôt stable (figure 61). Ceci se traduit par une élévation du rapport LC3-II/LC3-I avec les concentrations d'AmB pour atteindre un maximum correspondant au traitement des cellules par 1 $\mu\text{g/mL}$ d'AmB. Ce rapport est moins important pour les concentrations suivantes pour devenir identique au contrôle à la concentration de 10 $\mu\text{g/mL}$.

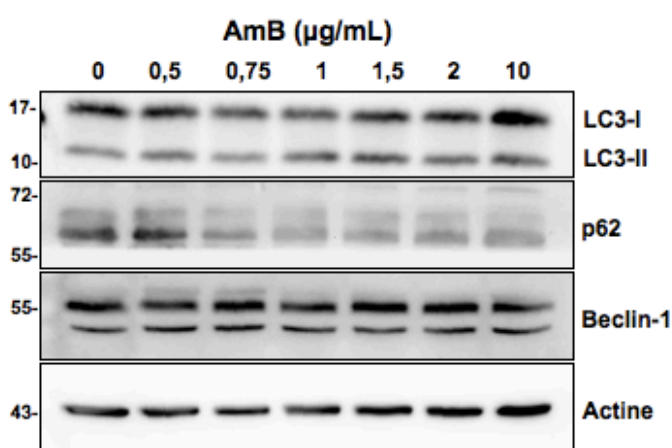


Figure 60 : Effets de concentrations croissantes d'AmB (de 0,5 à 10 $\mu\text{g/mL}$) sur les marqueurs autophagiques dans des cultures primaires corticales mixtes

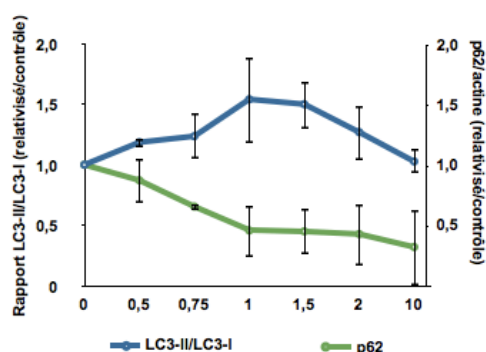


Figure 61 : Analyse semi-quantitative du signal correspondant à p62 (à droite, en vert) et établissement du rapport de LC3-II/LC3-I (à gauche, en bleu) suite à l'exposition des cellules à une gamme de doses croissantes d'AmB (de 0,5 à 10 $\mu\text{g/mL}$).

Le signal correspondant à p62 diminue quant à lui jusqu'à la concentration de 1 $\mu\text{g/mL}$ d'AmB et ne varie plus pour les concentrations supérieures (figures 60 et 61). L'expression de Beclin-1 n'est pas affectée par l'exposition des cellules à l'AmB.

Par conséquent, la concentration de 1 $\mu\text{g/mL}$ est la concentration optimale d'AmB pour l'étude d'un effet de cette substance sur l'autophagie dans ce modèle cellulaire.

2. Analyse des marqueurs autophagiques en western-blot

Les cellules ont été exposées à 1 µg/mL d'AmB pendant 12 heures en conditions nutritionnelles normales ou en absence de facteurs trophiques (MEM) associée ou non à la bafilomycine à une concentration de 50 nM (figure 62).

Les résultats obtenus montrent que, d'une part, la bafilomycine a été efficace dans l'inhibition du flux autophagique au vu de l'augmentation conjointe des niveaux de p62 et de LC3-II et que d'autre part, la privation nutritionnelle n'a pas eu l'effet inducteur escompté à moins qu'il y ait eu une accélération des phases de maturation (figures 62 et 63).

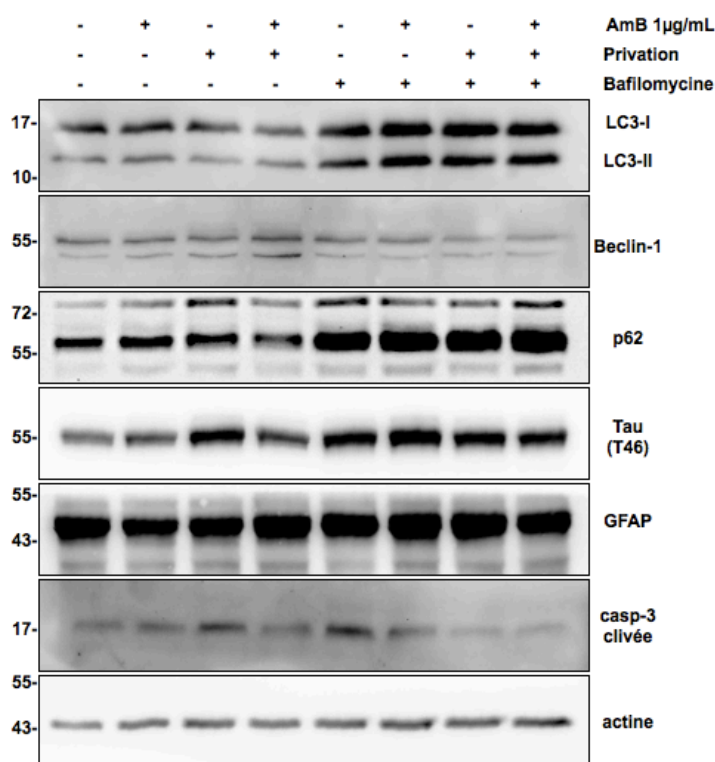


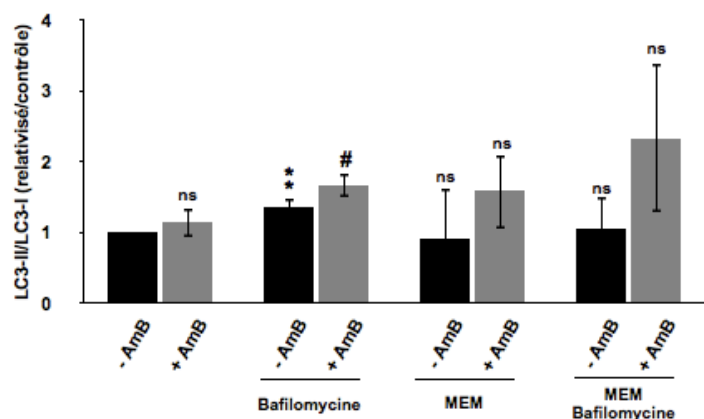
Figure 62 : Effets de l'exposition des cellules à 1 µg/mL d'AmB sur les marqueurs autophagiques dans les cultures primaires corticales mixtes en condition de privation nutritionnelle et/ou d'inhibition de l'acidification des lysosomes (bafilomycine)

à la bafilomycine ($2,3 \pm 2,0$ vs. $2,0 \pm 1,6$; $p=0,414$).

L'analyse semi-quantitative du rapport LC3-II/LC3-I (figure 63) confirme d'une part l'efficacité de l'utilisation de la bafilomycine sur l'inhibition de la maturation autophagosomale puisque le rapport LC3-II/LC3-I est augmenté de manière significative lorsque l'on compare les valeurs obtenues basalement à celles résultant de l'exposition des cellules à la bafilomycine (1,0 contre

Les conditions de traitement ne semblent pas présenter de toxicité apparente puisque le clivage de la caspase-3 ne varie pas de façon importante mais est visible dans les conditions MEM et bafilomycine seule (figure 62). Dans ces conditions, l'adjonction de l'AmB à ces toxines semble diminuer le clivage de la caspase-3. L'AmB aurait donc un effet protecteur dans ces conditions. La diminution de ce clivage est en effet significatif en cas de privation nutritionnelle (M vs. M/AmB : $1,3 \pm 0,8$ vs. $0,8 \pm 0,1$ en unités arbitraires ; $p<0,05$; $n=3$) mais pas dans lorsque les cellules sont soumises

1,3 ± 0,1, $p < 0,01$, $n=3$). D'autre part ces résultats montrent une augmentation significative de ce rapport lorsque l'AmB est couplée à la bafilomycine en comparaison avec l'utilisation de cette substance seule (AmB : 1,1 ± 0,2 contre 1,7 ± 0,2 pour l'AmB associée à la bafilomycine, $p < 0,05$,



*Figure 63 : Variations du rapport LC3-II/LC3-I dans les cultures primaires en fonction de leur exposition ou non à l'AmB et/ou en conditions de privation nutritionnelle et de Bafilomycine A à 50 nM. Analyses statistiques : test T de Student ; n.s : non significatif ; */# : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$. * : comparaison au contrôle ; # : comparaison avec la condition bafilomycine seule*

$n=3$). L'AmB induit l'autophagie dans les cultures corticales primaires.

Quand cette expérience est répétée en conditions de privation nutritionnelle, un accroissement du rapport LC3-II/LC3-I est induit suite à l'ajout d'AmB, mais celui-ci n'est pas significatif (MEM vs. MEM+AmB, $p=0,0815$ et MEM/BAF vs. MEM/BAF + AmB, $p=0,0558$). Il est nécessaire de noter que les cultures primaires corticales sont

particulièrement sensibles aux changements de milieu ce qui pourrait expliquer la variabilité reflétée par la taille importante des écarts-types et pouvant ainsi expliquer la non-significativité statistique de ces résultats. L'exposition des cellules à l'AmB accentue la diminution de p62 en conditions de privation (MEM), ce qui écarte la possibilité d'une action de l'AmB sur le flux.

L'ensemble de ces données montre que l'AmB a une action inductrice modérée de l'autophagie dans les cultures corticales primaires.

3. Vésicules autophagiques *in situ*

Afin de confirmer les informations précédentes, des immunofluorescences ont été réalisées à l'aide d'un anticorps dirigé contre LC3 ; les noyaux ont été marqués au DAPI (figures 64 et 65).

Dans les conditions contrôle, il existe un niveau autophagique basal révélé par la présence de ponctuations LC3 (figure 64, panel du haut) et révélé par l'inhibition de la dégradation lysosomale des vésicules autophagiques (bafilomycine, figure 64, panel du bas). L'addition de 1 µg/mL d'AmB

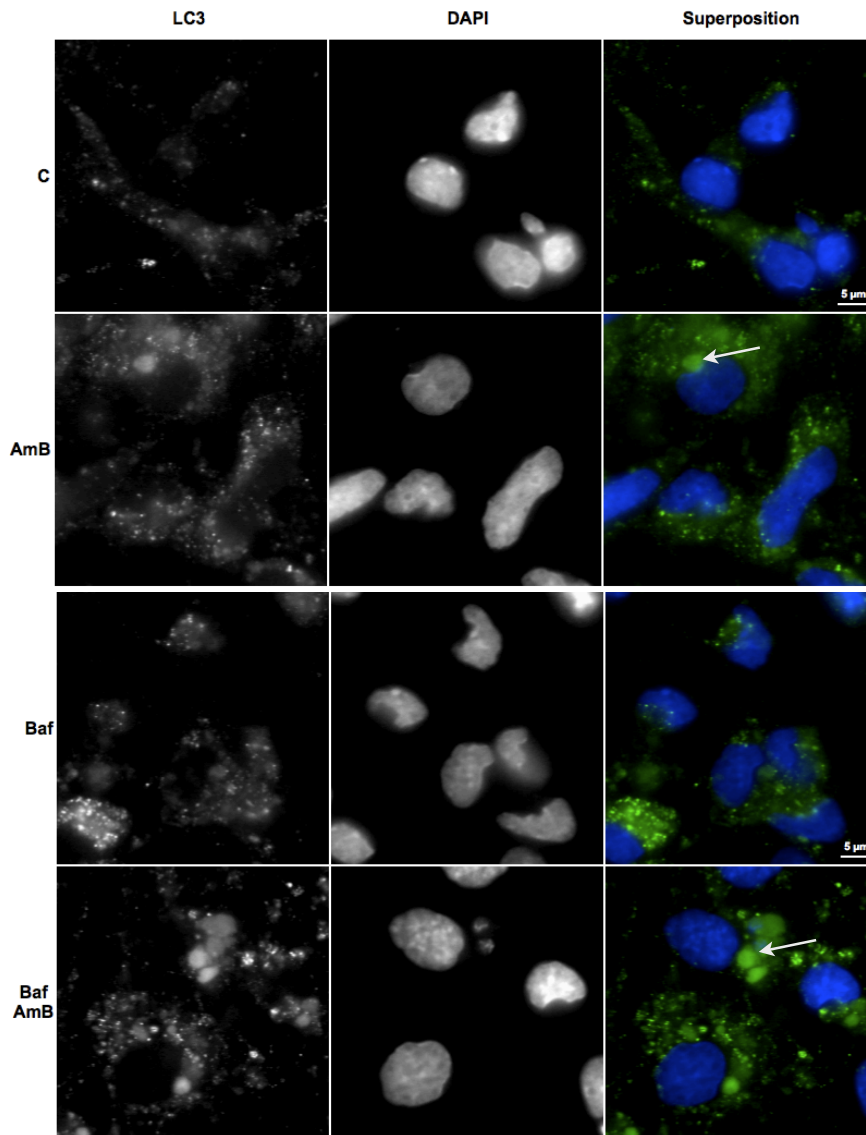
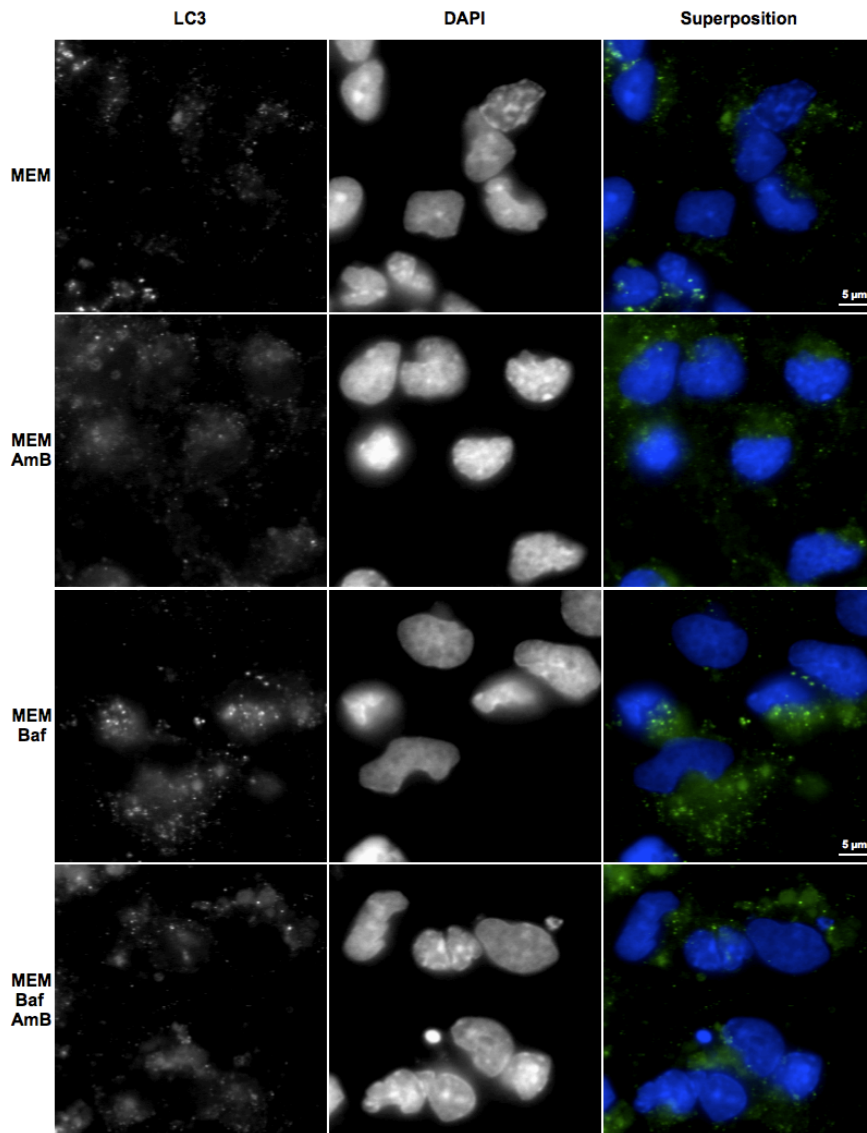


Figure 64 : Détection des vésicules positives pour LC3 dans les cultures corticales primaires en présence ou non d'AMB et/ou de bafilomycine à 50 nM.

Barre d'échelle : 5 μm. Flèches : structures positives pour LC3 nature inconnue

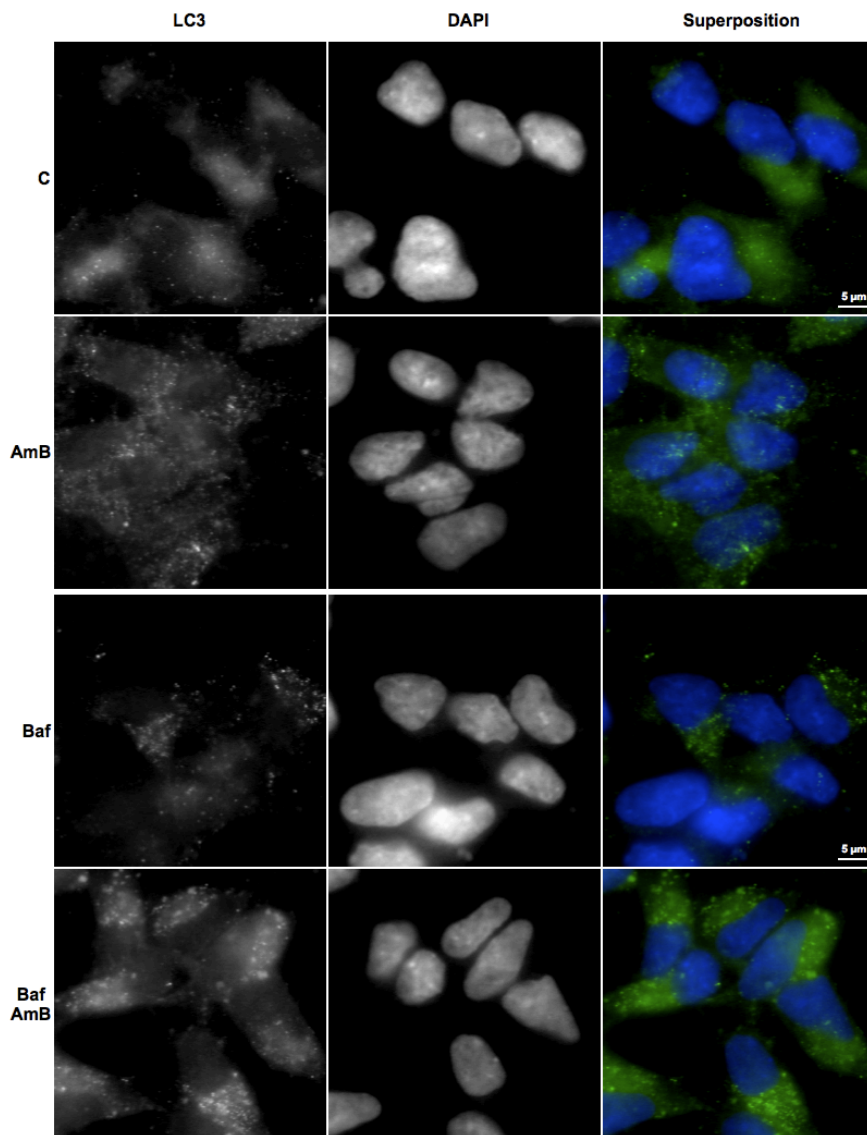
au milieu de culture semble globalement amplifier le marquage correspondant à LC3 (marquage de fond et ponctuations). Cependant, lorsque l'on regarde en détail les structures ponctiformes, certaines présentent un diamètre important (flèches) comparé aux ponctuations habituellement observées. Ce type de figure n'est retrouvé que dans les cultures corticales primaires, qu'elles soient en conditions basales (figure 64 panel du haut) ou lorsque le flux autophagique est inhibé par la bafilomycine (figure 64, panel du bas).

En conditions de privation nutritionnelle (MEM, figure 65) les données obtenues en western-blot sont confirmées, c'est-à-dire que le nombre de vésicules autophagiques n'apparaît pas être substantiellement augmenté par rapport aux conditions basales (coïncidant avec l'évolution du rapport LC3-II/LC3-I), néanmoins quand le flux autophagique est inhibé, le nombre de ponctuations positives pour LC3 est augmenté.(figure 65, panel du bas). Les larges structures arrondies positives pour LC3 sont également retrouvées suite à l'exposition des cellules à l'AmB dans les cellules privées de nutriments.



*Figure 65 : Détection des vésicules positives pour LC3 dans les cultures corticales primaires en présence ou non d'AmB et/ou de bafilomycine à 50 nM en conditions de privation nutritionnelle (MEM)
Barre d'échelle : 5 μ m.*

Nous avons alors choisi les cellules de la lignée SH-SY5Y qui possèdent certains caractères communs avec les cellules neuronales primaires et en partagent d'autre avec les COS-7 (cellules immortalisées). Ces cellules ont été traitées de manière identique aux cultures primaires, excepté le milieu de privation. Nous avons en effet remplacé le milieu de culture par de l'EBSS (au lieu du MEM ; cf Matériel et méthodes). Les vésicules autophagiques ont été visualisées par immunofluorescence (figures 65).



*Figure 66 : Détection des vésicules positives pour LC3 dans les cellules de la lignée SH-SY5Y en présence ou non d'AmB et/ou de bafilomycine à 50 nM
Barre d'échelle : 5 µm*

Dans les conditions basales (figure 66, panel du haut), peu de vésicules autophagiques sont détectées dans les contrôles alors que les ponctuations positives pour LC3 apparaissent être plus nombreuses dans le cas des cellules traitées par l'AmB. Lorsque le flux autophagique est inhibé (figure 66, panel du bas), on observe un accroissement de la densité autophagosomale indiquant l'efficacité de la bafilomycine. De façon similaire à ce qui a été constaté dans les cultures primaires, en conditions d'exposition des cellules à l'AmB, on peut remarquer

une population de structures ponctiformes plus hétérogènes. En revanche, les vésicules positives pour LC3 d'intensité plus faible par rapport aux ponctuations de taille inférieure observées dans les cultures primaires neuronales ne sont pas retrouvées sur ces marquages. Il serait intéressant de caractériser la nature de ces structures et des cellules les contenant car ces figures semblent être spécifiques aux cultures primaires neuronales.

III. EFFETS DE L'AMB SUR LES VOIES DE L'AMPK ET mTOR

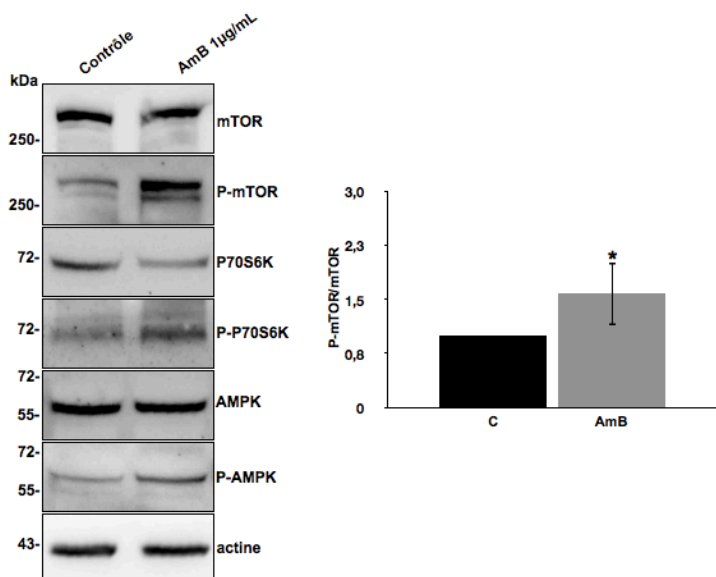


Figure 67 : Analyse en western-blot des effets de l'AmB sur les voies AMPK et mTOR

A gauche : détection en western-blot des formes globales et phosphorylées de mTOR, de son substrat, P70S6K et de l'AMPK totale et phosphorylée.

A droite : Analyse semi-quantitative de la phosphorylation de mTOR (rapport de la densité du signal correspondant à phospho-mTOR sur celle correspondant à mTOR).

Analyses statistiques : test T de Student ; * : $p < 0,05$; $n = 3$

Afin de comprendre le mode d'action de l'AmB sur les cellules, nous avons analysé en western-blot, l'état de phosphorylation de protéines importantes dans les voies de signalisation autophagiques : mTOR et son substrat P70S6K d'une part et l'AMPK d'autre part (figure 67).

De façon surprenante, alors que l'AmB est une molécule qui semble présenter un effet inducteur sur l'autophagie, nous observons une activation significative de la voie mTOR reflétée par un accroissement de la phosphorylation de la kinase elle-même et de son substrat

P70S6K. En effet le rapport de la densité du signal correspondant à la phospho-protéine sur celle de la forme globale, normalisé par rapport au contrôle, est de 1,0 contre $1,6 \pm 0,44$, $p < 0,05$ pour mTOR et 1,0 contre $3,5 \pm 1,64$, $p < 0,03$ concernant p70S6K. Par ailleurs, l'AMPK semble être activée par l'exposition des cellules à l'AmB mais les résultats nécessitent d'être reproduits pour être validés comme le montre le signal détecté par l'anticorps reconnaissant le phospho-épitope T172.

Ces observations suggèrent que la modulation de l'autophagie par l'AmB pourrait être dépendante de la voie de l'AMPK d'une part et d'autre part, l'AmB conduit à l'activation de la voie mTOR ce qui expliquerait la faible amplitude de l'induction autophagique. Il serait utile de vérifier si ce point est caractéristique des cultures primaires corticales ou si cela est reproductible pour d'autres modèles cellulaires.

IV. EFFETS DE L'AMB SUR LA CMA

De par son mode d'action, l'utilisation de l'AmB conduit à la séquestration du cholestérol au niveau des membranes biologiques. Or, la régulation de l'autophagie dépendante de protéines chaperonnes (CMA), est en partie dépendante de la localisation du récepteur LAMP-2A au niveau des microdomaines lipidiques résistants aux détergents (rafts), portions membranaires enrichies en cholestérol et en sphingolipides. Aussi, étant donné que des modifications de l'activité de la CMA peuvent avoir des conséquences sur l'activité macroautophagique, il était important d'analyser l'effet de l'AmB sur cette voie. Nous avons utilisé une privation sérique de 12 heures en tant que contrôle positif d'induction de la CMA. En western-blot, les modifications de l'activité de la CMA peuvent être reflétées par des modulations de l'expression de Hsc70 et celle de LAMP-2A. Ainsi, la privation nutritionnelle (figure 68, piste 3) entraîne une intensification du signal correspondant

à Hsc70 et à LAMP-2A. Les niveaux de l' α -synucléine, substrat connu de la CMA ne varient apparemment pas. Une élévation de la détection de la protéine Bag-1 est également observée lorsque les cellules sont placées dans le MEM. Lorsque l'on compare la condition AmB au contrôle, des variations similaires, mais en moindre mesure, (excepté pour LAMP-2A) sont observées. Ces analyses nécessitent d'être reproduites afin de confirmer ces observations.

On peut estimer l'activité de la CMA en immunofluorescence en réalisant un co-marquage LAMP2S (en vert sur la figure 69) et LAMP2A (en rouge). En effet, il a été montré que les lysosomes actifs pour la CMA présentaient une localisation périnucléaire et que leur membrane était enrichie en LAMP2A (Kaushik et Cuervo, 2009). De manière préliminaire, l'observation de la CMA a été testée sur les cellules de la lignée SH-SY5Y avant de passer à notre modèle de cultures primaires corticales. On peut observer sur la figure 69, en condition de privation nutritionnelle, le repositionnement des lysosomes positifs pour LAMP2A en région périnucléaire (flèches). Dans la

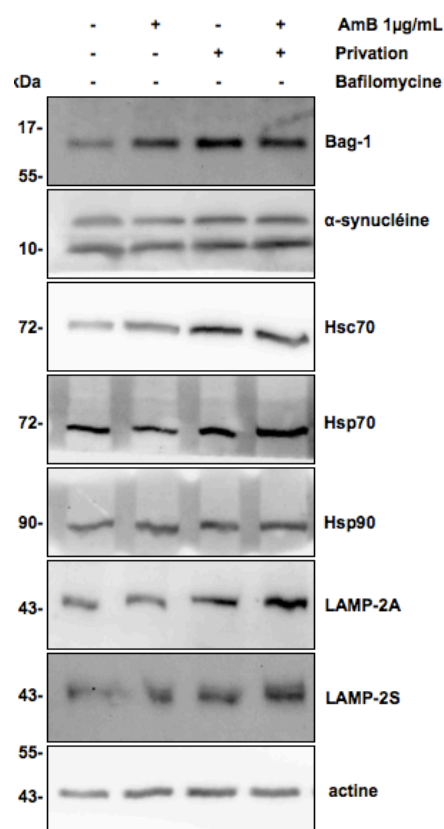


Figure 68 : Analyse en western-blot de l'expression des protéines impliquées dans la CMA

condition AmB 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, l'organisation des lysosomes est plus désordonnée, bien qu'ils se trouvent apparemment en position plus proche du noyau (en comparaison avec le contrôle) suggérant que les effets observés en western-blot correspondent bien à une induction de la CMA. Ces résultats doivent être quantifiés et l'influence de l'AmB sur la CMA dans les cultures primaires neuronales doit aussi être analysée. Il est à noter que l'on peut constater la présence de lysosomes de grande taille dans ces cellules.

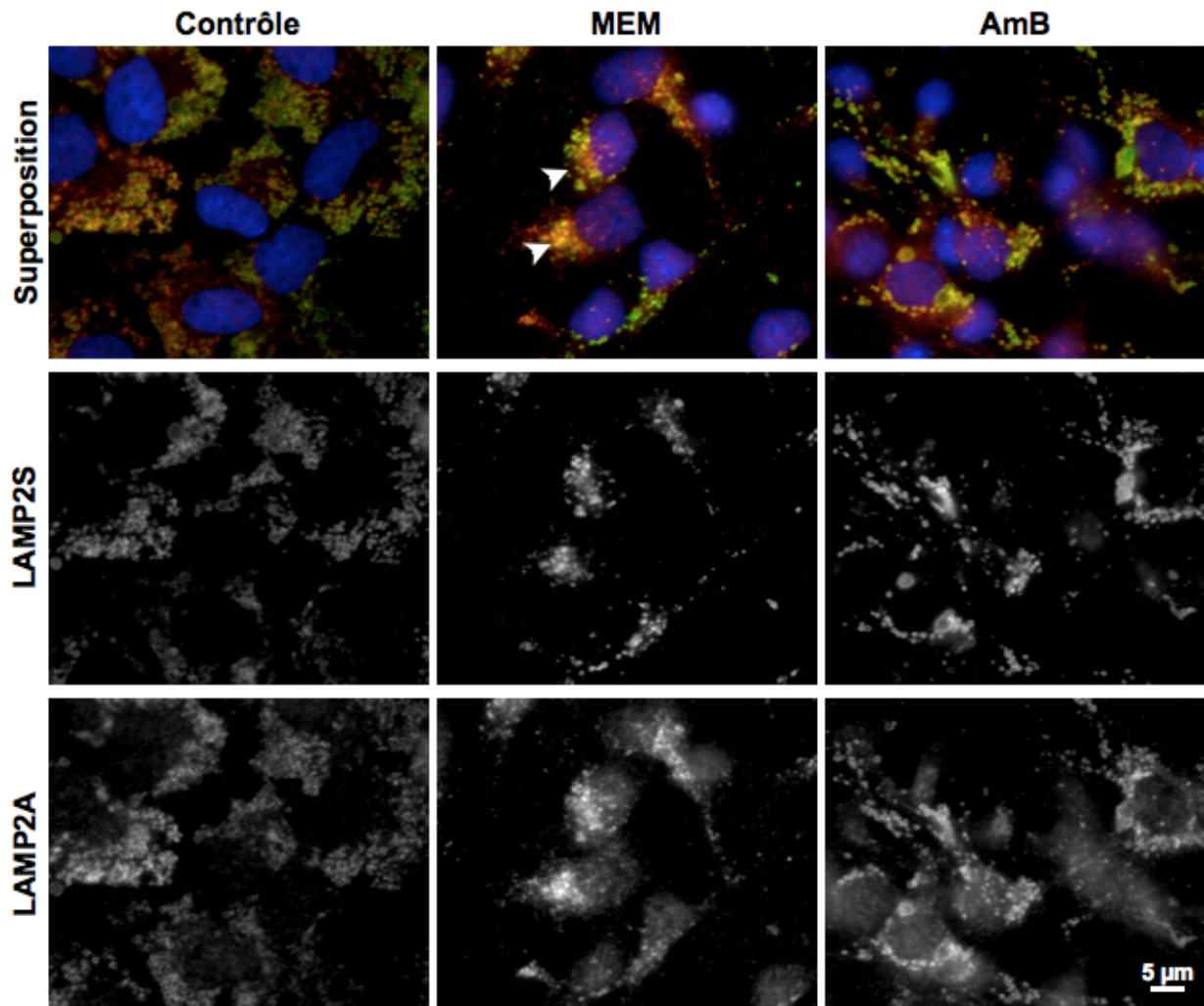


Figure 69 : Effets de l'AmB à 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sur la CMA dans les cellules de la lignée SH-SY5Y, en immunofluorescence. Barre d'échelle : 5 μm

Les travaux complémentaires à ceux réalisés dans les cellules de la lignée COS-7 ont été transposés à notre modèle biologique d'intérêt, c'est-à-dire dans les cultures primaires neuronales où les effets de l'AmB sur l'autophagie sont plus modérés en comparaison avec les résultats obtenus de manière préliminaire dans les cellules de la lignée COS-7. L'analyse des marqueurs autophagiques en présence de la bafilomycine montre que la modulation de l'activité autophagique par l'AmB correspond à une induction et que cette substance n'affecte pas les processus de

maturation des autophagosomes. Ceci a été confirmé par l'étude des variations de p62 en western-blot. De manière surprenante, la visualisation des vésicules positives pour LC3 dans les neurones montre que l'AmB induit la formation de structures larges, positives pour LC3 mais dont le marquage est moins intense en comparaison avec celui observé dans le cas de vésicules autophagiques. L'AmB semble affecter l'autophagie dans les cellules de la lignée de neuroblastome SH-SY5Y, cependant, dans ce dernier cas, au vu des différences de réactions entre les cellules COS-7 et les cultures corticales primaires, il est nécessaire de confirmer ces observations par des analyses en western-blot des marqueurs autophagiques (LC3, p62 et Beclin-1) en présence ou non d'inhibiteurs lysosomaux et par une analyse quantitative en imagerie confocale. Pour répondre à la remarque faite par les relecteurs sur le mode d'action de l'AmB, nous avons testé l'effet de cette substance sur les voies mTOR et AMPK. L'AmB semble affecter l'AMPK dans nos cultures. Nous devons alors vérifier en utilisant des substances pharmacologiques appropriées (inhibitrices : composé C ou inductrices : AICAR, metformine, phenformine) que l'AMPK est impliquée dans l'autophagie induite par l'AmB. Concernant mTOR, l'AmB induit l'activation de cette voie puisque l'exposition des cultures primaires à cette substance induit une phosphorylation significative de mTOR et de son substrat P70S6K. L'activation conjointe des voies AMPK et mTOR suite à l'exposition des cellules à l'AmB suggère que la voie de l'AMPK est prioritaire sur la voie mTOR dans le modèle étudié. L'AmB peut également agir sur des voies complémentaires inductrices de l'autophagie indépendantes. Par exemple, l'autophagie pourrait être modulée *via* une augmentation du calcium libre cytosolique (Høyer-Hansen et al., 2007; Gao et al., 2008; Grotemeier et al., 2010). L'AmB est en effet une substance connue pour induire des variations des concentrations calciques cytosoliques (Cohen et al., 1990; Rogers et al., 1999). L'étude de l'état d'activation de la CaMK β suite à l'exposition des cellules à l'AmB devra être vérifiée. Un autre point de vérification consistera en l'utilisation de l'AmB en combinaison avec des chélateurs du calcium.

Dans cette étude, des marqueurs de la CMA sont augmentés dans les cultures primaires et le repositionnement des lysosomes positifs pour LAMP-2A dans les SH-SY5Y plaident en faveur d'une activation de cette voie. L'AmB, pourrait agir sur cette voie à travers la séquestration du cholestérol. L'AmB pourrait induire des modifications de l'organisation membranaire et perturber les régulations de voies dépendantes de protéines résidentes des rafts lipidiques, portion membranaires enrichies en cholestérol. Ceci est vérifiable en réalisant un marquage de ces microdomaines membranaires grâce à la toxine cholérique B couplée à un fluorochrome. Parmi ces protéines on peut citer LAMP-2A, protéine essentielle dans le fonctionnement de la CMA. Nous

avons par conséquent analysé l'activité de la CMA dans des cellules exposées à l'AmB. Cette partie du travail demeure préliminaire mais les premières constatations suggèrent une influence de l'AmB sur ce mécanisme catabolique spécifique. L'induction de la conversion de LC3-II en LC3-I par la nystatine dans les fibroblastes humains et murins a été justement imputée à la déplétion en cholestérol (Cheng et al., 2006). La séquestration du cholestérol est aussi liée à la facilitation de l'internalisation de l'endothéline recombinante *in vitro* dans des cellules HUVEC et *in vivo* par endocytose (puits recouverts de clathrine et cavéoles) en provoquant la désorganisation des rafts lipidiques et en augmentant l'activité endocytosique (Chen et al., 2011b). Des anomalies du métabolisme lipidique sont associées à des maladies de surcharge lysosomale comme la maladie de Niemann-Pick de type C et de PND dont la maladie d'Alzheimer. En ce sens, la protéine NPC1, qui fonctionne dans le trafic cellulaire du cholestérol est élevée dans le cortex frontal et la région CA1 de l'hippocampe de patients atteints de la maladie d'Alzheimer. Son expression est également augmentée dans les cerveaux de modèles murins de cette pathologie (souris APP et APP/PS1) (Kågedal et al., 2010). L'homéostasie du cholestérol est perturbée au cours de la maladie d'Alzheimer et la prise de statines, molécules hypocholestérolémiantes, diminuent la prévalence de la survenue de cette pathologie (Jick et al., 2000; Wolozin, 2004). En outre, le taux de cholestérol membranaire, plus élevé dans les astrocytes en comparaison avec les neurones et est impliqué dans la toxicité du peptide A β (Abramov et al., 2011). Il a été également montré que dans le cas de pathologies de surcharge lysosomales, le cholestérol s'accumulait dans le compartiment endo-lysosomal et inhibait les processus de fusion membranaire en séquestrant les protéines SNARE au niveau de la membrane lysosomale (Fraldi et al., 2010). Ainsi, compte-tenu de l'effet en partie protecteur de l'AmB sur le clivage de la caspase-3 provoqué par la privation nutritionnelle d'une part, l'effet inducteur de l'autophagie, mécanisme neuroprotecteur, par cette même molécule d'autre part, et enfin son mode d'action potentiellement lié à la séquestration du cholestérol membranaire, plusieurs perspectives à plus ou moins long terme peuvent être proposées. Dans un premier temps d'évaluer *in vitro* sur le modèle de cultures primaires corticales si l'AmB peut protéger la cellule contre des stress tels que la toxicité du peptide A β . D'étudier si cet effet peut être directement lié à l'induction de l'autophagie. Enfin, si les résultats se montrent positifs, de transposer cette étude au modèle animal et en particulier sur des souris modèles pour la maladie d'Alzheimer. Il serait également envisageable de comparer les effets de l'AmB à ceux de molécules hypocholestérolémiantes telles que les statines sur le mécanisme autophagique.

Deux autres informations importantes ressortent de cette étude. D'une part, outre son utilisation médicale pour lutter contre les infections fongiques, l'AmB est une molécule couramment utilisée en culture cellulaire pour protéger les cultures des contaminations par les levures et les moisissures. Les doses testées ici appartiennent à la gamme de doses utilisées en routine en culture (au moins quinze fois inférieures aux doses thérapeutiques employées chez l'homme - 1,5 à 2 g par jour). Cet effet de l'AmB sur l'autophagie dans différents modèles cellulaires suggère d'éviter son utilisation dans le cadre d'études portant sur la voie autophagique. D'autre part, les cellules corticales semblent réagir différemment à l'utilisation de cette substance. Ce dernier point nous ramène aux constatations faites dans la première partie, c'est-à-dire que les neurones, cellules majoritairement présentes dans le modèle utilisé (cultures corticales primaires enrichies en neurones) fonctionnent différemment des autres types cellulaires quant à la conduite de l'autophagie et ceci pourrait être en relation avec une vulnérabilité particulière de ces cellules vis-à-vis des stress conduisant au développement des PND.

PARTIE 3 : EFFET INHIBITEUR DE L'ACIDE OKADAÏQUE SUR L'AUTOPHAGIE. RÔLE DE LA PROTÉINE PHOSPHATASE 2A

L'autophagie est majoritairement sous le contrôle négatif de la voie de signalisation dépendante de mTORC1 malgré l'existence de voies d'inductions indépendantes. L'existence d'une activité autophagique basale est cruciale pour le maintien de l'homéostasie cellulaire et plus particulièrement dans les cellules post-mitotiques comme les neurones. Etant donné l'importance de l'autophagie dans l'homéostasie cellulaire, il n'est pas surprenant que des altérations de ce processus aient été retrouvées dans un certain nombre de conditions pathologiques, incluant le cancer (Kondo et al., 2005) et les PND (Boland et Nixon, 2006; Nixon, 2006; Knaevelsrud et Simonsen, 2010).

Après leur formation, les autophagosomes sont transportés le long des microtubules grâce aux moteurs dynéine-dynactine en direction du MTOC (ou centrosome) où l'autophagosome devient mature en fusionnant avec les vésicules de la voie endo/lysosomale afin d'acquérir les enzymes nécessaires à la dégradation de leur contenu (Kimura et al., 2008). Au delà de leur fonction dans la maturation autophagosomale, les microtubules apparaissent également être impliqués dans la biogenèse des vésicules autophagiques (Fass et al., 2006; Köchl et al., 2006; Geeraert et al., 2010). La dynamique des microtubules est régulée à travers leur interaction avec les protéines associées aux microtubules ou MAP (*Microtubule-Associated Proteins*). MAP-LC3 a été découverte dans le cerveau dans une fonction d'interaction avec les chaînes lourdes de MAP1A et MAP1B conduisant à une augmentation de la liaison de ces protéines aux microtubules (Mann et Hammarback, 1994; Halpain et Dehmelt, 2006). En plus de sa fonction en tant que protéine stabilisatrice des microtubules, LC3 joue un rôle important dans la nucléation et l'expansion du phagophore (Fujita et al., 2008; 2009a).

PP2A est une holoenzyme hétérotrimérique hautement conservée au cours de l'évolution comprenant une sous-unité A structurale, une sous-unité catalytique C et une sous-unité régulatrice B. Dans le système nerveux central des mammifères, PP2A est la phosphatase majeure agissant sur

la protéine tau (Xu et al., 2008). Dans les cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer, les ARN messagers de la PP2A ainsi que l'activité enzymatique de la protéine sont diminués (Gong et al., 1993; Vogelsberg-Ragaglia et al., 2001) alors qu'à l'inverse, la présence de l'inhibiteur endogène-1 de la PP2A, I¹^{PP2A} est accrue (Chen et al., 2008a; Tanimukai et al., 2005). Cette décroissance de l'activité de PP2A contribuerait à l'hyperphosphorylation de la protéine tau de même qu'à la production de peptide A β au cours de la maladie d'Alzheimer (Sontag et al., 2007).

Des altérations des voies autophagiques et endo/lysosomales ont été décrites dans les cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer (Cataldo et al., 1996; 2001; Nixon et al., 2000; 2005). Au niveau des neurites dystrophiques, et à moindre échelle, au niveau du péricaryon de neurones corticaux et hippocampiques de cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer, une forte accumulation de vésicules autophagiques immatures a été décrite, en particulier dans le cas des neurones présentant une pathologie neurofibrillaire (Nixon et al., 2005). Cette accumulation massive d'autophagosomes dans les neurites dystrophiques amène à penser que le transport rétrograde axonal des autophagosomes et leur maturation en autolysosomes peut être anormale, interférant alors avec la fonction protectrice de l'autophagie (Nixon et al., 2008; Nixon et Yang, 2011).

Cela n'exclue cependant pas la possibilité qu'une induction additionnelle de l'autophagie participe à l'accumulation de ces autophagosomes immatures. De façon intéressante, des données obtenues à partir de modèles cellulaires et animaux de la maladie d'Alzheimer suggèrent qu'une accumulation de vésicules autophagiques immatures constitue une source importante de peptide A β . Le compartiment autophagosomal est en effet enrichi en protéines constitutives de la machinerie requise pour cette production (Yu et al., 2004b) et le peptide A β peut être généré de manière dépendante de la préséniline-1, suite à l'induction de l'autophagie par inhibition de mTOR grâce à l'action de la rapamycine (Yu et al., 2005; Nixon, 2007).

PP2A est à même de réguler la phosphorylation d'un grand nombre de substrats dont parmi eux, un certain nombre de protéines impliquées dans la voie mTORC1. Ainsi, cette voie représente, pour PP2A, un moyen de réguler l'autophagie. En ce sens, il est important de noter qu'une élévation des taux de phosphorylation de la protéine mTOR a été détectée dans les cerveaux de patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Griffin et al., 2005).

Sans prendre en compte son action sur le cytosquelette neuronal, des données contradictoires ont été publiées concernant l'influence de la PP2A sur le processus autophagique (Holen et al.,

1992, 1993, Yoon et al., 2008). L'activité de la PP2A peut-être régulée par l'association, au niveau de sa sous-unité catalytique PP2A-C, d'une sous-unité non-conventionnelle α_4 ou de son homologue chez la levure, Tap42 (Chen et al., 1998; Nanahoshi et al., 1998; Prickett et Brautigan, 2006). En fonction du type cellulaire concerné, l'association PP2A-C/ α_4 peut-être, ou non, sensible à la rapamycine, impliquant des liens entre mTOR et PP2A. Chez la levure, l'inactivation de Tap42 induit l'autophagie. L'effet inhibiteur de Tap42 est dépendant de la voie mTOR/PP2A (Yorimitsu et al., 2009). A l'inverse, dans les cellules mammaliennes, l'association entre PP2A-C et α_4 réduit l'activité de la PP2A envers les substrats spécifiques de la voie mTOR (Nanahoshi et al., 1998). La sous-unité α_4 peut aussi se lier à l'ubiquitine-ligase MID1 et permettre ainsi son interaction avec une sous-population de la PP2A associée aux microtubules. Cette interaction conduit MID1 à ubiquitinyler PP2A-C et ainsi à l'adresser au protéasome, ce qui permet de réguler son activité (Trochenbacher et al., 2001; Aranda-Orgillés et al., 2008). La possibilité de dissocier la sous-unité α_4 de la PP2A-C par la rapamycine pourrait expliquer comment est activée PP2A au cours de l'induction de l'autophagie (Park et al., 2008). Dans les hépatocytes de rat, l'inhibition de la PP2A par l'OKA régule négativement l'autophagie (Holen et al., 1993). A l'inverse, l'exposition à l'OKA de neurones de rat en culture ou son injection dans des cerveaux de rats active mTOR (causant la phosphorylation de ses substrats) et à une accumulation d'autophagosomes (Yoon et al., 2008). Néanmoins, dans ce dernier travail, il n'a pas été déterminé si cette augmentation du nombre de vésicules autophagiques était dû à une induction de l'autophagie ou à un blocage des phases de maturation autophagosomale. Etant donné les interconnexions entre les voies PP2A et mTORC1, le rôle de la PP2A dans la régulation de la phosphorylation des MAP et de la dynamique des microtubules, nous avons analysé l'impact d'une inhibition de l'activité de la PP2A sur l'autophagie dans des cultures primaires de rat.

I. CINÉTIQUE ET TEST DE DOSES D'ACIDE OKADAÏQUE

Afin d'appréhender l'effet de l'OKA sur l'autophagie, nous avons réalisé une cinétique de traitement sur 12 heures avec deux doses d'acide okadaïque : 12,5 et 25 nM. Les cellules ont été récoltées toutes les trois heures pendant 12 heures, la composition protéique des extraits a été analysée par western-blot (figure 70).

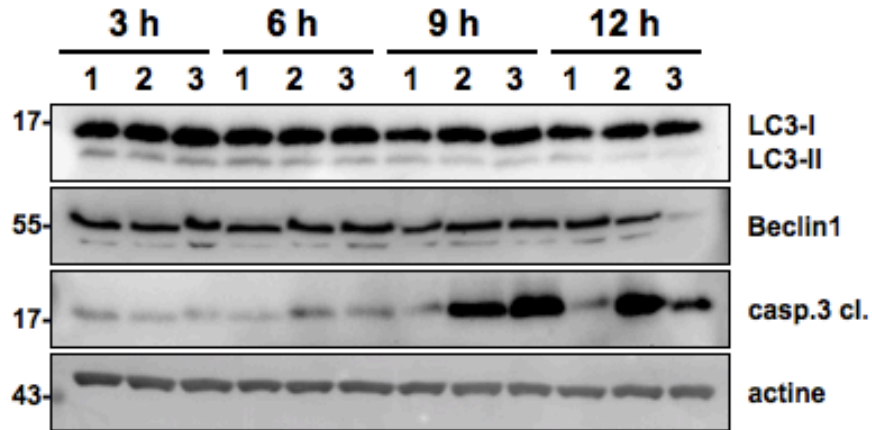
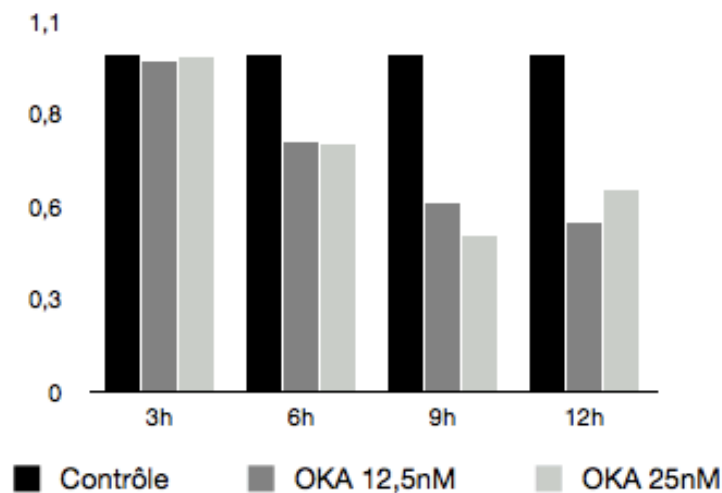


Figure 70 : Effet de l'OKA sur les marqueurs de l'activité autophagiques LC3 et Beclin-1 au cours du temps.

A partir de 9 heures, on observe un clivage de la caspase-3 correspondant à une toxicité de l'OKA. L'expression de Beclin-1 n'apparaît pas varier excepté pour l'OKA 25 nM, 12 heures où il une forte baisse de l'expression de Beclin-1 est observée. Celle-ci est probablement due à la toxicité du traitement. Des effets sur la conversion de LC3-I en LC3-II suite au traitement à l'OKA sont observés, et l'analyse semi-quantitative du blot montre qu'à partir de 6 heures, ce rapport est réduit (figure 71).



L'OKA est un puissant inhibiteur de la PP2A. Nous avons donc analysé l'effet de l'exposition des cellules aux deux doses d'OKA sur la phosphorylation activatrice des protéines impliquées dans

Figure 71 : Analyse semi-quantitative de la conversion de LC3-II en LC3-I suite à l'exposition des cultures primaires corticales à deux doses d'OKA (12,5 et 25 nM) en fonction du temps

la signalisation autophagique : mTOR (Ser 2448) et l'AMPK α (Thr 172) et celle de leurs substrats respectifs : p70S6K et l'ACC (Acétyl-Coenzyme A Carboxylase) (figure 72).

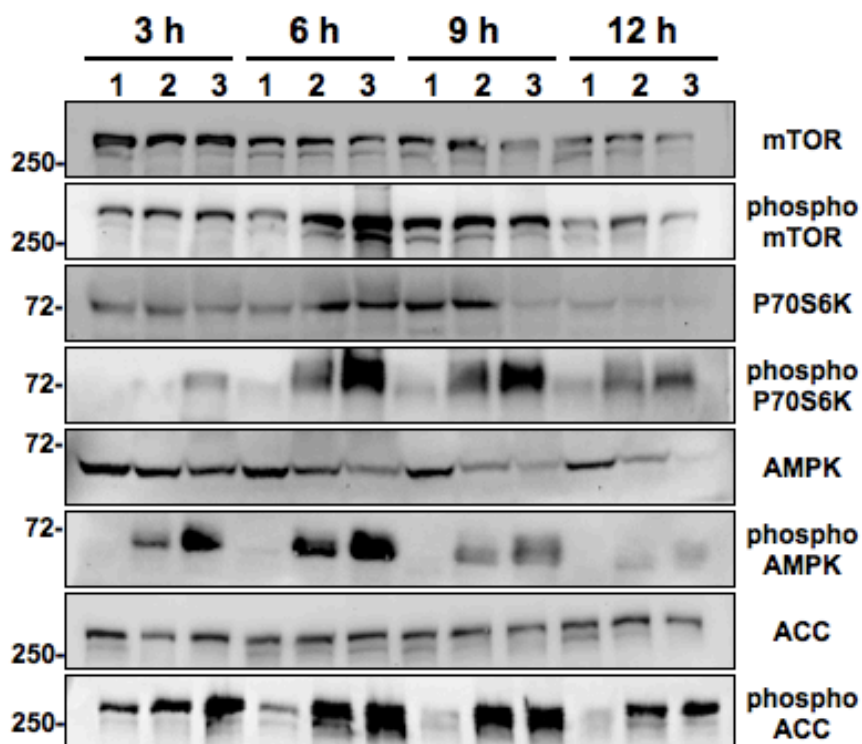


Figure 72 : Effet de l'OKA sur les molécules clé des voies de régulations autophagiques mTOR et AMPK et sur leurs substrats respectifs, P70S6K et ACC.

Dès 3 heures de traitement, l'OKA provoque une augmentation de l'activation de l'AMPK, reflétée par une augmentation du signal correspondant à une augmentation de la détection de l'ACC phosphorylée en S79. mTOR et p70S6K sont quant à elles phosphorylées à partir de 6 heures de traitement (figure 72).

Compte-tenu qu'une variation du rapport LC3-II/LC3-I est perceptible à partir de 6 heures, nous avons choisi ce temps d'exposition pour la suite de nos expérimentations.

II. L'INHIBITION DE LA PP2A PAR L'ACIDE OKADAÏQUE INHIBE L'AUTOPHAGIE ET PROVOQUE UNE ACCUMULATION INTRANEURONALE DE PROTÉINES UBIQUITINYLÉES

A. L'acide okadaïque inhibe l'autophagie en amont des phases de maturation

Des données contradictoires ont été présentées à propos de l'effet d'une inhibition de la PP2A par l'OKA sur le processus autophagique. Une inhibition à court-terme de la PP2A (3 h) par 15 nM d'OKA a été rapporté comme étant inhibitrice pour la conduite de l'autophagie dans des cellules hépatocytaires (Holen et al., 1993) tandis qu'une exposition plus longue (24 h) de neurones corticaux en culture à 12,5 nM d'OKA résulte en une accumulation d'autophagosomes et en un accroissement du taux de conversion de la forme cytosolique LC3-I en une forme lipidée autophagosomale LC3-II et ce malgré l'activation de mTOR (Yoon et al., 2009).

En utilisant le même modèle cellulaire, nous n'avons pas été en mesure de confirmer ces données (figure 73). Au contraire, dans nos conditions d'expérimentation, l'exposition des cultures primaires neuronales à des doses de 12,5 ou 25 nM d'OKA, pendant 6 heures, provoque une réduction significative de la conversion de LC3-I en LC3-II

réflétée par le ratio LC3-II/LC3-I obtenu par analyse de la densité du signal obtenu en western-blot (figure 74 ; 1,0 contre $0,7 \pm 0,2$ et $0,7 \pm 0,1$ pour le contrôle comparé respectivement aux valeurs correspondant à 12,5 et 25 nM d'OKA, $p < 0,001$ et $p < 0,01$, $n=3$)

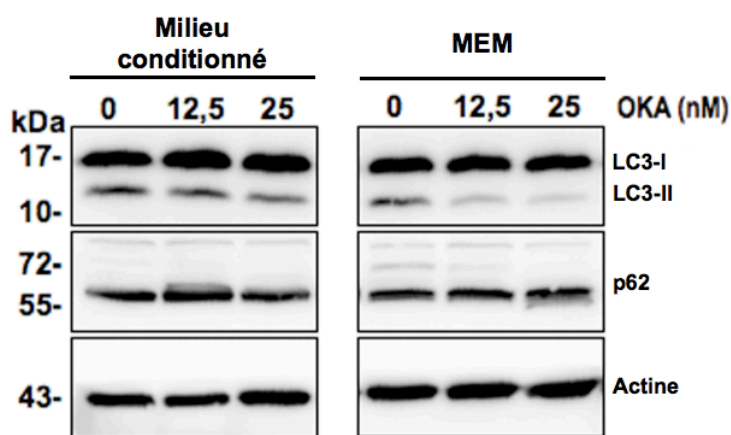


Figure 73 : Effets de 12,5 et 25 nM d'OKA pendant 6 heures sur les marqueurs autophagiques LC3 et p62 détectés en western-blot

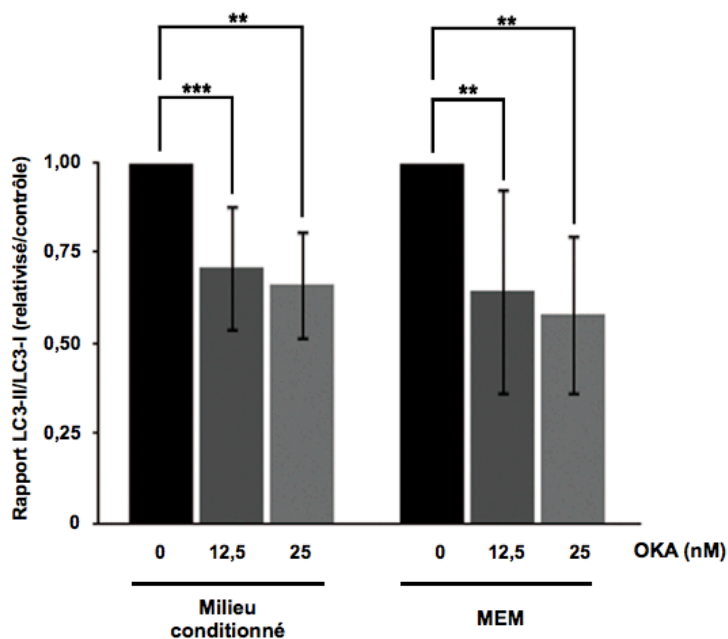


Figure 74 : Analyse semi-quantitative de la conversion de LC3-II en LC3-I suite à l'exposition des cultures primaires corticales à deux doses d'OKA (12,5 et 25 nM) en conditions basales et de privation nutritionnelle (MEM)

MEM : privation nutritionnelle

Analyse statistique : test T de Student, n=5. ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

Il est à noter que dans nos conditions de traitement (temps et concentration), l'OKA est à l'origine d'une inhibition optimale et spécifique de la PP2A par rapport aux autres protéines phosphatases et que l'expression morphologique de la mort neuronale n'est pas évidente. Par ailleurs, ces conditions n'entraînent pas un clivage significatif de la caspase-3, indiquant que la diminution de la conversion LC3-II/LC3-I n'est pas secondaire à l'apoptose neuronale. Cependant, une exposition plus longue de nos cellules (24 h) à 12,5 nM conduit à 100% de mort ne rendant pas appropriée l'étude

de l'autophagie sur de telles périodes.

En outre, la diminution des niveaux de LC3-II induite par l'OKA (LC3-II/actine ; contrôle par rapport à OKA 25 nM : 100% vs. $72,2\% \pm 16,8$, $p < 0,0001$, n=10) est parallèle à une élévation reproductible mais statistiquement non significative de LC3-I. Une privation sérique peut-être utilisée en tant que modèle d'induction autophagique dans les cultures primaires neuronales (Young et La Spada, 2009). L'exposition des neurones en culture à l'OKA en conditions de privation sérique et de facteurs trophiques (MEM), où le milieu conditionné a été remplacé par du MEM non supplémenté, sans sérum de veau fœtal, ni glucose, réduit également significativement le taux de LC3-II/LC3-I, indiquent que l'inhibition de la PP2A par l'OKA annule aussi l'autophagie adaptative (figures 73 et 74 ; 1,0 contre $0,6 \pm 0,3$ et $0,6 \pm 0,2$ pour les valeurs correspondant respectivement à 12,5 et 25 nM d'OKA et relativisées sur le rapport obtenu pour la condition de privation nutritionnelle seule, $p < 0,01$ dans les deux cas, n=3). Compte-tenu des effets reproductibles de l'OKA d'une dose à l'autre, la suite des tests sera réalisée en utilisant 25 nM d'OKA.

Quelques mécanismes qui ne sont pas mutuellement exclusifs peuvent contribuer à la baisse « apparente » de la lipidation de LC3-I :

- une inhibition nette de l'autophagie, et ce à travers des altérations des voies de signalisation (par exemple, la voie mTOR) en amont de la machinerie centrale présidant à la formation autophagosomale ;

- une accélération du flux autophagique en promouvant la fusion des autophagosomes avec les vésicules de la voie endo/lysosomale et la dégradation au niveau des autolysosomes en résultant de LC3-II ancré au niveau de la membrane interne des autophagosomes.

L'inhibition de la fusion autophagosomes/lysosomes (donc un blocage du flux autophagique) conduit à l'accumulation de vésicules autophagiques et par conséquent à celle de p62 ainsi que de LC3-II (Mizushima et Yoshimori, 2007; Ni et al., 2011).

Afin d'établir si la diminution du rapport LC3-II/LC3-I résulte d'une inhibition nette de l'autophagie due à l'exposition des cellules à l'OKA et/ou si elle reflète une accélération du processus de fusion, les conditions précédentes sont appliquées aux cultures en présence ou non d'inhibiteurs des cathepsines (Boland et al., 2008).

Pour ce faire, les cellules ont été pré-traitées par 20 μ M de leupeptine (L) et de pepstatine A (P) ou par la substance véhicule, le DMSO (Diméthyl-Sulfoxyde) pendant 18 h. Les cellules ont ensuite été exposées pendant 6 h, toujours en présence des inhibiteurs, à 25 nM d'OKA. Un protocole semblable a été suivi en conditions de privations nutritionnelles (MEM).

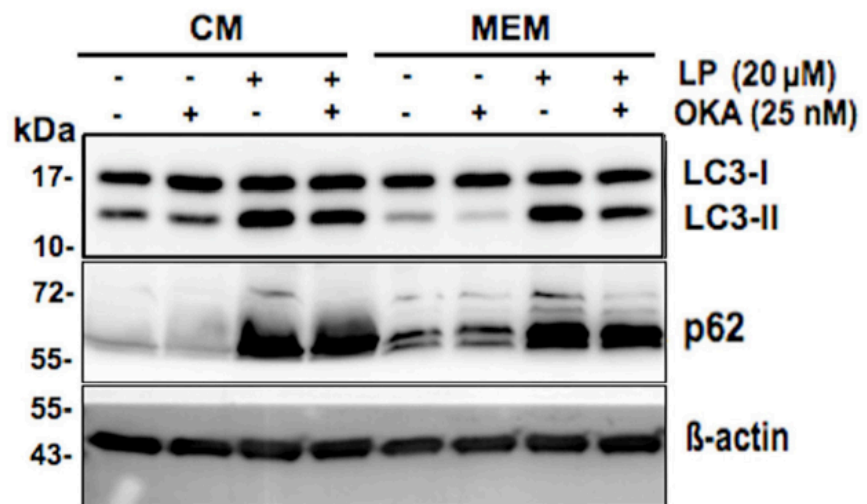


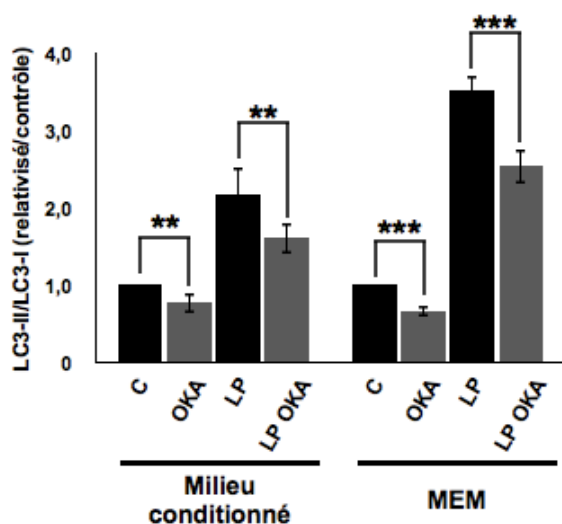
Figure 75 : Effets de 25 nM d'OKA sur LC3 et p62 en conditions basales (CM) et en conditions de privation nutritionnelle (MEM) en présence ou non d'inhibiteurs du flux (leupeptine et pepstatine à 20 μ M)

CM : Conditionned medium ; milieu conditionné (conditions basales)

MEM : privation nutritionnelle

LP : leupeptine / pepstatine

La conversion de LC3-I en LC3-II et les variations de p62 ont ensuite été analysées en western-blot (figure 75 et 76). Dans les deux conditions (CM et MEM), le blocage du flux autophagique par



*Figure 76 : Analyse semi-quantitative de la conversion de LC3-II en LC3-I suite à l'exposition des cultures primaires corticales à deux doses d'OKA (12,5 et 25 nM) en conditions basales et de privation nutritionnelle (MEM) en présence ou non d'inhibiteurs de la dégradation lysosomale (LP). MEM : privation nutritionnelle ; LP : leupeptine / pepstatine 20 μ M. Analyse statistique : test T de Student, n=4. ** : $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.*

conditions basales comme en conditions de privation, même lorsque dégradation lysosomale est inhibée. Par exemple, en conditions basales, le rapport LC3-II/LC3-I est de $2,2 \pm 0,4$ dans les cultures traitées avec la leupeptine et la pepstatine en absence d'OKA contre $1,6 \pm 0,2$ en présence d'OKA ($p < 0,01$). En absence d'inhibition du flux autophagique, quelles que soient les conditions de milieu de culture, l'OKA a tendance (mais de façon statistiquement non-significative ; $p = 0,09$) à diminuer les niveaux de p62 par rapport aux contrôles. Ces données excluent la possibilité que l'OKA puisse interférer avec le processus de fusion.

la leupeptine et la pepstatine est efficace, reflété par un accroissement de la détection de LC3-II et de p62 (figure 75).

Par exemple, en conditions basales, le taux LC3-II/LC3-I est de 1,0 dans les contrôles (valeur arbitraire attribuée) contre $2,2 \pm 0,4$ dans les cultures exposées à la leupeptine et à la pepstatine ($p < 0,01$, n=4) (figure 76). Si l'OKA induisait l'autophagie et/ou stimulait le flux autophagique, cela devrait résulter en une augmentation de l'immunodétection de LC3-II et de p62 quand ce flux est bloqué. Les données présentées dans la figure 76 montrent, à l'opposé, que la diminution du rapport LC3-II/LC3-I est maintenue, en

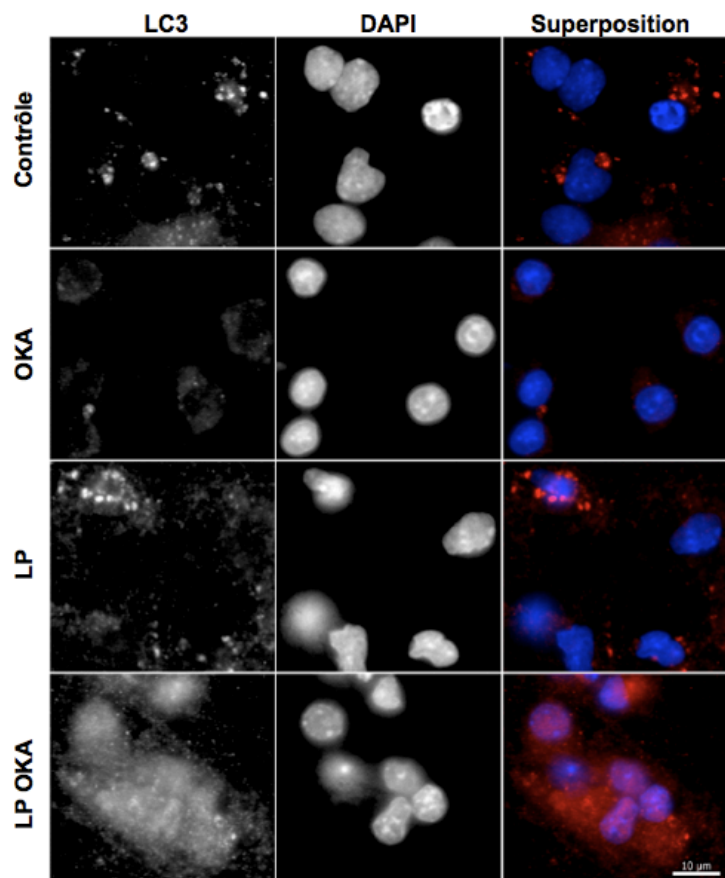


Figure 77 : Détection in situ des vésicules positives pour LC3 dans les cultures primaires corticales exposées à 25 nM d'OKA en présence ou non de 20 μ M de leupeptine et de pepstatine (LP). Barre d'échelle : 10 μ m

De manière concordante avec les résultats obtenus en western-blot, l'action inhibitrice de l'OKA sur l'autophagie est confirmée par la détection des vésicules autophagiques en immunofluorescence utilisant un anticorps dirigé contre LC3 (figure 77). Dans notre modèle de neurones en culture, nous confirmons le fait précédemment démontré qu'il y a très peu de structures ponctiformes positives pour LC3 détectées en conditions basales (figure 77). Ceci est attribuable à une haute efficacité du flux autophagique dans les neurones (Boland et al., 2008).

Dans le but de faciliter la quantification des autophagosomes *in situ*, nous avons déterminé le pourcentage de cellules autophagiques (cellules présentant au moins deux vésicules autophagiques distinctes) pour chaque condition (Kanzawa et al., 2005).

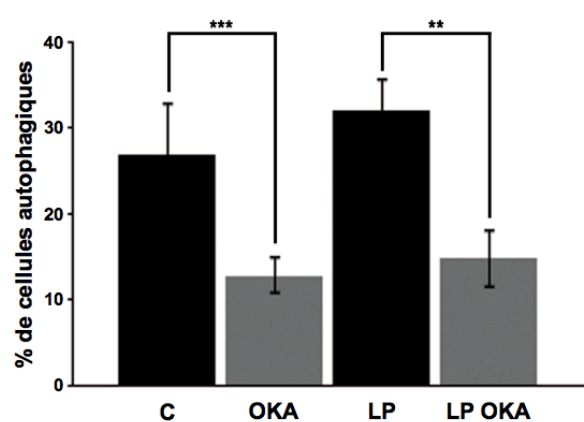


Figure 78 : Effet de 25 nM d'OKA sur le pourcentage de cellules autophagiques en présence ou non de 20 μ M de leupeptine et de pepstatine (LP)

Analyse statistique : Test T de Student, ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$, $n = 3$

Au moins 200 cellules par condition expérimentale ont été examinées. Les données présentées dans les figures 77 et 78 sont représentatives d'au moins quatre expériences indépendantes. L'OKA diminue significativement le pourcentage de cellules autophagiques observées dans les conditions basales (LP seule) de $32,0\% \pm 3,8$ à $14,8 \pm 3,4$ en présence de 25 nM d'OKA ($p < 0,01$) (LP + OKA). De façon intéressante, et en accord avec les données

obtenues en western-blot, lorsque les cellules sont exposées à l'OKA, elles présentent une augmentation du marquage de fond cytoplasmique, correspondant probablement à LC3-I, et une diminution concomitante de la fréquence des structures ponctiformes positives pour LC3 (figure 77).

Ces données indiquent que l'OKA n'affecte pas les phases effectives de l'autophagie mais la bloque plutôt des étapes situées en amont des processus de maturation et donc au niveau des voies de transduction du signal et/ou des mécanismes moléculaires conduisant à la nucléation de la membrane d'isolement. Le fait que l'exposition à l'OKA dans des cellules en conditions de privation nutritionnelle cause une réduction de la lipidation de LC3 et que la magnitude de cette diminution est plus importante par rapport à celle observée en conditions basales indique que

l'OKA inhibe non seulement l'autophagie constitutive mais empêche aussi son induction par des conditions de stress métabolique.

B. La suppression de l'activité de la PP2A par extinction de l'expression de sa sous-unité catalytique inhibe l'autophagie

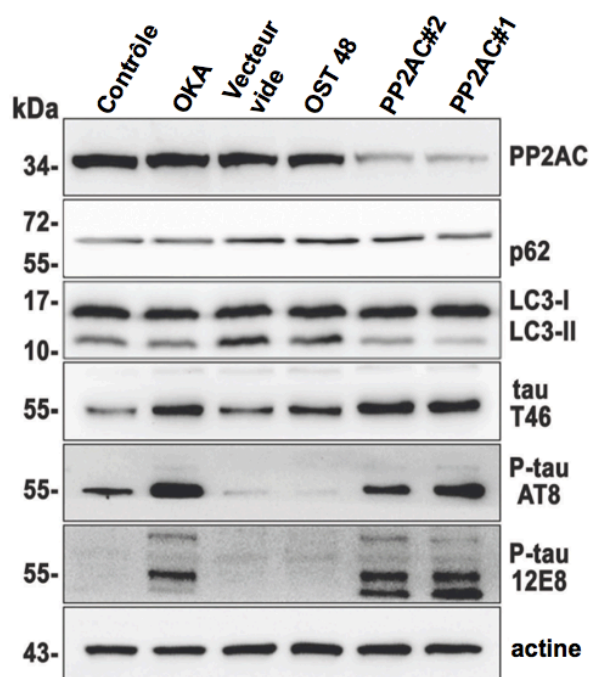


Figure 79 : Effets de la suppression de l'activité de la PP2A par extinction de l'expression de sa sous-unité catalytique PP2AC dans les cultures corticales primaires

T46 reconnaît la forme globale de tau tandis que 12E8 et AT8 sont dirigés contre des phospho-épitopes

L'inactivation de la PP2A-C a été vérifiée par analyse de son niveau protéique en western-blot (figure 79). La diminution de l'activité enzymatique de la PP2A a été également analysée en étudiant les niveaux de phosphorylation de la protéine tau, un substrat connu de la PP2A, à travers de l'utilisation des anticorps anti-tau phospho-dépendants AT-8 et 12E8. En comparaison avec le contrôle, des

L'OKA est couramment utilisé en tant qu'inhibiteur puissant et relativement spécifique de la PP2A. En réalité, l'OKA peut aussi, mais en moindre mesure (par rapport à PP2A) inhiber d'autres protéine-phosphatases. Dans le but de vérifier si l'altération de l'activité autophagique par l'OKA est, ou non, corrélée à l'inhibition de l'activité de la PP2A, nous avons éteint l'expression de sa sous-unité catalytique PP2AC par shRNA en utilisant des vecteurs lentiviraux.

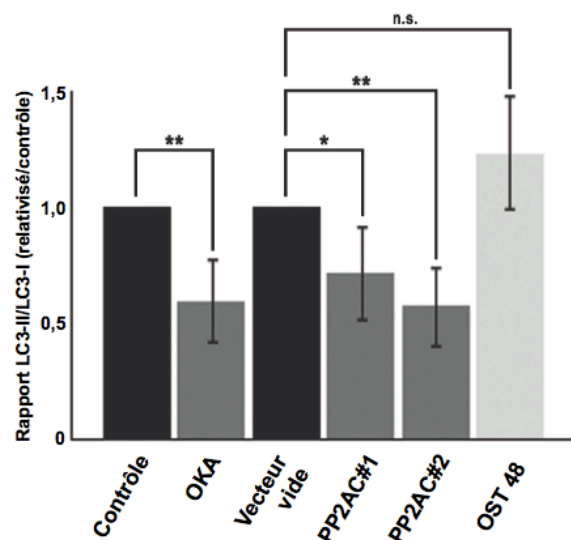


Figure 80 : Analyse semi-quantitative de la conversion de LC3-II en LC3-I suite à la transfection lentivirale d'un shRNA dirigé contre PP2AC dans des cultures primaires corticales

Analyse statistique : test T de Student, n=3.

n.s. : non-significatif ; * : $p > 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

cellules ayant été transfectées avec un plasmide vide ou ayant subi l'inactivation par shRNA de OST48, sous-unité du complexe oligosaccharyl transférase. L'extinction de la PP2A-C au moyen de deux constructions plasmidiques, PP2AC#1 ou PP2AC#2, de même que le traitement des cellules par 25 nM d'OKA, provoquent une élévation importante des taux de phosphorylation de la protéine tau au niveau des sites détectés par 12E8 et de ceux révélés par l'utilisation d'AT-8. De la même façon qu'avec l'OKA, le rapport LC3-II/LC3-I, obtenu par analyse densitométrique semi-quantitative en western-blot (figure 80), est significativement réduit après inactivation de la PP2A-C (1,0 contre $0,7 \pm 0,2$ et $0,6 \pm 0,2$, respectivement pour chaque construit shRNA ; $p < 0,05$ et $p < 0,01$, $n=3$) alors que les niveaux de p62 ne sont pas significativement modifiés.

Le marquage *in situ* des cellules grâce à un anticorps dirigé contre LC3 confirme ces résultats (figure 81). L'extinction de la PP2AC conduit à une intensification spécifique du marquage cytoplasmique associé et à une réduction de la présence de ponctuations positives pour LC3 alors que la suppression de l'expression d'OST48 n'induit pas de modification visible en comparaison avec les cellules transfectées avec un vecteur vide.

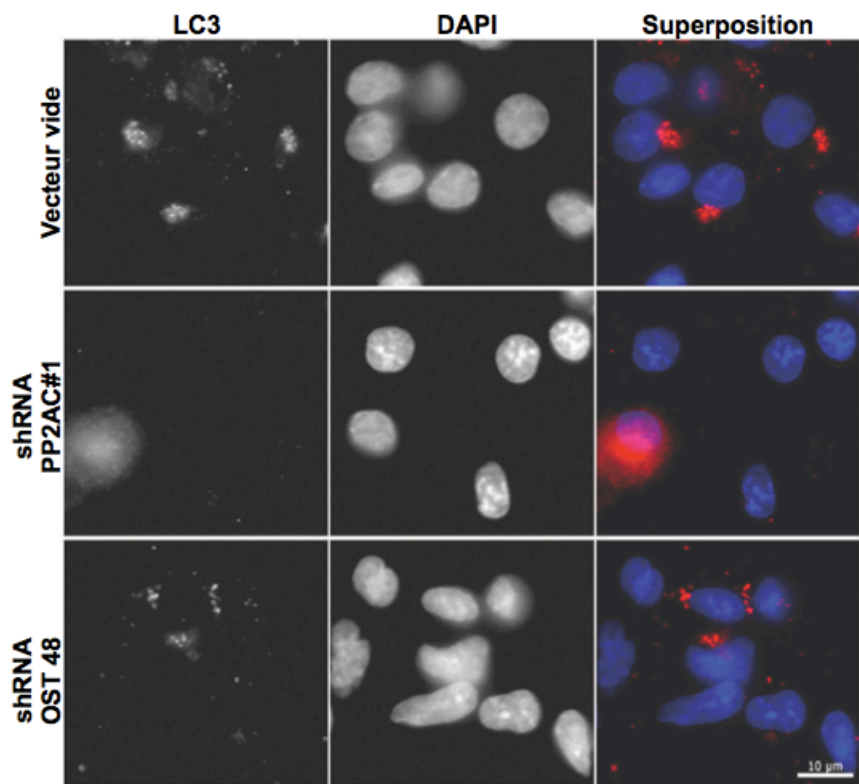


Figure 81 : Détection in situ des vésicules positives pour LC3 suite à la transfection lentivirale d'un shRNA dirigé contre PP2AC dans des cultures primaires corticales
Barre d'échelle : 10 µm

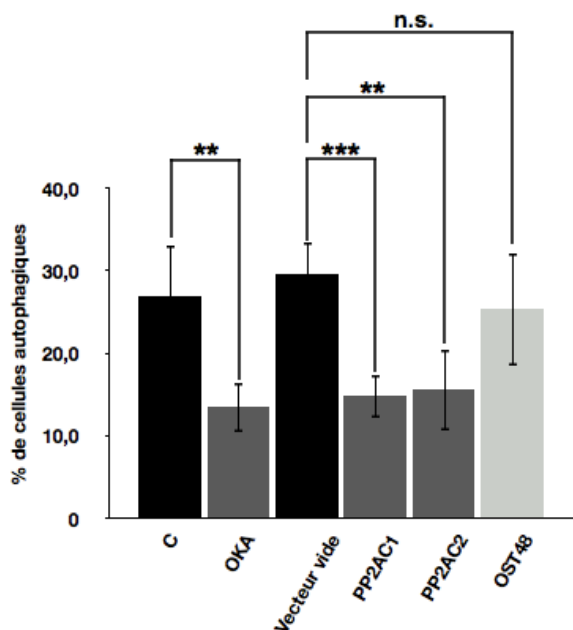


Figure 82 : Effet de la transfection lentivirale d'un shRNA dirigé contre PP2AC dans des cultures primaires corticales sur le pourcentage de cellules autophagiques. Analyse statistique : Test T de Student, n.s. : non significatif ; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$, $n = 3$

La quantification des cellules autophagiques (selon la même méthode que précédemment), montre que l'inactivation de la PP2AC conduit à une baisse statistiquement significative du pourcentage de cellules autophagiques ($29,6\% \pm 4,0$ pour la condition « vecteur vide » contre, respectivement, $14,8 \pm 2,6$ et $15,6 \pm 4,9$ pour les conditions « PP2AC#1 » et « PP2AC#2 » (figure 82).

C. L'acide okadaïque inhibe l'autophagie induite par différents stress

Bien qu'il n'y ait pas de divergence connue au niveau des modes d'induction, l'autophagie basale et l'autophagie induite par un stress peuvent être considérées comme deux entités distinctes (Komatsu et al., 2007a; Komatsu et Ichimura, 2010). Après avoir mis en évidence que l'inhibition de la PP2A par l'OKA pouvait inhiber à la fois l'autophagie constitutive et l'autophagie induite par un stress d'origine métabolique (privation en sérum et en glucose), nous avons cherché à déterminer si l'action suppressive de l'OKA était indépendante de la nature du facteur déclencheur de ce mécanisme donc si les modifications induites par l'OKA à travers l'inhibition de la PP2A affectaient un mécanisme commun qui contrôle la machinerie centrale autophagique.

En ce sens, l'OKA a été testée dans des cultures primaires exposées à des inducteurs connus de l'autophagie dont l'inhibiteur de mTOR, la rapamycine, la tunicamycine, suppresseur de la N-glycosylation et inductrice du stress du RE et MG132 qui cible la dégradation par le SUP (Rideout et al., 2004; Ogata et al., 2006; Yorimitsu et al., 2006; Rubinsztein, 2007; Ding et al., 2007; Jänen et al., 2010; Nijholt et al., 2011). Dans le cas de la rapamycine, les cellules ont été pré-

exposées à cette substance pendant 18 h avant l'ajout des 25 nM d'OKA. La tunicamycine et le MG132 ont quant à eux été rajoutés au milieu de culture en même temps que l'OKA pour une durée d'incubation totale de 6 h.

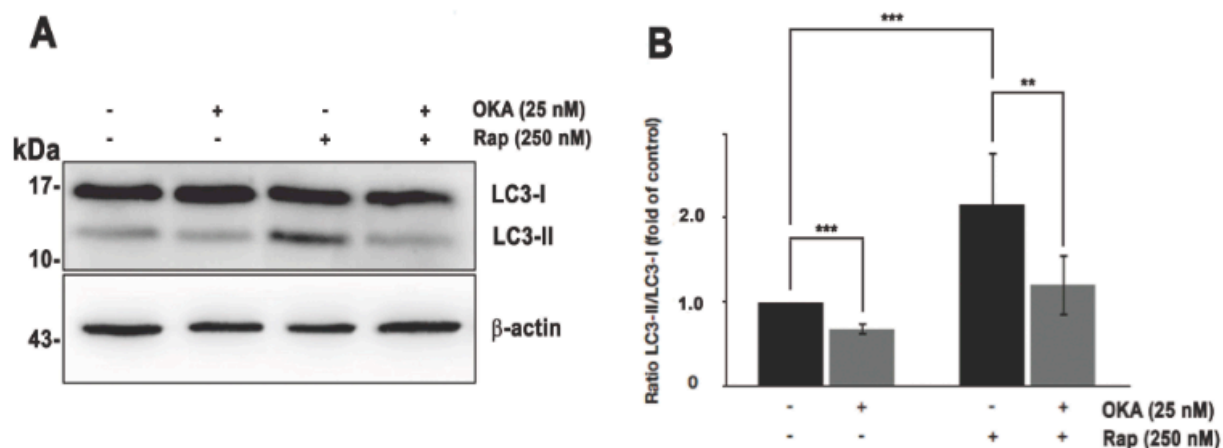


Figure 83 : Effet de l'OKA sur la conversion de LC3-II en LC3-I induite par 250 nM de rapamycine
 A : Détection de LC3 en western-blot ; B : analyse semi-quantitative des variations du rapport LC3-II/LC3-I.
 Analyse statistique : Test T de Student : ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$; $n = 3$

La rapamycine induit l'autophagie en inhibant la voie mTORC1 mimant ainsi les effets d'un stress d'origine métabolique. Dans les neurones, il a été suggéré que cette substance puisse aussi influencer l'accomplissement du flux autophagique (Rubinsztein et Nixon, 2010). Les neurones en culture ont été pré-traités pendant 18 h avec 250 nM de rapamycine (Rap) puis 25 nM d'OKA ont été rajoutés pour 6 h de plus. Comme attendu, la rapamycine seule cause une augmentation du rapport LC3-II/LC3-I ($1,0$ contre $2,2 \pm 0,6$; $p < 0,001$, $n = 3$) et cet accroissement est inversé par l'addition d'OKA ($2,2 \pm 0,6$ contre $1,2 \pm 0,4$; $p < 0,01$, $n = 3$) (figure 83).

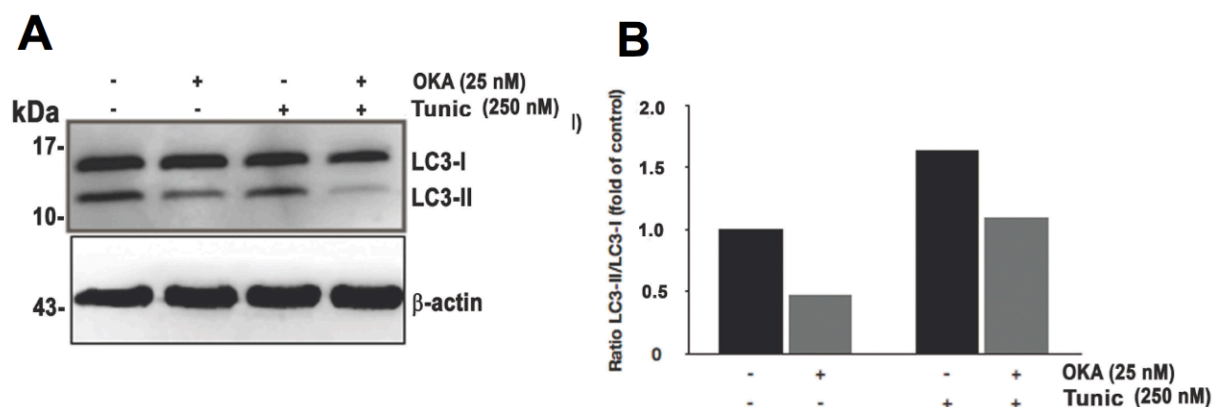


Figure 84 : Effet de l'OKA sur la conversion de LC3-II en LC3-I induite par un stress du RE causé par 250 nM de tunicamycine (Tunic.).
 A : Détection de LC3 en western-blot ; B : analyse semi-quantitative des variations du rapport LC3-II/LC3-I.

L'induction d'un stress de RE par l'exposition des cellules à 250 nM de tunicamycine pendant 6 heures provoque une élévation du taux de conversion de LC3-I en LC3-II. La co-addition de 25 nM d'OKA prévient ce phénomène (figure 84).

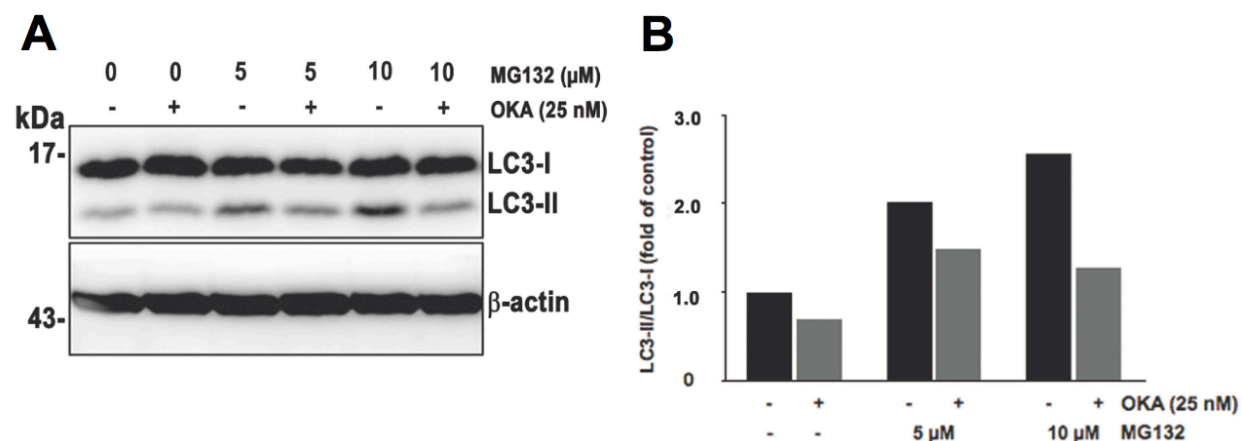


Figure 85 : Effet de l'OKA sur la conversion de LC3-II en LC3-I induite par l'inhibition du protéasome par 5 ou 10 μM de MG132.

A : Détection de LC3 en western-blot ; B : analyse semi-quantitative des variations du rapport LC3-II/LC3-I.

De façon concordante avec de précédents résultats (Rubinsztein, 2007; Rideout et al., 2004), dans nos conditions, l'inhibition du protéasome par 5 ou 10 μM de MG132 pendant 6 h élève nettement les niveaux de LC3-II (et le rapport LC3-II/LC3-I) dans les cultures primaires corticales. Cette hausse est prévenue par l'adjonction de 25 nM d'OKA (figure 85).

Ces données indiquent que qu'elles que soient les conditions de stress considérées, l'inhibition de la PP2A par l'OKA bloque l'induction de la conversion de LC3-I en LC3-II. Par conséquent, l'inhibition de la PP2A affecte un mécanisme commun à l'autophagie basale et induite. L'inhibition de la conjugaison de LC3 par l'OKA n'est jamais totale. L'influence de la PP2A sur l'autophagie pourrait alors être considérée comme facilitatrice ou modulatrice plutôt que directement inductrice. Par conséquent il serait utile d'étudier l'effet que pourrait avoir une stimulation de l'activité de la PP2A sur l'autophagie. PP2A est une phosphatase abondante avec de très nombreux substrats. Dans les voies de transduction du signal liées à l'autophagie, la plupart des protéines impliquées voient leur activité régulée par phosphorylation, à l'image de mTOR ou de l'AMPK. En outre l'autophagie a été décrite comme étant un mécanisme adaptable et pouvant être rapidement activée. Les deux interrupteurs moléculaires majeurs des voies de régulation de l'autophagie étant eux-mêmes régulés par phosphorylation. L'action de phosphatases paraît être nécessaire pour que la cellule puisse répondre rapidement à des changements rapides de son état physiologique. Nous avons donc ensuite

cherché à déterminer si les activations de l'AMPK et de mTOR peuvent être dépendantes de l'activité de la PP2A.

D. Effet de l'inactivation de la PP2A sur les voies de signalisation dépendantes de l'AMPK et de mTOR

Comme cela a été décrit précédemment, mTOR appartient à un complexe qui régule négativement le processus d'autophagie. La rapamycine, en se liant à la protéine FKBP-12 inhibe la fonction de ce complexe mTORC1. Cette substance est aussi connue pour induire l'activité de la PP2A de manière dépendante de mTOR suggérant que PP2A pourrait avoir un rôle permissif dans l'induction de l'autophagie (Peterson et al., 1999; Park et al., 2008; Liu et al., 2010). L'AMPK joue le rôle de détecteur des niveaux d'énergie cellulaires et est activée par la protéine kinase LKB1 quand la concentration en ATP cellulaire est diminuée. Par exemple en conditions de faibles concentrations de glucose cytoplasmique (Shaw, 2009). Dans les cellules mammaliennes, l'AMPK correspond à un complexe hétérotrimérique constitué par une sous-unité catalytique α et par deux sous-unités régulatrices β et γ . L'axe de signalisation LKB1/AMPK régule négativement mTOR et est considéré comme ayant un rôle positif sur l'autophagie. Malgré cela, des données contradictoires ont été rapportées concernant l'influence de l'activité de l'AMPK sur l'autophagie. Certaines études montrent que l'activation de l'AMPK conduit au déroulement de l'autophagie dans des lignées cellulaires et des cultures primaires neuronales (Meley et al., 2006; Liang et al., 2007; Vingtdeux et al., 2010). A l'inverse, plusieurs études menées par l'équipe de Seglen mettent en évidence que l'activation de l'AMPK suite à l'exposition d'hépatocytes de rat à l'OKA supprime le processus autophagique (Samari et Seglen, 1998; Samari et al., 2005). Plus récemment, il a été démontré que l'autophagie pouvait être induite en conditions de concentrations de glucose faibles dans des fibroblastes embryonnaires murins où AMPK α avait été invalidée (Williams et al., 2009).

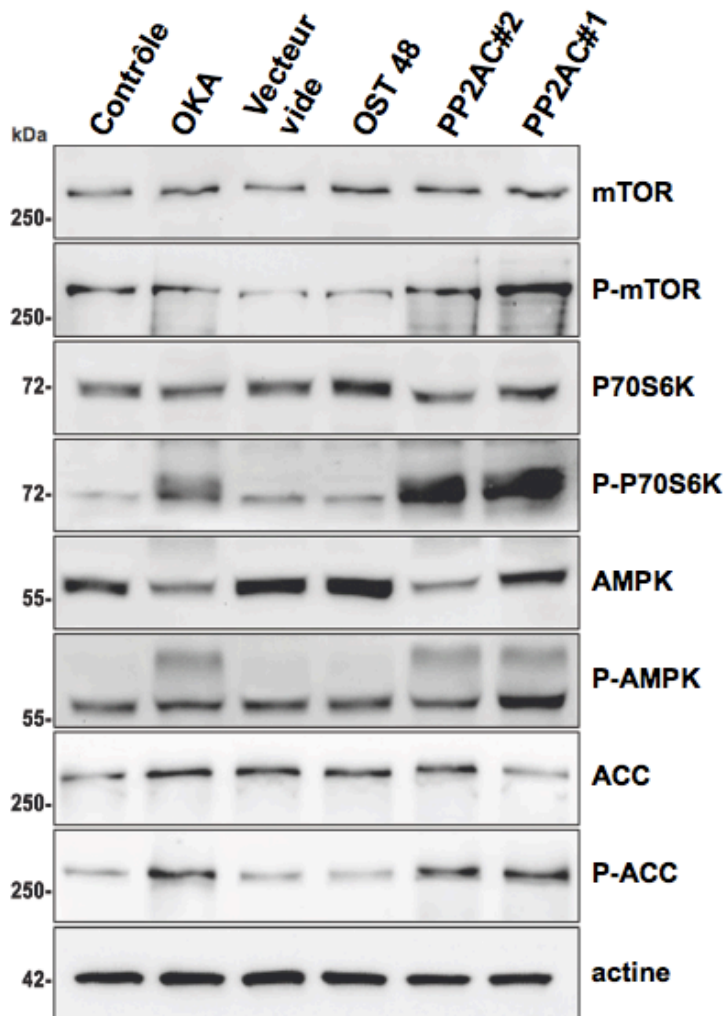


Figure 86 : Effet de l'inhibition de la PP2A par transfection lentivirale d'un shRNA dirigé contre PP2AC dans des cultures primaires corticales sur l'état de phosphorylation de mTOR et de l'AMPK et de leurs substrats respectifs P70S6K et ACC.

Dans notre modèle de cultures primaires de neurones corticaux, nous avons analysé l'effet de l'inactivation de la PP2A sur les activités de mTOR et de l'AMPK (figure 86). L'exposition des cellules à 25 nM d'OKA mène à une élévation du taux de phosphorylation de mTOR, au niveau du site S2448, et de l'AMPK α en T172. Cet effet activateur est confirmé par la hausse significative des taux de phosphorylation de leurs substrats respectifs : P70S6K et l'ACC (Acétyl-CoA Carboxylase) (figures 86 et 87).

Donc ces résultats concordent avec des données de la littérature obtenues dans des modèles hépatocytaires et neuronaux et concernant l'effet de l'extinction de la PP2AC sur l'activation de mTOR et de l'AMPK

(Samari et al., 2005; Yoon et al., 2008). Ces observations indiquent également que l'inhibition de l'autophagie suite à l'inactivation de la PP2A pourrait être due à l'activation de la voie mTORC1. Cependant, dans notre modèle, comme dans le modèle hépatocytaire, la voie de l'AMPK est activée en parallèle. Par conséquent, plusieurs hypothèses peuvent émettre : d'une part l'AMPK peut être impliquée dans une régulation négative de l'autophagie neuronale ; d'autre part l'activation de mTOR prime sur celle de l'AMPK ou enfin, l'activation de mTOR est trop robuste pour être contrée par celle de l'AMPK, ce qui expliquerait que l'inhibition de l'autophagie ne soit pas totale dans nos conditions expérimentales

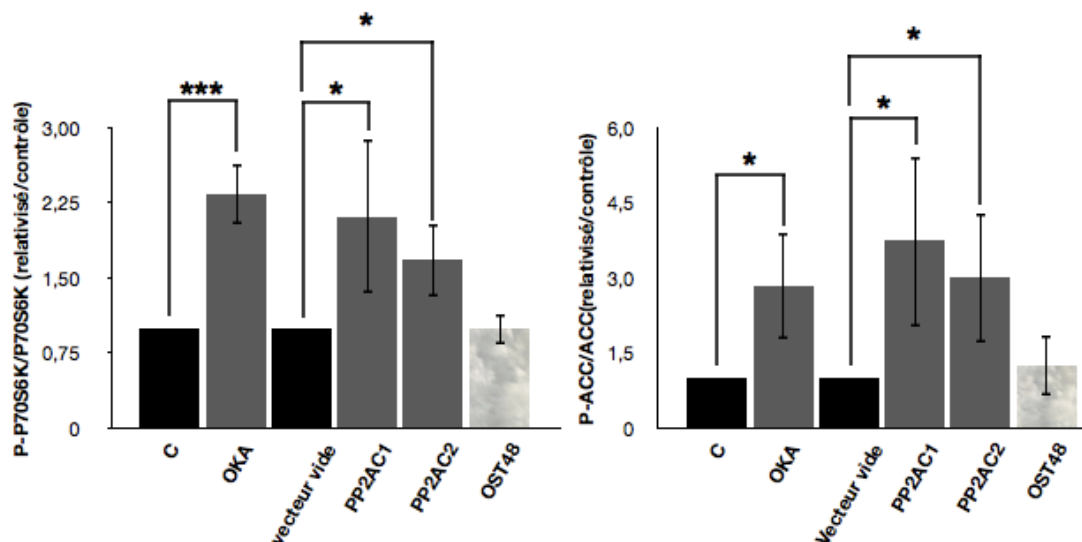


Figure 87 : Effets de l'inhibition de la PP2A sur les taux de phosphorylation de P70S6K et de l'ACC
 Analyse statistique : Test T de Student, * : $p < 0,05$ ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$, $n = 3$

E. L'inhibition de la PP2A provoque une relocalisation de p62 au sein d'inclusions cytoplasmiques positives pour l'ubiquitine

p62 est une protéine multifonctionnelle qui peut être impliquée dans des processus de mort et de survie cellulaires, l'activation de la transcription et dans l'inflammation (Wooten et al., 2006; Komatsu et Ichimura, 2010). Le domaine PB1 de p62 permet son auto-oligomérisation tandis que son domaine UBA est responsable de l'interaction de cette protéine avec des substrats ubiquitinylés, le tout participant à la fonction de p62 dans la formation des agrésomes. p62 interagit grâce à son domaine LIR avec LC3 et de façon préférentielle avec la forme lipidée afin permettre une séquestration autophagosomale sélective des substrats auxquels elle est associée (Lim et al., 2011). p62 constitue donc un substrat autophagique au même titre que les protéines ubiquitinylés contenues dans les agrésomes (Bjørkøy et al., 2005; Ichimura et al., 2008; Pankiv et al., 2007). Par conséquent, la suppression de l'autophagie devrait conduire à une accumulation d'inclusions cytoplasmiques positives à la fois pour p62 et pour l'ubiquitine. De telles inclusions sont retrouvées dans le tissu cérébral de modèles animaux et de patients atteints de PND, comme par exemple dans le cas de la maladie d'Alzheimer où p62 est associée à la protéine tau au sein d'inclusions

intraneuronales (Kuusisto et al., 2002; Babu et al., 2005; Wooten et al., 2006; Kuusisto et al., 2008; Jaeger et Wyss-Coray, 2009).

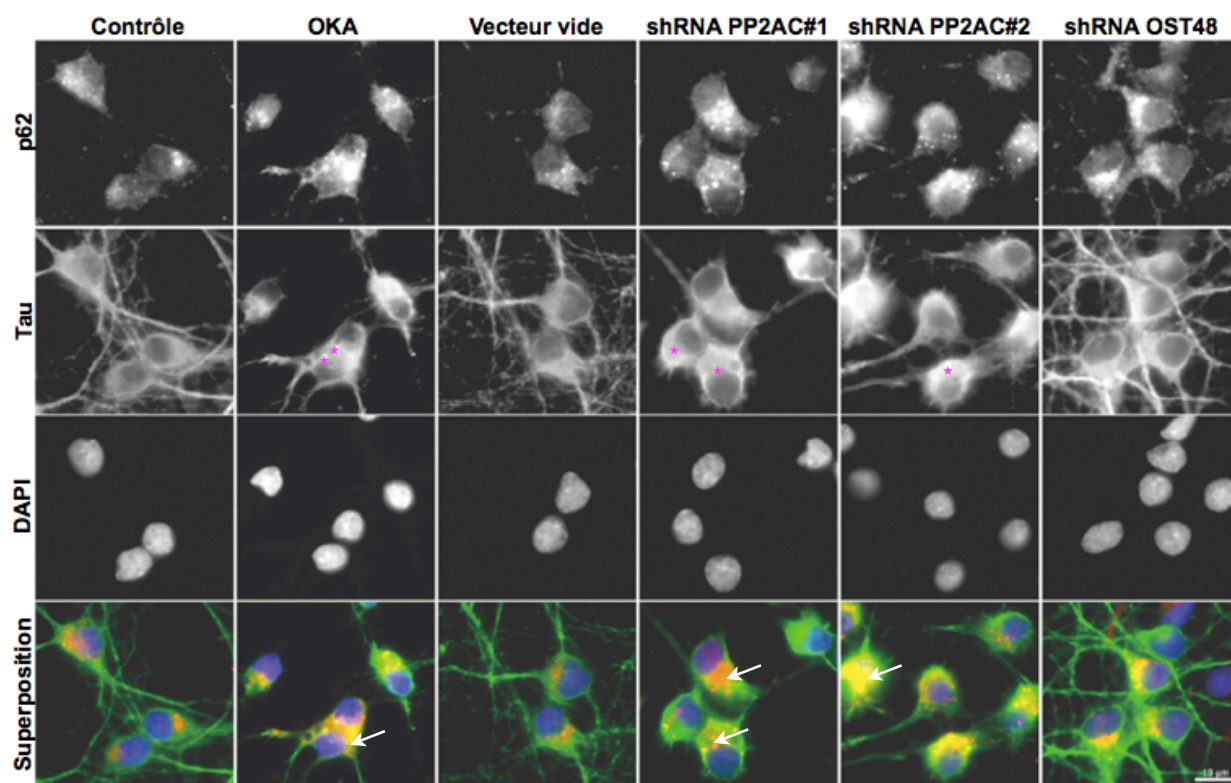


Figure 88 : Effet de l'inhibition de la PP2A sur p62 (en rouge) en immunofluorescence. Les neurones sont mis en évidence par le marquage dirigé contre la protéine tau (en vert). Les flèches indiquent les corps d'inclusion périnucléaires positifs pour p62, les étoiles indiquent les zones de superposition du marquage tau et p62. Barre d'échelle : 10 µM

Ainsi, l'inhibition de l'autophagie par l'inactivation de la PP2A devrait résulter en la formation d'inclusions intra-cytoplasmiques positives pour p62 et pour l'ubiquitine. Des doubles immunofluorescences ont été réalisées avec des anticorps dirigés contre p62 d'une part et envers la protéine tau, utilisée ici en tant que marqueur neuronal. La [figure 88](#) montre que l'inhibition (pharmacologique ou moléculaire) de la PP2A provoque une relocalisation substantielle de p62 (cytoplasmique et diffuse dans les contrôles) en de larges structures arrondies en position périnucléaire (corps d'inclusion).

Sur la [figure 88](#), le marquage en double-immunofluorescence montre une superposition des marquages de p62 et de tau dans certaines de ces inclusions protéiques positives pour tau reproduisant ainsi certains aspects neuropathologiques observés dans du tissu cérébral de patients atteint par la maladie d'Alzheimer. En parallèle, l'inhibition de l'activité de la PP2A conduit à la désorganisation du cytosquelette neuronal qui se manifeste par une perte du marquage de la protéine tau dans les neurites et par sa condensation dans le péricaryon ([figure 88](#)).

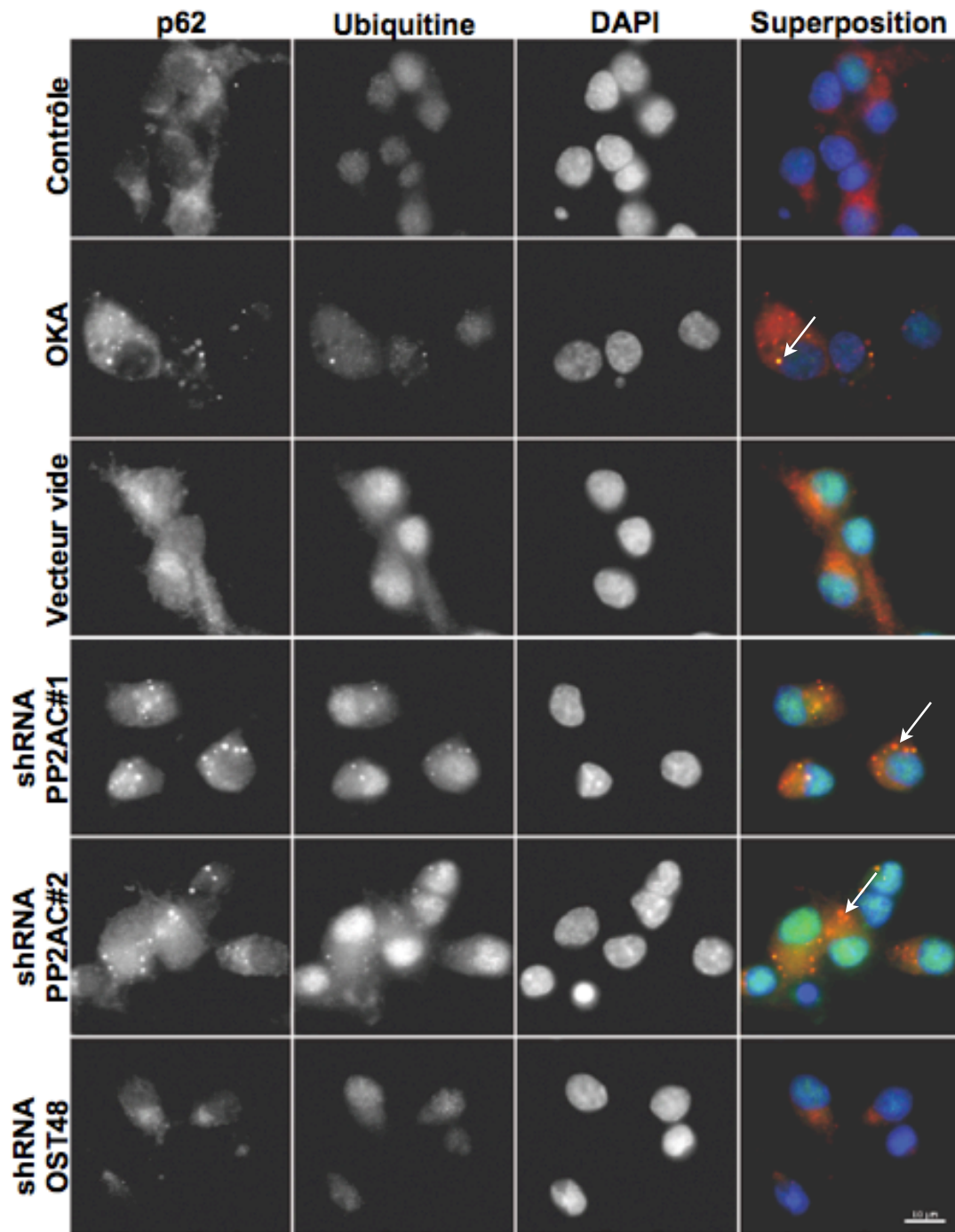


Figure 89 : Formation de corps d'inclusions positifs (flèches) pour p62 (en rouge) et l'ubiquitine (en vert) suite à l'inhibition de la PP2A
Barre d'échelle : 10 µm.

Presque toutes ces inclusions sont positives pour l'ubiquitine, comme le montrent les

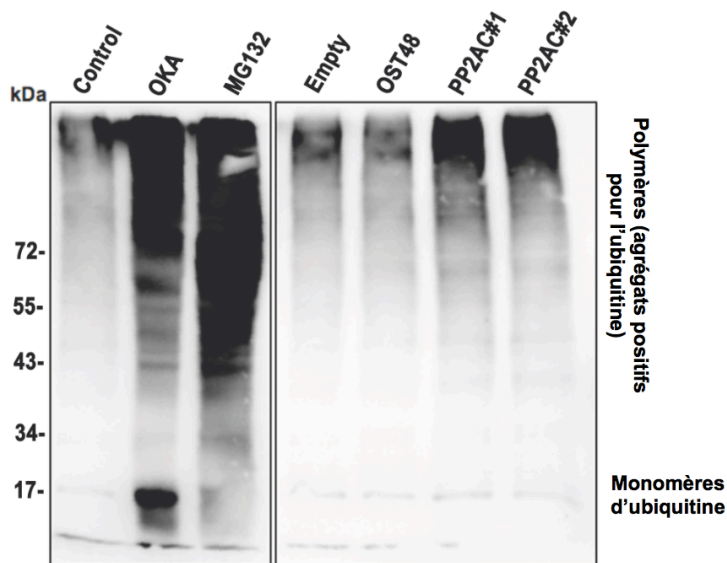


Figure 90 : Détection des protéines ubiquitinylées en western-blot suite à l'inhibition de la PP2A dans les cultures primaires corticales. L'inhibition du protéasome par MG132 (5 μ M) constitue un contrôle positif d'accumulation de protéines ubiquitinylées

microphotographies des marquages en immunofluorescences détectant p62 (rouge) et l'ubiquitine (vert) (figure 89).

La détection de l'ubiquitine en western-blot (figure 90) complète les données observées en immunofluorescence (figure 89). En effet, suite à l'inactivation (moléculaire ou pharmacologique) de la PP2A, la détection du signal est augmentée en comparaison avec les conditions contrôle (contrôle seul,

transfection d'un vecteur vide ou inactivation d'OST48) indiquant une augmentation globale de la présence de protéines ubiquitinylées ; moins forte cependant que dans le cas des cellules pour lesquelles le protéasome a été inhibé par 5 μ M de MG132.

Afin de confirmer la nature de ces inclusions, nous avons réalisé un fractionnement cellulaire à partir de cultures cellulaires pour lesquelles PP2A a été inhibée. Le fractionnement cellulaire permet l'obtention d'une fraction protéique soluble dans un détergent, le Triton X-100 (correspondant à la fraction cytosolique) et d'une fraction insoluble (contenant le cytosquelette, les noyaux, les membranes et les agrégats protéiques). Suite à l'inhibition pharmacologique de la PP2A par 25 nM d'OKA, l'immunodétection de p62 dans la fraction soluble présente une diminution marquée,

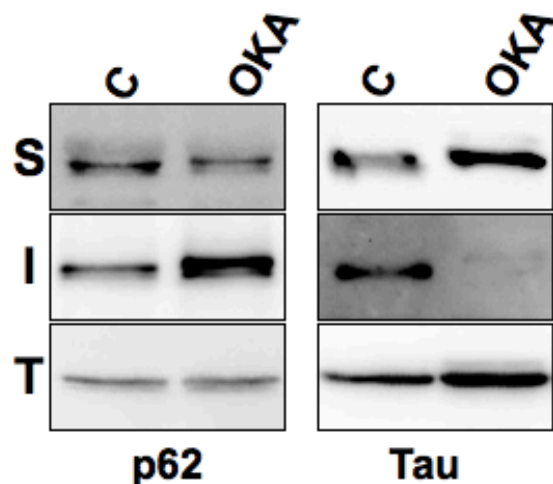


Figure 91 : Détection de p62 et de Tau dans des extraits protéiques résultant du fractionnement des extraits protéiques en une fraction soluble (S) et une fraction insoluble (I) dans le Triton-X-100. T : extraits totaux

associée à une forte hausse du signal dans la piste correspondant à la fraction insoluble (figure 91). Ces dernières données confirment que p62 est incorporée dans des agrégats protéiques insolubles après inactivation de la PP2A. La détection de tau a été utilisée pour valider la technique de

fractionnement. En effet, sa phosphorylation (ici induite par l'OKA) diminue son interaction avec les microtubules ce qui augmente le niveau de tau dans la fraction soluble (figure 91).

F. L'inhibition de la PP2A par l'OKA modifie la distribution de LC3-I entre une population cytosolique libre et une fraction liée (fraction insoluble dans le Triton X-100)

LC3 présente la capacité de se lier de manière autonome aux microtubules mais peut également appartenir aux complexes MAP1. La liaison de LC3 aux microtubules est réalisée par le biais d'interactions ioniques entre l'extrémité amino-terminale de LC3 et les sous-unités de tubuline sur le bord externe des microtubules. La portion carboxy-terminale de LC3, après activation par Atg4, est impliquée dans la liaison covalente de LC3-I avec la PE enchâssée dans la membrane autophagosomale. LC3 demeure liée à cette membrane au cours de la biogenèse autophagosomale, mais à la fin de la fermeture du phagophore, la population liée au niveau de la membrane externe est « dé-conjuguée » par l'intervention de Atg4 (Mizushima et al., 2001). Donc la forme protéique LC3-I peut être retrouvée sous forme libre dans le cytoplasme (ce qui correspond au marquage

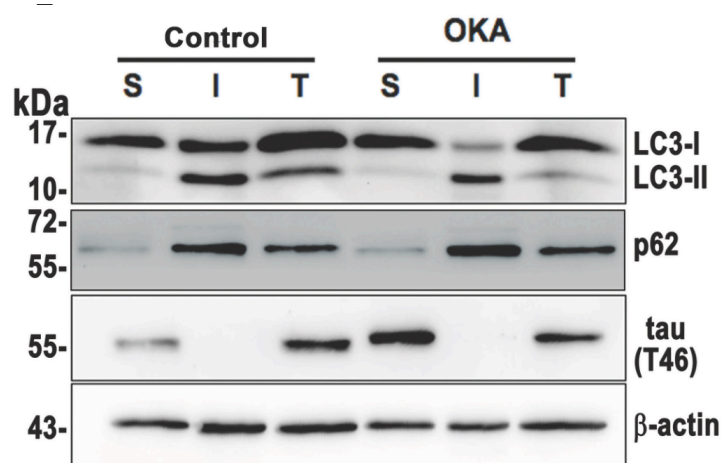


Figure 92 : Détection de LC3, p62 et tau dans les extraits protéiques issues de cellules exposées ou non à 25 nM d'OKA et séparés en une fraction soluble (S) et une fraction insoluble (I).
T : extraits totaux

cytoplasmique diffus en immunofluorescence), ou liée aux microtubules directement ou au sein d'un complexe avec les protéines MAP1. Il est notoire que l'interaction des MAP avec les microtubules et par conséquent leur fonction est régulée par phosphorylation. Dans les neurones, l'inhibition de la PP2A cause une hyperphosphorylation de la protéine tau qui est alors dans l'impossibilité de s'associer au

cytosquelette microtubulaire (Rametti et al., 2004). Ceci explique l'augmentation du signal correspondant à tau dans les extraits issus de cellules traités à l'OKA et correspondant à la fraction

soluble (figure 92). Il en résulte une déstabilisation microtubulaire confirmée par la détection de la β -III-tubuline, spécifique des cellules neuronales en immunofluorescence (figure 93).

Compte tenu de la hausse du marquage LC3 cytoplasmique en cas d'exposition des cellules à l'OKA (figure 93), nous nous sommes alors demandé si PP2A pouvait altérer l'association de LC3 avec les microtubules et plus généralement si cela pouvait entraîner des modifications dans la distribution cellulaire de LC3 (fraction soluble *versus* fraction liée). De manière concordante avec des données présentées par Xie et al., en 2011 (Xie et al., 2011), dans les cultures contrôles (conditions basale, milieu conditionné), la détection de LC3 en western-blot (figure 92) montre que LC3-I est à la fois détectée dans les fractions solubles et insolubles au Triton-X100 alors que la forme LC3-II est principalement détectée dans les extraits protéiques correspondant à la fraction insoluble. Le traitement des cultures primaires de neurones corticaux par 25 nM d'OKA provoque un fort accroissement de l'immuno-détection de la forme LC3-I dans la fraction soluble au Triton X-100.

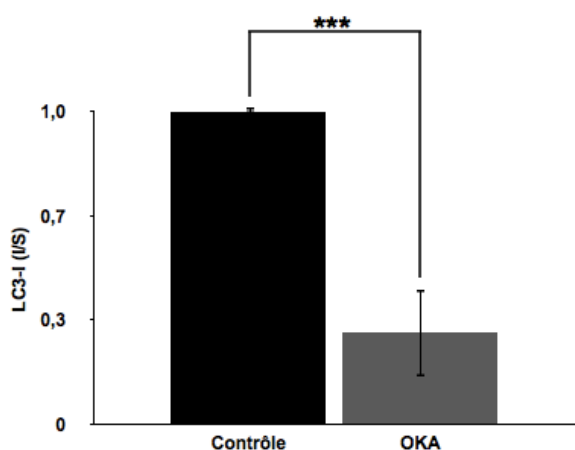


Figure 93 : Effet de 25 nM d'OKA sur la répartition de LC3-I entre fractions soluble (S) et insoluble (I) dans le Triton-X-100.

Afin d'établir une comparaison de la distribution des sous-populations de LC3-I entre les fractions solubles (S) et insolubles (I) dans le Triton X-100, nous avons calculé - à partir de la quantification par densitométrie du signal correspondant à LC3-I - le rapport LC3-I dans la fraction insoluble sur le signal relatif à LC3-I dans la fraction soluble (I/S) (figure 93). Suite au traitement des cellules à l'OKA, nous assistons à une augmentation de la présence de LC3-I dans la fraction cytoplasmique libre, parallèle à sa disparition de la fraction

insoluble au Triton X-100 (figures 92 et 94) et qui se traduit par une diminution statistiquement significative du rapport I/S/

III. INFLUENCE DE LA RAPAMYCINE SUR LA DISTRIBUTION DE LC3-I

Quelle est la nature des mécanismes qui conditionnent la distribution de LC3 ? S'agit-il de la conséquence d'une déstabilisation du cytosquelette et/ou de l'inhibition de l'autophagie par l'OKA ? Afin de déterminer si cette redistribution est dépendante de la mise en route de l'autophagie, les cellules ont été pré-traitées par 250 nM de rapamycine pendant 18 heures au bout desquelles 25 nM d'OKA sont ou non ajoutés pour 6 heures supplémentaires.

Quand l'autophagie est induite par 250 nM de rapamycine (figure 94), la détection de LC3-I et de LC3-II sont augmentées pour les extraits protéiques correspondant à la fraction insoluble dans

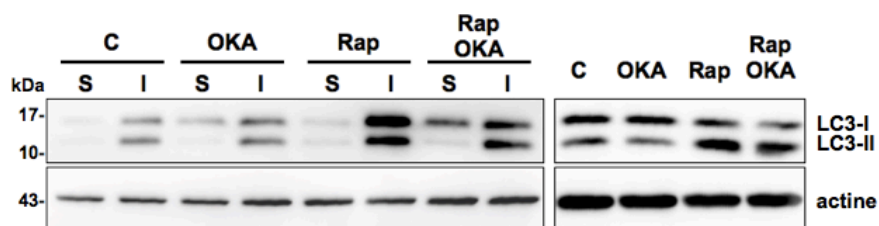


Figure 94 : Effet de la rapamycine sur la répartition de LC3-I entre les fractions soluble et insoluble au Triton X-100 en présence ou non de 25 nM d'OKA. Les western-blot de droite ont été réalisés avec les extraits totaux. C : contrôle ; Rap : rapamycine 250 nM.

le Triton X-100. Néanmoins, le rapport I/S relatif à LC3-I demeure inchangé en comparaison avec les extraits provenant des cellules contrôles (figure 95). Ce rapport ne rend donc pas compte des variations de niveaux protéiques mais de leur présence dans l'une ou l'autre des fractions.

Lorsque 25 nM d'OKA sont ajoutés à des cultures pré-traitées par la rapamycine, le profil de répartition de LC3-I est très proche de celui obtenu pour des cellules uniquement exposées à l'OKA. Il en résulte que la sous-population de LC3-I détectée dans la fraction insoluble dans le Triton X-100 pourrait être liée à une activité autophagique fonctionnelle, par conséquent, lorsque l'activité autophagique est augmentée, la proportion de LC3-I dans cette fraction serait également élevée. Il serait alors probable que la portion de LC3-I retrouvée dans la fraction insoluble soit associée

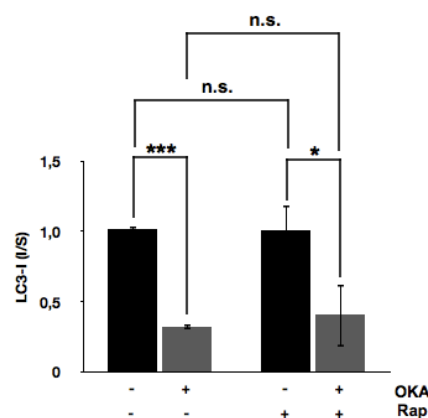


Figure 95 : Influence de 250 nM de rapamycine sur la distribution de LC3-I entre les fractions soluble (S) et insoluble (I) dans le Triton X-100 (valeur normalisée par rapport au contrôle). Analyse statistique : test T de Student, n.s. : non significatif ; * : $p < 0,05$; *** : $p < 0,001$

aux microtubules et que sa redistribution dans vers la fraction soluble de LC3-I soit due à une désorganisation des microtubules. Les protéines associées aux microtubules sont, dans la majorité des cas, régulées par phosphorylation. Par conséquent, l'inhibition de la PP2A par l'OKA pourrait affecter l'autophagie à différents niveaux. D'une part au niveau des voies de régulation en affectant l'état de phosphorylation des différentes kinases impliquées dans ces voies et/ou en agissant sur la stabilité du cytosquelette de microtubules directement ou à travers l'inhibition de la déphosphorylation de facteurs impliqués dans leur régulation voire directement celle de LC3 qui est une phospho-protéine (Cherra et al., 2010)

L'analyse des extraits protéiques issus du fractionnement cellulaire montre que l'incubation des neurones en culture à 25 nM d'OKA provoque une hausse de la détection de LC3-I dans la fraction soluble. Afin de vérifier si le changement de localisation de LC3-I est directement dû à des modifications de la stabilisation du cytosquelette ou si les effets de l'OKA s'exercent d'une manière différente, nous avons traité des cultures primaires neuronales avec du taxol, un agent stabilisateur des microtubules extrait de l'if (*Taxus brevifolia*) ou la vinblastine, qui présente, à l'opposé, un effet désorganisateur, le tout en présence ou non d'OKA.

IV. EFFETS DE LA RAPAMYCINE SUR LES NIVEAUX DE PHOSPHORYLATION DE TAU

La MAP tau joue un rôle important dans la stabilisation du cytosquelette à travers sa liaison à la tubuline, dépendante de son état de phosphorylation. Certaines substances qui modulent l'état de phosphorylation de tau agissent également sur l'activité autophagique telles que le chlorure de lithium qui l'induit indépendamment de la voie mTOR (Sarkar et al., 2005) et inversent la phosphorylation de tau provoquée par l'OKA (Martin et al., 2011b). C'est également le cas de la metformine qui est liée à la déphosphorylation de tau, indépendamment de son effet sur l'AMPK, au niveau de sites dépendants de la PP2A (Kickstein et al., 2010).

Compte-tenu du rôle de tau dans la stabilisation des microtubules et dans la régulation du transport axonal d'une part et de l'implication des microtubules dans la régulation de l'autophagie d'autre part, nous nous sommes demandés si le blocage de l'autophagie suite à l'inhibition de la PP2A pouvait ou non être lié au taux de phosphorylation de tau.

Dans un premier temps, nous avons analysé en western-blot l'effet de la combinaison de lithium et d'OKA sur les marqueurs autophagiques LC3 et p62. Parallèlement, nous avons vérifié les modifications de l'état de phosphorylation de tau suite à l'application de ces substances (figure 96).

L'exposition des cellules à 10 mM de chlorure de lithium (LiCl) pendant 6 h, en conditions basales, diminue significativement le rapport LC3-II/LC3-I dans les cultures primaires corticales ($1,0$ contre $0,8 \pm 0,15$; $p < 0,05$). La rapamycine à 250 nM (24 h), induit fortement l'autophagie (voir plus haut) et ceci est reflété par l'élévation du rapport LC3-II/LC3-I (figure 97). Lorsque les cellules sont pré-traitées à la rapamycine, l'ajout d'OKA provoque une réduction du rapport LC3-II/LC3-I. Ce rapport ne diffère significativement pas lorsque le LiCl et l'OKA sont utilisés. L'OKA ne potentialise donc pas la diminution du rapport causée par le

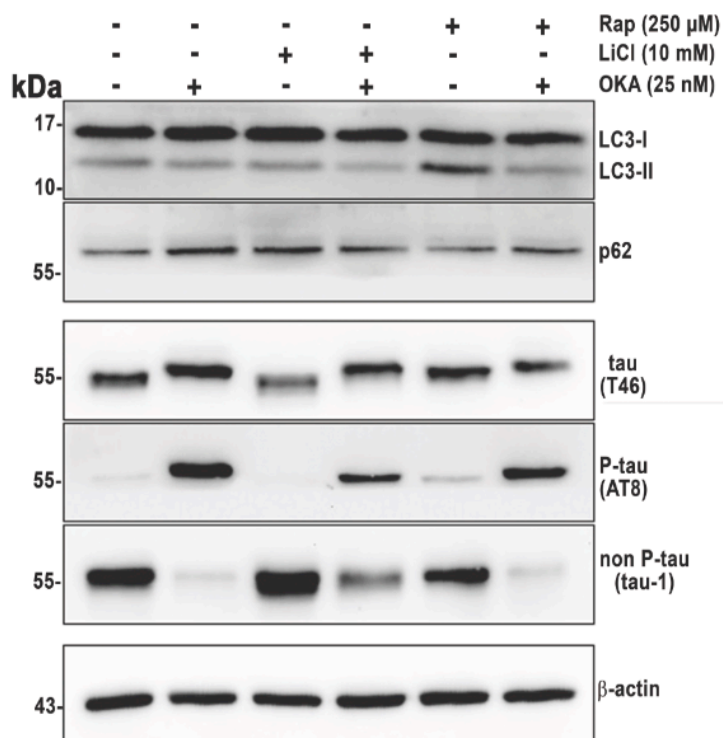


Figure 96 : Analyse de la phosphorylation de tau en présence de LiCl ou de rapamycine associées ou non à 25 nM d'OKA. Tau global a été détectée à l'aide de l'anticorps T46, tau phosphorylée d'AT-8 et tau déphosphorylée de tau-1.

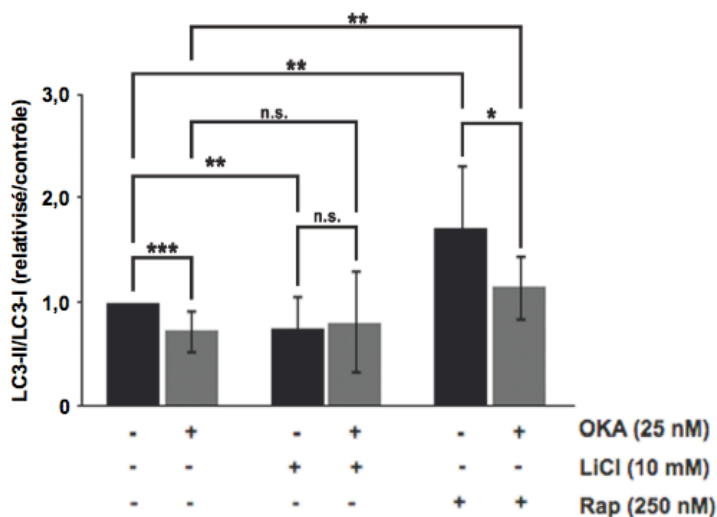


Figure 97 : Analyse semi-quantitative de la conversion de LC3-II en LC3-I suite à l'exposition de cultures primaires corticales à 25 nM d'OKA associés ou non à 10 mM de LiCl ou 250 nM de rapamycine. Analyse statistique : test T de Student, $n=3$. n.s. : non-significatif ; * : $p > 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

LiCl. Le lithium est décrit comme une substance inductrice de l'autophagie dans les cellules de la lignée COS-7 (Sarkar et al., 2005) et de la lignée Neuro-2a (Heiseke et al., 2009). Pour expliquer l'effet observé ici, nous avons donc exposé les cultures primaires corticales au lithium en présence ou en absence d'inhibiteurs du flux autophagique (20 μ M de leupeptine et de pepstatine) (figure 98). Il n'y a pas de variation de la

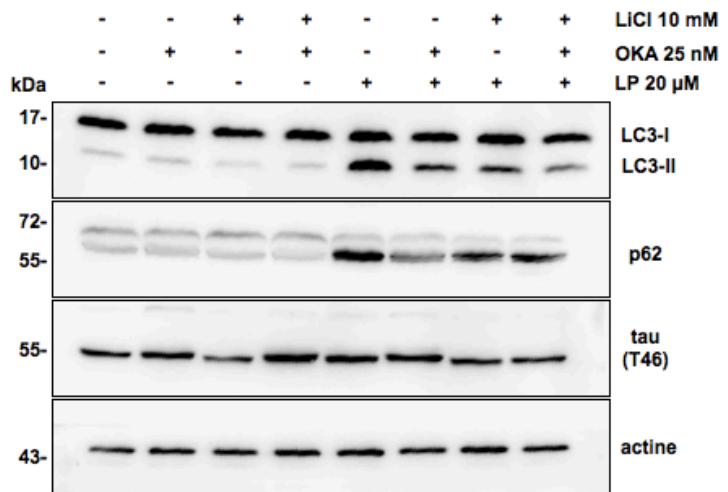


Figure 98 : Analyse en western-blot de l'effet du LiCl sur l'autophagie en présence d'inhibiteurs du flux (leupeptine et pepstatine à 20 μ M ; LP)

détection de LC3-II en comparaison avec les cellules uniquement exposées à ces inhibiteurs lysosomaux suggérant que le lithium agit en tant qu'accélérateur du processus autophagique mais pas en tant qu'inducteur dans nos conditions d'expérimentation. Des expériences complémentaires sont nécessaires car ici, les cellules ont préalablement incubées avec la leupeptine et la pepstatine avant l'ajout du lithium. Il serait intéressant d'incuber les cellules dans un premier temps avec le lithium avant de bloquer le flux et de comparer l'ensemble de ces résultats avec des conditions pour lesquelles l'autophagie a été induite de manière certaine (rapamycine).

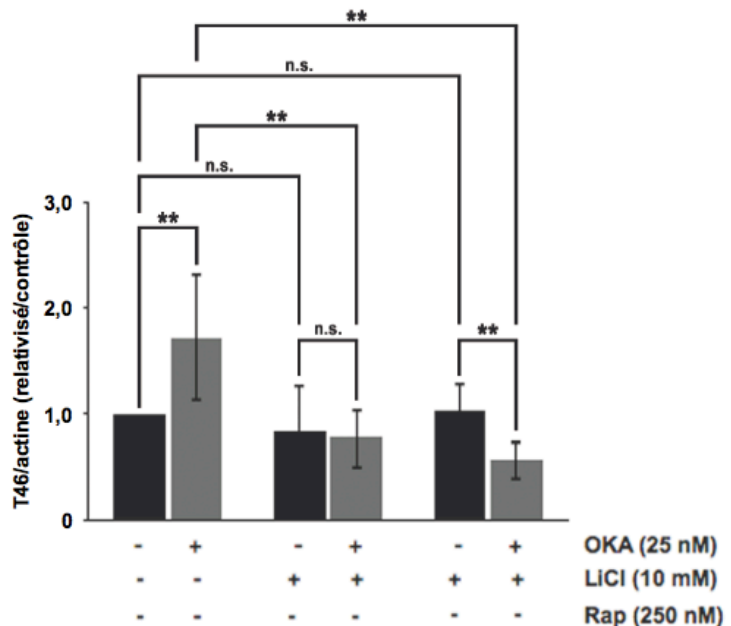


Figure 99 : Modulation des niveaux totaux de tau suite à l'exposition de cultures primaires corticales à 25 nM d'OKA associés ou non à 10 mM de LiCl ou 250 nM de rapamycine

Analyse statistique : test T de Student, n=4.

n.s. : non-significatif ; * : $p > 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

Concernant les niveaux et l'état de phosphorylation de tau, les niveaux totaux ont été détectés à l'aide de l'anticorps T46 (dont

l'épitope se situe au niveau de l'extrémité carboxy-terminale) alors que tau-1 nous permet de détecter une forme déphosphorylée au niveau des sites S198, S199 et S202. A l'inverse, l'anticorps

« complémentaire » AT8 reconnaît la protéine tau lorsqu'elle est phosphorylée au niveau des sites S199 et T205. Ces sites sont régulés par la GSK3 β et PP2A (figure 99).

Le lithium, inhibiteur de GSK3 β , comme déjà montré auparavant (Rametti et al., 2008; Martin et al., 2011b), induit la déphosphorylation de tau, reflétée par l'augmentation du signal tau-1 en western-blot (tau-1 sur tau global, détecté par T46 ; 1,0 contre $2,1 \pm 0,7$; $p < 0,01$, respectivement pour le contrôle et LiCl, en unités arbitraires) (figure 100). Le lithium limite les effets de l'OKA sur l'élévation du taux de phosphorylation de tau par rapport à l'OKA seul. Ceci est confirmé par la diminution significative du signal correspondant à la détection de tau par AT8 (OKA vs. Li/OKA : $22,4 \pm 4,9$ vs. $11,8 \pm 6,9$; $p < 0,01$).

La rapamycine n'agit pas sur les niveaux totaux de tau révélés par l'anticorps T46 ($1,0$ contre $1,0 \pm 0,3$; $p = 0,4125$, contrôle vs. rapamycine 250 nM, respectivement, $n = 4$) (figure 99). Néanmoins, lorsque 25 nM d'OKA sont rajoutés pour 6 h de plus après 18 h d'exposition à la rapamycine, cette substance empêche l'élévation des niveaux de tau provoqués par l'OKA ($1,7 \pm 0,6$ contre $0,6 \pm 0,3$, $p < 0,01$, pour

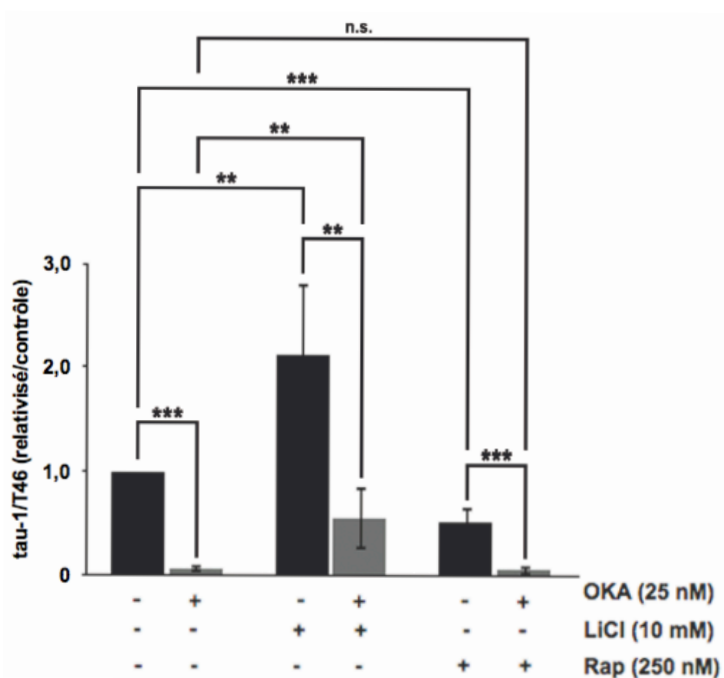


Figure 100 : Déphosphorylation de tau (rapport tau-1/ T46) suite à l'exposition de cultures primaires corticales à 25 nM d'OKA associés ou non à 10 mM de LiCl ou 250 nM de rapamycine
Analyse statistique : test T de Student, $n = 4$.
n.s. : non-significatif ; * : $p > 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

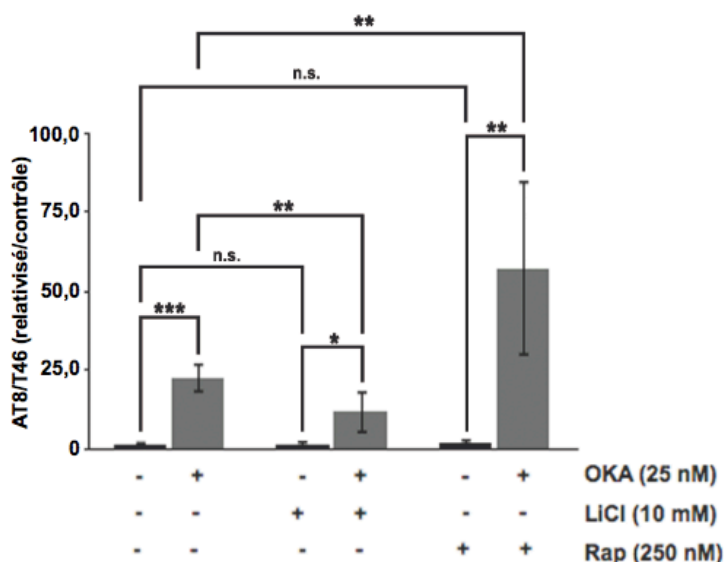


Figure 101 : Effet de l'exposition de cultures primaires corticales à 25 nM d'OKA associés ou non à 10 mM de LiCl ou 250 nM de rapamycine sur la détection du signal lié à AT8 (AT8/T46)
Analyse statistique : test T de Student, $n = 4$.
n.s. : non-significatif ; * : $p > 0,05$; ** : $p < 0,01$; *** : $p < 0,001$.

respectivement, les cellules traitées à l'OKA et les cellules pré-exposées à la rapamycine avant l'ajout d'OKA ; [figure 100](#)). De manière surprenante, la rapamycine seule cause une diminution significative de l'immuno-réactivité de l'anticorps tau-1 ($1,0$ contre $0,5 \pm 0,2$; $p < 0,001$; contrôle vs. rapamycine 250 nM). En parallèle, la rapamycine provoque une élévation non significative du signal correspondant à AT-8 ($1,0$ contre $1,5 \pm 1,4$; contrôle vs. rapamycine, $p = 0,2414$) ([figure 101](#)). Cependant, cette non significativité peut être due au fait que le signal détectable dans les conditions contrôle est trop faible pour pouvoir être reflété par une analyse semi-quantitative. Quand les cellules sont exposées à l'OKA pour 6 h, le taux de phosphorylation de tau au niveau des sites reconnus par AT-8 est potentialisé (AT-8 sur T46, $1,0$ contre $57,2 \pm 27,8$; $p < 0,05$; contrôle vs. R/OKA) ([figure 101](#)). L'analyse de l'immuno-réactivité tau-1 ne montre pas quant à elle de différence significative (tau-1 sur T46 : $0,1 \pm 0,03$ vs. $0,1 \pm 0,05$), peut-être pour les mêmes raisons que précédemment, c'est-à-dire un signal trop faible pour que l'analyse semi-quantitative soit pertinente dans ce cas ([figure 100](#)).

Ce qu'il ressort de cette dernière expérimentation est d'une part que le lithium ne semble pas induire l'autophagie dans nos conditions mais plutôt faciliter son accomplissement. D'autre part, la rapamycine a un effet surprenant sur la protéine tau. En effet, bien que seule, elle n'induit pas de modifications des niveaux globaux de tau, elle présente un effet sur sa phosphorylation au niveau de sites considérés comme pouvant être liés aux conditions pathologiques.

Lorsqu'elle est associée à l'OKA, inhibiteur de la PP2A, la phosphorylation de tau au niveau des sites reconnus par AT8 semble être accrue. Ce qui soulève la question suivante : comment la rapamycine agit-elle sur la phosphorylation de

tau ? Cette molécule agirait positivement sur l'activité de la PP2A en supprimant celle de mTOR (Park et al., 2008). Mais la suppression de l'activation de la voie mTOR lèverait l'inhibition de la voie Akt sur GSK3 β (par rétrocontrôle positif), conduisant à la phosphorylation inhibitrice de

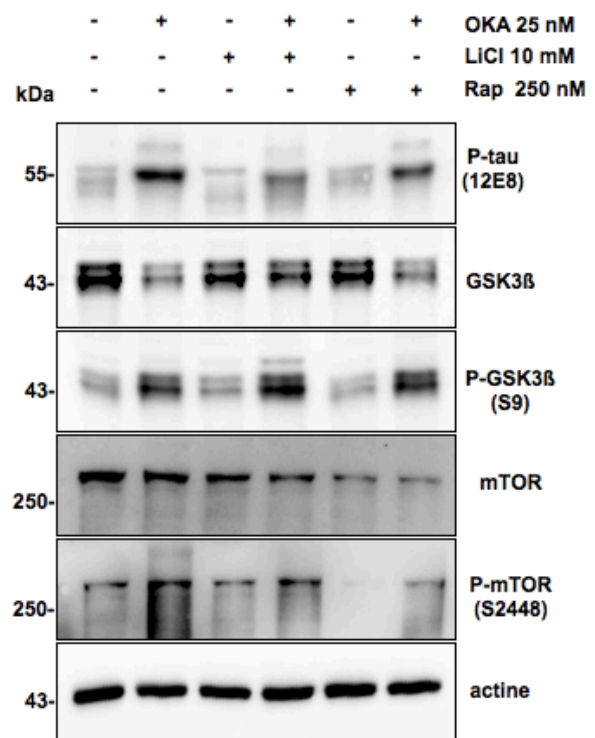


Figure 102 : Analyse par western-blot des effets du lithium et de la rapamycine sur les niveaux de phosphorylation de GSK3 β et de mTOR en présence ou non de 25 nM d'OKA

GSK3 β au niveau de S9, substrat de la PP2A *in vitro* (Sutherland et al., 1993) et dans les cellules SH-SY5Y (Lee et al., 2005) (figure 103).

L'effet inhibiteur de la rapamycine sur mTOR est confirmé par la diminution de sa phosphorylation en S2448 (figure 102). L'analyse de l'état de phosphorylation de GSK3 β montre que la rapamycine semble réduire le taux de phosphorylation au niveau du site S9 de GSK3 β , ce qui est en accord avec des données de la littérature (Meske et al., 2008). Par conséquent, l'élévation de la phosphorylation de tau au niveau des sites reconnus par AT8, régulés par

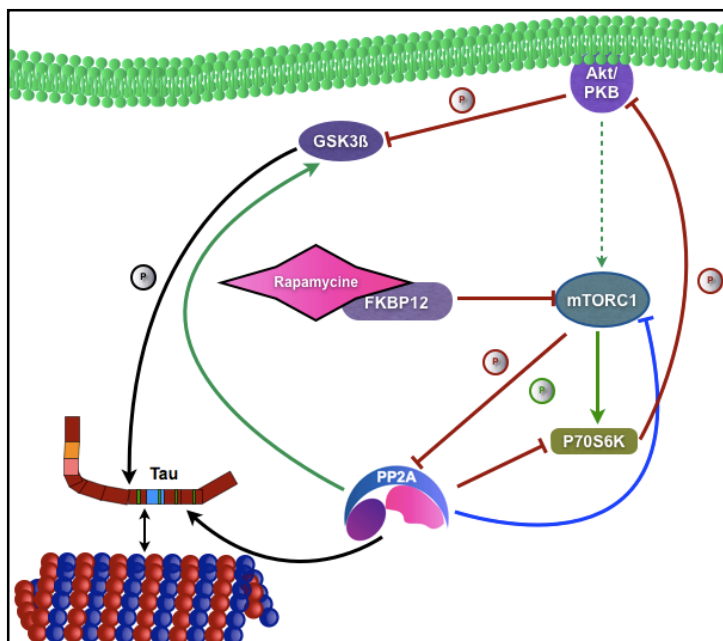


Figure 103 : Interconnexions entre les voies mTOR, GSK3 β , PP2A. Implications pour la phosphorylation de la protéine tau

GSK3 β et PP2A, signifieraient que l'activité de la GSK3 β pourrait primer sur celle de la PP2A dans ces conditions. Néanmoins, la rapamycine n'a pas, à notre connaissance, été impliquée dans l'augmentation de la phosphorylation de tau (Kickstein et al., 2010; Meske et al., 2008).

La phosphorylation de tau au niveau du site 12E8 (qui reconnaît la protéine tau lorsqu'elle est phosphorylée en S262 et S356) est sous la dépendance directe de la PP2A. Le site S262 est phosphorylé par la protéine kinase MARK2 (*Microtubule-Affinity-Regulating Kinase 2*) qui est le substrat direct de la GSK3 β (Kosuga et al., 2005). Donc indirectement, l'activation de la GSK3 β pourrait conduire à la phosphorylation de ce site. Les premiers résultats montrent que la rapamycine semble protéger ce site contre une augmentation de la phosphorylation provoquée par l'inhibition de la PP2A par l'OKA (figure 102). Ceci suggère qu'ici, l'activité de la PP2A est en partie conservée grâce à l'action de la rapamycine.

En conclusion de cette dernière partie, nous montrons que l'inhibition de la PP2A (pharmacologique ou par shRNA) bloque l'autophagie à des stades précoces en amont de la maturation autophagosomale. L'autophagie induite par des stress divers pouvant compromettre l'intégrité du protéome a été opposée à l'autophagie constitutive avec une fonction plus « préventive » dans le cadre du maintien de l'homéostasie cellulaire (Komatsu et al., 2007a). Ce

paramètre est crucial pour les cellules sorties du cycle cellulaire telles que les neurones. Dans le cadre de notre étude, l'inhibition de la PP2A altère non seulement l'autophagie basale mais aussi l'autophagie induite par des stress comme la privation de nutriments (sérum, glucose) directe, l'exposition des cellules à la rapamycine, l'induction d'un stress du RE par la tunicamycine ou encore l'inhibition du protéasome provoquée par MG132. Ces données impliquent que l'action de la PP2A s'exerce sur un événement commun aux deux versants de l'autophagie.

La suppression de l'activité de la PP2A conduit à l'activation de la voie mTOR qui régule négativement cette voie catabolique. Elle résulte également en l'accumulation intraneuronale d'inclusions positives pour p62 et l'ubiquitine, ce qui est probablement une conséquence de l'inhibition de l'autophagie. Ces données concordent avec les travaux de Hara et al., et de Komatsu et al., publiés en 2006, précédemment cités et qui montrent que la suppression de l'autophagie dans le SNC de souris provoque l'accumulation de ce types d'inclusions positives pour p62 et l'ubiquitine (Hara et al., 2006; Komatsu et al., 2006a).

Nos résultats montrent en outre l'existence de liens entre la diminution de l'activité de la PP2A, l'inhibition de l'autophagie et l'accumulation protéique. Ces résultats peuvent être rapportés au niveau des pathologies humaines, en particulier à la maladie d'Alzheimer au cours de laquelle l'activité de la PP2A est réduite de près de 50%. Le processus autophagique est considérablement altéré et des inclusions de protéines ubiquitinyllées sont retrouvées dans les neurones de patients atteints par cette pathologie (Babu et al., 2005; Komatsu et Ichimura, 2010; Kuusisto et al., 2008; Wooten et al., 2006).

L'activité de la PP2A est stimulée par la rapamycine à travers l'inhibition de mTOR (Park et al., 2008). Jusqu'à présent, la PP2A était considérée comme ayant une activité permissive sur l'autophagie mais aucune donnée, à notre connaissance, ne l'impliquait directement dans les voies de signalisations autophagiques mammaliennes. Dans notre étude, l'utilisation de la rapamycine ne suffit cependant pas à inverser la diminution de l'activité autophagique causée par l'OKA indiquant que la rapamycine et l'OKA agiraient de façon non compétitive sur la voie mTOR ; la première substance inhibant directement mTOR *via* son interaction avec FKBP12, la seconde en levant une rétro-inhibition *via* la suppression de la PP2A. Une autre possibilité est que la PP2A puisse agir en aval de mTOR au cours du processus autophagique et l'inhibition de la PP2A constituerait une sorte de mécanisme de rétroaction positif sur mTOR (figure 104, 1-). Cette dernière hypothèse est soutenue par les travaux de Liu et al., montrant que des perturbations de l'axe PP2A/MID1 affectent

la signalisation mTOR (Liu et al., 2011b). Des niveaux accrus de la PP2A causés par une inhibition du SUP conduisent à la dissociation du complexe mTOR/Raptor. Au sujet de l'activation de l'AMPK suite à l'exposition des cellules par l'OKA, il existe trois explications possibles : l'AMPK régulerait négativement l'autophagie dans les neurones, l'activation de mTOR serait prioritaire sur l'AMPK dans la mesure où ces deux protéines sont les substrats directs de PP2A, enfin, l'activation de mTOR est trop robuste en comparaison avec l'activation de l'AMPK et donc s'imposerait sur la régulation de l'autophagie (figure 104, 1-).

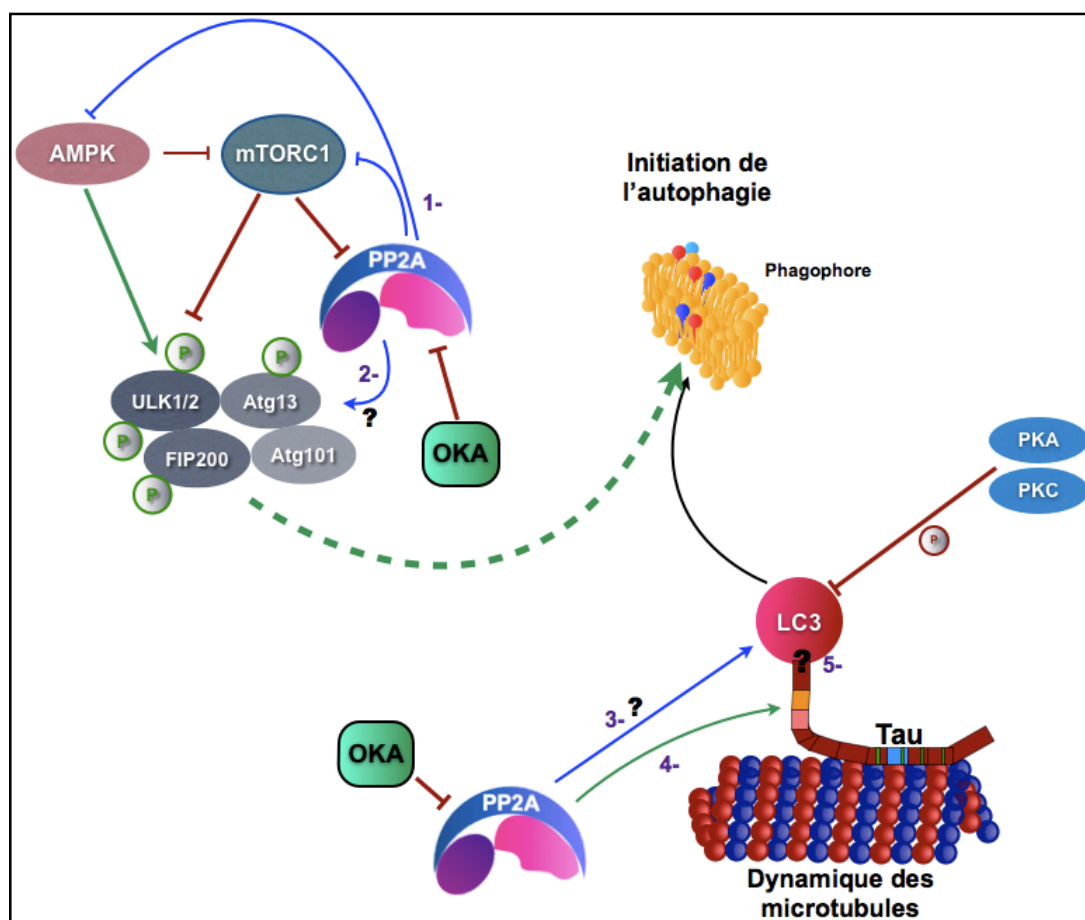


Figure 104 : Régulation de l'autophagie par PP2A et effets de l'OKA: hypothèses

1- Suite à l'inhibition de PP2A par l'OKA, nous assistons à une activation de mTOR et de l'AMPK. L'OKA lèverait donc une boucle de régulation négative de la PP2A sur mTOR. AMPK est activée suite à l'inhibition de la PP2A par l'OKA, mais la signification de cette activation doit être identifiée.

2- Des phosphoprotéines importantes pour l'initiation de l'autophagie comme celles du complexe ULK/mAtg13/FIP200/Atg101 placées en aval de la régulation mTOR pourraient constituer les substrats de PP2A. Ainsi, l'inhibition de la PP2A par l'OKA empêche le retrait des phosphorylations inhibitrices pour ce complexe.

3- LC3, substrat de la PKA et de la PKC est elle-même régulée négativement par phosphorylation. La levée de cette inhibition pourrait être due à l'action de la PP2A.

4- PP2A régule la dynamique des microtubules en déphosphorylant des MAP telles que la protéine tau. L'OKA pourrait inhiber indirectement l'autophagie en provoquant une désorganisation des microtubules structure importante pour le processus autophagique.

5- Des résultats préliminaires par co-immunoprécipitation obtenus au laboratoire montrent que LC3 et tau peuvent être associées dans les neurones. Il est possible qu'une telle interaction soit régulée par phosphorylation et influe sur la conduite de l'autophagie.

Il est notoire que l'inhibition de la PP2A par l'OKA induit la neurodégénérescence à la fois *in vitro* et *in vivo*. L'induction de l'autophagie (dans la majorité des cas par la rapamycine) est neuroprotectrice dans un certain nombre de modèles (Ravikumar et al., 2004; 2006; Berger et al., 2006; Young et La Spada, 2009). Néanmoins, il demeure à préciser si l'inhibition de l'autophagie par la suppression de l'activité de la PP2A est la cause ou non de la formation des inclusions et de la perte neuronale. Dans notre modèle, l'action de la rapamycine n'est pas suffisante pour empêcher la survenue de l'apoptose liée à l'OKA ce qui suggère que PP2A agisse en aval de mTOR. Il serait intéressant alors d'envisager l'utilisation d'inducteurs de l'autophagie dont le mécanisme d'action est indépendant de mTOR.

Une implication de la PP2A, indépendamment de mTOR, dans la régulation de la phosphorylation de protéines importantes pour la conduite du processus autophagique doit aussi être considérée (figure 104, 2-). En ce sens, les phosphorylations de LC3 par la PKC (Jiang et al., 2010) ou par la PKA (Cherra et al., 2010) sont inhibitrices. Puisque la PP2A est impliquée dans la déphosphorylation de nombreux substrats au sein de la cellule, il serait intéressant de déterminer si LC3 constitue l'un de des substrats de cette phosphatase majeure et en quelle mesure la phosphorylation de LC3 affecte l'autophagie neuronale dans notre modèle cellulaire. Par exemple si cette phosphorylation bloque la conjugaison de LC3 à la PE au cours de la formation du phagosphore (figure 104, 3-). Si c'est le cas, cela permettrait d'expliquer la diminution du taux de conversion de LC3-I en LC3-II et l'augmentation de la forme cytosolique de LC3 observée *in situ* lorsque l'activité de la PP2A est inhibée.

Une autre possibilité réside dans le fait que la phosphorylation de LC3 puisse potentiellement bloquer son interaction avec d'autres protéines et/ou avec les microtubules. En ce sens, le rôle de la PP2A dans la régulation de la phosphorylation de LC3 et l'impact de cette dernière sur l'autophagie doivent être étudiés (figure 104,4-).

Les microtubules sont impliqués à tous les niveaux du processus autophagique, depuis son initiation jusqu'aux étapes finales de fusion des vésicules autophagiques avec les lysosomes (Di Bartolomeo et al., 2010b; Köchl et al., 2006; Fass et al., 2006; Xie et al., 2010; Geeraert et al., 2010). Par ailleurs, les microtubules constituent un composant essentiel du cytosquelette neuronal maintenant la polarité de ces cellules à travers leur stabilisation par les MAP (Perez et al., 2009). Un accroissement de la phosphorylation des MAP (pouvant résulter de l'inactivation de la PP2A) empêche leur liaison aux microtubules et conduit à la déstabilisation du cytosquelette neuronal.

Dans les neurones, LC3-I est redistribué depuis les neurites vers le péricaryon et la biogenèse autophagosomale semble avoir principalement lieu au niveau du compartiment synaptique (Nixon, 2007). Il est alors possible qu'en conditions de déstabilisation du cytosquelette de microtubule dans les neurones, LC3-I s'accumule dans le cytosol, au niveau du *soma* et que la biogenèse autophagosomale soit ainsi indirectement bloquée. Il est important de vérifier ce point dans notre modèle cellulaire.

Le groupe de R. Nixon a montré que les cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer présentaient une accumulation importante de vésicules autophagiques immatures et plus particulièrement dans les neurites dystrophiques (Nixon et al., 2005). Il a donc été suggéré que cette accumulation massive résulterait d'un blocage du transport antérograde, dépendant des microtubules, prévenant ainsi la maturation autophagosomale et interférant avec la fonction neuroprotectrice de l'autophagie (Nixon et al., 2005). Dans notre modèle, plutôt qu'une accumulation de vésicules autophagiques, nous observons une diminution de leur nombre. Cependant, nos quantifications ont été réalisées dans le péricaryon du fait de la haute densité des cultures et de la présence d'un réseau neuritique hautement développé gênant la détection des autophagosomes dans les neurites, ce qui peut éventuellement fausser nos conclusions. Une autre hypothèse envisageable est que l'accumulation des autophagosomes observés dans les cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer soit la résultante d'une inhibition à long terme de l'autophagie. Ce fait est impossible à tester dans notre modèle *in vitro* puisque l'inactivation à long terme de la PP2A est fortement toxique pour les neurones en culture. Il est à noter enfin que l'OKA, couramment utilisé pour mimer certaines caractéristiques de la pathologie de tau au cours de la maladie d'Alzheimer se révèle aussi intéressant compte-tenu de son effet sur l'autophagie.

En conclusion, en dépit des nombreuses actions connues de la PP2A dans la signalisation cellulaire, les liens entre PP2A et régulation de l'autophagie restent flous. Cependant, nous montrons ici, qu'*in vitro*, la suppression de l'activité de la PP2A conduit à une inhibition de l'autophagie, associée à une perte neuronale et à la formation d'inclusions positives pour p62 et l'ubiquitine. Ceci met en évidence l'existence d'un lien entre la diminution de la quantité et de l'activité de PP2A observée au cours de la maladie d'Alzheimer avec la pathologie autophagique et la formation d'agrégats protéiques intraneuronaux.

Le travail présenté dans cette troisième partie a fait l'objet d'une présentation sous forme de poster à la 68th Harden conference qui s'est tenue à Cirencester (Angleterre) en septembre 2010.

Un manuscrit portant sur ces résultats a été soumis pour publication dans le journal *Neurobiology of Aging* en juillet 2010. Nous sommes actuellement en attente de la réponse des relecteurs.

Discussion générale, conclusions et perspectives

Les travaux réalisés au cours de cette thèse ont principalement porté sur la caractérisation de l'autophagie dans les cellules du SNC et sur les différences pouvant exister entre la conduite et la régulation de ce processus catabolique dans les neurones en comparaison avec d'autres types cellulaires du SNC. Ainsi, au cours de la première partie de ce travail, nous nous sommes attachés à comparer les niveaux d'activité autophagique dans les neurones dans les cultures corticales à d'autres types cellulaires présents dans ce modèle (cellules gliales).

Ainsi, la détection des vésicules autophagiques dans les neurones s'est avérée particulièrement difficile *in situ*. Ces organites sont retrouvées en plus grande quantité dans les cellules négatives pour la protéine tau, utilisée alors en tant que marqueur neuronal. Le pendant de ce test, utilisant la GFAP en tant que marqueur astrocytaire, révèle que les cellules gliales constituent la population cellulaire majoritaire en dehors des neurones dans notre modèle. Suite à l'induction de l'autophagie par la rapamycine, une élévation de la détection des marqueurs a été observée à la fois dans des cultures corticales primaires enrichies en neurones et dans des cultures enrichies en astrocytes. Cela permet, d'exclure la possibilité d'une déficience de la machinerie autophagique dans les neurones. A partir de là, plusieurs hypothèses en relation avec ces observations et avec les données de la littérature étaient possibles :

- l'autophagie basale neuronale est très faible, expliquant la difficulté à détecter les organites caractéristiques de ce processus (Mizushima et al., 2004; Yue et al., 2008) ;
- le flux autophagique serait plus efficace dans les neurones, ce qui implique un *turn-over* rapide du marqueur autophagosomal LC3 et donc une détection plus difficile de celui-ci (Boland et al., 2008).

La comparaison en western-blot des signaux détectés pour LC3 en conditions basales dans des cultures enrichies en neurones par rapport à des cultures enrichies en astrocytes confirme ces observations avec un niveau de détection de LC3-II plus faible dans les cultures neuronales. En outre, l'analyse semi-quantitative montre que dans les cultures enrichies en neurones, les niveaux autophagiques sont induits de façon plus importante par rapport à ce qui a été observé dans le cas des cultures enrichies en astrocytes. Donc les potentialités d'induction de l'autophagie pourraient être plus élevées dans les neurones. Cela peut s'expliquer par le fait que l'autophagie basale étant plus faible, la réponse des neurones à une induction de l'autophagie apparaît comme étant de plus grande amplitude. La signification de cette différence est sujette à caution compte-tenu du fait que les neurones et les astrocytes sont des cellules métaboliquement très différentes.

Suite à l'inhibition du flux autophagique, la détection significativement plus importante de LC3-II par rapport aux contrôles montre que le flux autophagique basal est effectivement efficace dans les cultures primaires enrichies en neurones. Cette observation nécessite cependant d'être complétée par l'utilisation des inhibiteurs de flux dans des cultures primaires enrichies en astrocytes en conditions basales et d'induction de l'autophagie.

Par ailleurs, l'autophagie est effectivement induite suite à l'exposition des cultures corticales primaires enrichies en neurones à la rapamycine. Il existe une différence de la détection de p62 en fonction des inhibiteurs lysosomaux utilisés, plus élevée dans les conditions traitées par la bafilomycine alors que les inhibiteurs des cathepsines sont plus efficaces sur l'élévation de LC3-II. Une interprétation possible serait que la bafilomycine agirait plus rapidement (et/ou plus efficacement) sur l'inhibition de la maturation autophagosomale en comparaison avec la combinaison de la leupeptine et de la pepstatine. Les neurones seraient particulièrement sensibles à ce type de défaillance, ce qui conduirait rapidement à la mort neuronale. Ceci pourrait expliquer la toxicité si importante de ce composé dans nos cultures. Par ailleurs, la bafilomycine ne bloque pas uniquement la maturation autophagosomale, mais agit aussi efficacement sur les voies endosomales (Klionsky et al., 2008), compartiment neuronal particulièrement important, s'ajoutant au stress dû au défaut de l'autophagie. En comparaison, la leupeptine et la pepstatine, n'agissent pas sur l'acidification vacuolaire mais uniquement sur la dégradation en inhibant les cathepsines impliquant une action plus tardive. En outre, les travaux portant sur le rôle des présénilines sur la maturation autophagique mettent en lumière l'importance de l'acidification des voies de maturation autophagiques, puisque la suppression de leur fonction va affecter l'adressage et la fonction subséquente des pompes à protons vacuolaires (Esselens et al., 2004; Lee et al., 2010a; Neely et al., 2011; Neely et Green, 2011). Les conséquences de cette suppression sont particulièrement délétères pour les neurones (Lee et al., 2011). Ces données sont importantes pour la compréhension des mécanismes de pathogenèse des PND et dans le cas de la maladie d'Alzheimer où, de façon intéressante, des mutations des présénilines sont impliquées dans la majorité des formes familiales. Ces constatations sont également informatives sur les raisons de la plus forte vulnérabilité des neurones aux stress. Cette caractéristique est certainement propre aux cellules post-mitotiques puisque des anomalies de l'autophagie dans les hépatocytes sont également à l'origine de la formation d'inclusions protéiques et d'une dégénérescence tissulaire (Komatsu et al., 2005b). De même que les tissus les plus souvent atteints chez les personnes porteuses de pathologies de surcharge lysosomales sont les tissus nerveux et musculaires (Eskelinen et al., 2002; Eskelinen,

2006). Cependant, les hépatocytes sont des cellules dont la fonction physiologique nécessite une activité autophagique élevée. Ce niveau basal relativement haut dans ces cellules pourrait permettre de ralentir les effets de l'âge dans le foie.

Les neurones étant dépendants des cellules gliales, il est possible qu'en conditions de stress, l'induction de l'autophagie ait lieu de façon primaire dans ces dernières. Les cellules gliales fourniraient ainsi les éléments nécessaires au maintien de l'homéostasie neuronale. Ceci expliquerait qu'il soit difficile *in vivo* d'induire l'autophagie dans les neurones par le jeûne. La participation des cellules gliales dans le maintien de l'homéostasie neuronale à travers l'induction de leur propre mécanisme d'autophagie peut être analysé *in vitro* par l'utilisation de cultures primaires corticales différentielles mettant en présence des astrocytes et des neurones provenant de souris de génotypes distincts (un type cellulaire compétent pour l'autophagie et l'autre non) et d'analyser la résistance des deux types cellulaires suite à l'induction de stress de natures diverses. Par ailleurs, *in vitro*, l'utilisation de souris GFP-LC3 constituerait un outil intéressant pour la comparaison des niveaux autophagiques entre les différents types cellulaires du SNC.

Une autre question importante nécessitant d'être résolue concerne la complémentarité entre autophagie spécifique, constitutive et autophagie adaptative. Est-ce que ces deux formes sont si distinctes que le déclin de la première avec l'âge puisse induire une sur-activation compensatoire de l'autre ? Est-ce que ces deux formes présentent la même efficacité dans les mécanismes de prise en charge des substrats ? En effet, si l'efficacité (en terme de sélectivité) de l'autophagie induite est moindre que celle de l'autophagie basale, ceci pourrait expliquer qu'en conditions pathologiques, une induction de l'autophagie trop importante soit délétère pour les cellules.

Enfin, il est à noter une l'élévation du taux de détection de tau en western-blot en présence de leupeptine et de pepstatine en conditions basales et lorsque les cellules ont été exposées à la rapamycine. Avec la bafilomycine, à l'inverse, le signal est beaucoup plus faible ce qui peut, dans ce cas s'expliquer par la toxicité de la substance pour les neurones, ce qui est particulièrement bien visible *in situ* en utilisant la technique d'immunofluorescence où l'on peut constater la perte de la majorité des neurones. L'augmentation de la présence de tau pourrait signifier que tau est constitutivement un substrat des voies de dégradation lysosomales. Tau présente en effet deux motifs pentapeptidiques de type KFERQ (Wang et al., 2009). De manière intéressante, la mutation de la séquence codant l'un de ces motifs est liée à une forme familiale de tauopathie (mutation P301L). Dans un modèle de lignée cellulaire, cette mutation perturbe profondément le

fonctionnement de la voie CMA, entraînant une induction compensatoire de la macroautophagie (Wang et al., 2010b; c).

En résumé, dans notre modèle cellulaire, l'activité autophagique constitutive neuronale est apparemment plus basse en comparaison avec d'autres types cellulaires du tissu cérébral, et le flux semble y être plutôt efficace, ce qui est en accord avec les données de la littérature (Boland et al., 2008).

L'autophagie est considérée comme étant un mécanisme neuroprotecteur fondamental. De nombreuses études mettent en avant cet aspect. En effet, l'induction de l'autophagie dans un grand nombre de modèles cellulaires et animaux de PND se montre bénéfique et ralentit la progression de la maladie (Berger et al., 2005; 2006; Ravikumar et al., 2002; Rideout et al., 2004; Williams et al., 2006). Par conséquent, l'identification de substances inductrices de l'autophagie dans les neurones dans le but d'élaborer des stratégies de neuroprotection est un point crucial. Dans ce but, nous avons étudié les effets de l'AmB (Fungizone®), une substance antifongique sur l'autophagie dans différents modèles cellulaires. L'AmB présentait l'avantage d'être déjà utilisée en thérapeutique animale et humaine et ses effets secondaires sont bien caractérisés. D'autre part, un analogue de cette molécule, la nystatine, a été montrée comme pouvant induire l'autophagie dans des fibroblastes murins et humains en culture (Cheng et al., 2006). Les résultats obtenus montrent qu'en effet, l'AmB est une substance inductrice d'autophagie dans la lignée cellulaire COS-7 sans en affecter la viabilité. Dans nos expérimentations, l'AmB a été utilisée à des concentrations comprises entre 0,5 et 1,5 µg/mL soit une gamme de concentration très proche de celle utilisée en culture cellulaire, en routine, pour prévenir les contaminations d'origine fongique (les doses alors utilisées variant entre 0,25 et 2,5 µg/mL en fonction des protocoles). Aussi, lorsque les cultures cellulaires sont destinées à l'étude du processus autophagique, l'utilisation de l'AmB devrait être évitée pour ne pas biaiser les résultats.

Dans les cultures primaires de neurones corticaux, les effets de l'AmB sur l'induction de la voie autophagique sont plus modérés, les seuls résultats significatifs étant obtenus en conditions d'inhibition du flux par la bafilomycine. Dans la première partie de notre travail, nous avons utilisé la rapamycine pour activer l'autophagie dans les cultures primaires corticales. Cette substance est couramment utilisée dans divers types cellulaires à cet effet soulignant « l'universalité » de son mode d'action. Dans le cas de l'amphotéricine B, cette différence d'effet entre les lignées cellulaires et les cultures neuronales met en évidence l'existence possible d'une divergence dans la régulation

autophagique dans les neurones. Par conséquent, il est nécessaire de déterminer les modalités de l'induction de l'autophagie en réponse à l'AmB. Nos résultats suggèrent que l'AmB pourrait agir sur l'autophagie en activant la voie de l'AMPK (ces résultats doivent cependant être répétés). Cependant, l'AmB conduit également à l'activation de la voie mTOR. Dans ce premier cas, les rôles distincts de ces voies et leur implication dans l'induction de l'autophagie peut être vérifiés en combinant des molécules agissant sur l'une ou l'autre de ces voies (les composés C, AICAR et phenformine pour étudier les rôles des voies de l'AMPK et la rapamycine pour l'analyse de l'implication de la voie mTOR). Ces études pourront être complétées en utilisant des outils moléculaires (si/shRNA).

L'AmB est une substance qui provoque une augmentation de la concentration cytosolique de calcium. Or cet ion a un rôle inducteur connu pour la voie autophagique. Son action peut être dépendante ou non de l'activation de l'AMPK (Høyer-Hansen et al., 2007; Grotemeier et al., 2010). Afin de tester cette hypothèse, l'association de chélateurs du calcium ou de substances telles que la thapsigargine avec l'AmB constituerait un moyen simple de vérifier cette hypothèse.

L'activité fongicide de l'AmB réside dans sa capacité à former des complexes avec le cholestérol membranaire conduisant ainsi à sa séquestration. Or certaines maladies de surcharge lysosomale (maladie de Niemann-Pick) et PND (maladie d'Alzheimer) sont associées à des dérégulations de l'homéostasie du cholestérol. Dans le cas de la maladie d'Alzheimer, alors que l'hypercholestérolémie est associé à une augmentation des risques de développer la pathologie (Pappolla et al., 2003), il a été montré que des substances (statines) utilisées pour lutter contre l'hyperlipidémie diminuaient les risques de survenue de démence (Jick et al., 2000). L'activité des enzymes responsables de la production de peptide A β , est dépendante du contenu en cholestérol des membranes (Wolozin, 2004). L'activité de la β -sécrétase BACE, localisée au niveau des rafts lipidiques où elle est active. L'augmentation de la concentration du cholestérol au niveau membranaire facilite la prise en charge de l'APP par BACE en permettant leur concentration au niveau des rafts (Cordy et al., 2003). D'autre part, les taux de présence de la protéine NPC1, impliquée dans le trafic intracellulaire du cholestérol est anormal dans le cortex frontal et la région CA1 de l'hippocampe dans les cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer. Cette anomalie, retrouvée dans les modèles murins APP et APP/PS1 conduit à une augmentation de la concentration du cholestérol membranaire lysosomal (Kågedal et al., 2010). Ceci est impliqué dans l'inhibition des processus de fusion membranaires du compartiment endo-lysosomal (Fraldi et al., 2010) et dans la perturbation de l'autophagie neuronale (Liao et al., 2007). De plus de hautes

concentrations membranaires de cholestérol sont associées à une plus grande toxicité du peptide A β (Abramov et al., 2011). Il serait donc intéressant d'étudier si des substances permettant de réguler les taux de cholestérol membranaire telles que les statines peuvent également avoir un effet sur l'autophagie et un effet protecteur pour les neurones envers des stress toxiques tels que l'exposition des cellules au peptide A β *in vitro* ou s'ils améliorent le phénotype de souris modèles de PND telles que les souris APP ou APP/PS1.

Enfin, un autre aspect à souligner concernant les travaux réalisés à partir de l'AmB serait de confirmer son effet inducteur sur la CMA. En effet, peu de substances sont connues pour induire cette voie catabolique spécifique dont le blocage est associé à la survenue de PND telles que la maladie de Parkinson et la maladie d'Alzheimer. Dans ce cas, le mode d'action le plus probable de la substance serait dû à sa capacité à séquestrer le cholestérol. La désorganisation des microdomaines membranaires riches en cholestérol en résultant empêchant le clivage et la dégradation de LAMP-2A. Cette hypothèse nécessite d'être vérifiée par des techniques d'imagerie basée sur le marquage de ces rafts lipidiques par la toxine cholérique B couplée à un fluorochrome.

Dans une troisième partie, nous avons mis en évidence que la PP2A, protéine phosphatase majeure dans le SNC et dont l'activité est réduite dans les cerveaux de patients atteints par la maladie d'Alzheimer fonctionnait dans la régulation de l'autophagie neuronale. L'inhibition pharmacologique de la PP2A par l'OKA ou la suppression de son activité en utilisant un shRNA ciblant sa sous-unité catalytique conduit à un blocage de l'autophagie associé à la formation d'inclusions intraneuronales positives pour p62 et l'ubiquitine et à une perte cellulaire comme en témoigne la toxicité de l'OKA. Ces inclusions peuvent d'autre part également être associées à la protéine tau. En ce sens des expériences de co-immunoprécipitation (données non présentées ici) montrent que les protéines tau et p62 peuvent être associées dans ces conditions.

L'inhibition de l'autophagie suite à l'inactivation de la PP2A a lieu en amont des étapes de maturation autophagosomale puisque la réduction de la lipidation de LC3 est également observée en conditions d'inhibition du flux autophagique. L'autophagie basale comme l'autophagie induite, quel que soit le stress inducteur (inhibition de mTOR, stress du RE et inhibition du protéasome) sont affectées, ce qui signifie que la régulation de l'autophagie par PP2A s'exerce sur un mécanisme commun à l'autophagie spécifique et à la forme adaptative (PP2A n'agirait donc pas sur la séquestration du substrat au sein des autophagosomes).

L'inhibition de la PP2A conduit à l'activation des voies mTOR et AMPK comme le prouvent les augmentations du taux de phosphorylation de ces deux kinases et celles de leurs substrats respectifs P70S6K et l'AMPK. Aussi plusieurs hypothèses ont été émises au sujet d'un rôle potentiel de la PP2A à ce niveau de la régulation autophagique.

Premièrement, PP2A a pour substrats (directs ou non) mTOR et l'AMPK. En conditions d'inhibition de la PP2A par l'OKA ou par suppression de l'expression de sa sous-unité catalytique par shRNA, l'activation de la voie mTOR en résultant serait prépondérante sur celle de l'AMPK. Un substrat commun à ces deux voies et indispensable pour l'induction de l'autophagie est ULK1. Il serait donc utile d'analyser son état d'activation après inhibition de la PP2A en présence ou non d'inhibiteurs de l'une ou l'autre voie (rapamycine, composé C). Une approche moléculaire serait également un outil intéressant dans ces conditions. D'autre part l'utilisation d'activateurs de l'AMPK permettrait d'identifier le rôle réel de cette kinase dans la signalisation autophagique neuronale. En ce sens une expérience préliminaire menée dans notre modèle cellulaire en utilisant deux concentrations d'AICAR (*Aminoimidazole Carboxamide Ribonucleotide*) : 1 et 3 mM pendant 6 et 72 h en présence ou non de 50 nM de bafilomycine (6 h uniquement compte-tenu de la toxicité de cette substance) conduit à une réduction de la détection de LC3-II associée à une élévation de p62 dans la condition 72 h (figure 103). Cet effet est associé à l'activation de l'AMPK reflétée par une hausse du signal correspondant aux formes phosphorylées de l'AMPK et de l'ACC suggérant que l'AICAR inhiberait l'autophagie.

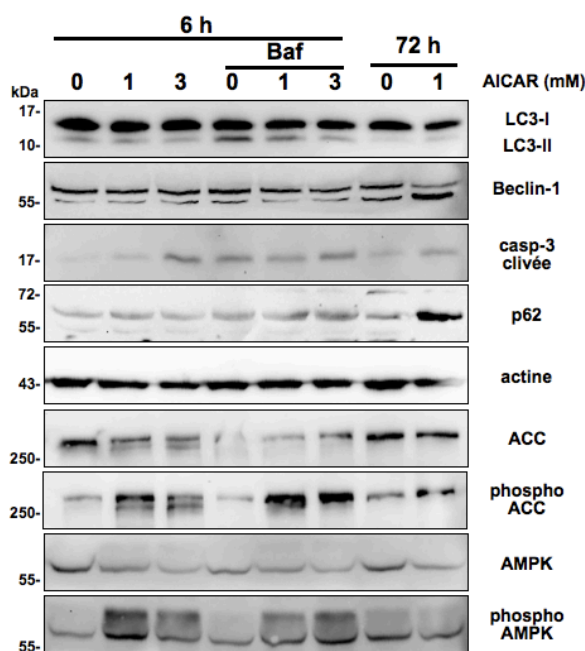


Figure 105 : Effet de l'inducteur de l'AMPK, AICAR, à 1 et 3 mM sur les marqueurs de l'autophagie dans des cultures primaires neuronales enrichies en neurones

Jusqu'à aujourd'hui l'activité de la PP2A était considérée comme permissive pour l'autophagie. Chez la levure, l'association de la PP2A à Tap42 est inhibitrice pour l'autophagie (Yorimitsu et al., 2009). Chez les mammifères, l'homologue de Tap42, $\alpha 4$ s'associe à PP2AC et constitue une sous-unité régulatrice non-canonique de la PP2A. $\alpha 4$ permet l'interaction du pool de la PP2AC lié aux microtubules d'interagir avec l'ubiquitine ligase MID1 et de permettre sa dégradation. Il a été récemment montré que des perturbations de la voie PP2A/MID1 affectait la signalisation liée à

mTOR : la mutation de MID1 provoque une élévation des niveaux de la PP2A et il s'en suit une dissociation du complexe mTOR/raptor (Liu et al., 2011b). La rapamycine, inhibiteur de mTOR et inducteur puissant de l'autophagie provoque la dissociation de la PP2A d'avec $\alpha 4$ (Kickstein et al., 2010) (figure 104, 1-).

Ensuite, PP2A, qui a de nombreux substrats, pourrait également déphosphoryler des protéines indispensables pour la signalisation et le déclenchement autophagiques, en aval des voies mTOR et AMPK (ULK1, mAtg13,...) (figure 104, 2-).

Dans ce contexte, il est intéressant de noter que la protéine MAP-LC3, indispensable au processus d'expansion du phagophore peut être phosphorylée au niveau de deux sites, dont l'un, en S12 est le substrat de la PKC. Cette phosphorylation est inhibitrice pour l'autophagie (Cherra et al., 2010). Par conséquent si LC3 est le substrat de la PP2A, l'inhibition de cette phosphatase conduirait au maintien de LC3 sous une forme phosphorylée inhibitrice et si c'est le cas, comment se traduit l'effet de cette phosphorylation ? Cette phosphorylation pourrait empêcher la conjugaison de LC3 en jouant sur l'association ou la dissociation de cette protéine d'avec d'autres facteurs protéiques. PP2A peut aussi avoir pour substrats ces facteurs d'interactions et intervenir ainsi indirectement sur LC3 (figure 104, 3-).

LC3 appartient à la famille des MAP et peut s'associer aux microtubules. Les MAP régulent la stabilité de ces éléments du cytosquelette, jouant ainsi un rôle essentiel dans l'homéostasie neuronale en permettant le maintien de la polarité de ces cellules et l'existence de mécanismes de transport efficaces. L'interaction des MAP avec les microtubules est régulée par phosphorylation. La protéine MAP tau joue un rôle important dans la régulation de la stabilité neuronale. En cas d'inactivation de la PP2A tau est hyperphosphorylée et les microtubules sont désorganisés. Or les microtubules sont essentiels pour l'accomplissement de l'autophagie puisqu'ils ont été impliqués aussi bien dans les processus de signalisation, qu'au cours de la maturation autophagosomale (processus de transport et de fusion) (Fass et al., 2006; Köchl et al., 2006; Di Bartolomeo et al., 2010b; Fimia et al., 2011; Geeraert et al., 2010; Xie et al., 2010). Par ailleurs, il a été montré qu'une MAP ubiquiste : MAP1S interagissait avec LC3 et permettait son recrutement au niveau des microtubules ainsi que celui des mitochondries jouant ainsi un rôle essentiel dans la biogenèse et la dégradation autophagosomale et en particulier au cours de la mitophagie (Xie et al., 2011). Il est possible que la destabilisation du cytosquelette causée par la PP2A et la perte de l'interaction (qu'elle soit directe ou non) avec les microtubules empêche la mobilisation de LC3-I et son

transport à travers la cellule dans le cadre de la lise en place de la membrane d'isolement (figure 104, 4-).

Dans notre étude, l'inactivation de la PP2A conduit à des modifications de la distribution cellulaire de la forme libre cytosolique de LC3, qui passe d'une fraction insoluble dans le Triton X-100 contenant le cytosquelette, les noyaux et les inclusions protéiques vers une fraction soluble contenant les protéines cytoplasmiques solubles. La rapamycine ne change pas les rapports de répartition de LC3-I mais la quantité de LC3-I détectée dans la fraction insoluble est augmentée. Ces résultats suggèrent qu'il est nécessaire que LC3-I se situent dans la fraction insoluble pour que l'autophagie soit fonctionnelle. Il est possible que cette population liée de LC3-I soit en fait associée de manière directe ou non avec les microtubules. Cette population pourrait être rapidement mobilisable en cas d'induction de l'autophagie. En cas d'inactivation de la PP2A, nous assistons à une diminution de la quantité de LC3-I présente dans la fraction insoluble en faveur de la population soluble dans le Triton X-100. Ceci pourrait former une sorte de mécanisme de séquestration de la forme LC3-I qui ne serait plus aussi facilement mobilisable pour participer au processus autophagique. En ce sens, nous sommes en train de caractériser les facteurs d'interagissant avec LC3-I par des expériences de co-immunoprécipitations. Les résultats préliminaires nous ont permis d'identifier la tubuline et la protéine tau comme partenaire d'interaction avec la forme LC3-I. L'interaction, probablement directe entre la partie carboxy-terminale de tau et la partie amino-terminale de LC3-I, est supprimée en conditions d'inactivation de la PP2A. Ces données suggèrent un rôle pour la protéine tau, protéine essentiellement neuronale, dans la conduite du processus autophagique (figure 104, 5-). La suite du travail va consister en la caractérisation des modalités d'interaction entre tau et LC3. A partir d'expériences de mutagenèse dirigée, nous allons chercher à déterminer si la formation de ce complexe est régulée par phosphorylation. Il sera également intéressant d'étudier le mécanisme de l'autophagie dans des souris KO pour la protéine tau et d'établir si elles présentent une résistance au stress différente par rapport à des souris de phénotype sauvage. Par hybridation avec des souris pour lesquelles l'autophagie a été supprimée dans le SNC (souris *Atg5^{nest/flox}*), il serait intéressant de voir comment évolue les neurones au cours du vieillissement dans des souris KO pour tau et pour lesquelles l'autophagie n'est pas fonctionnelle dans le SNC.

Le chlorure de lithium est une molécule qui a d'une part été montrée, de par son action sur l'inhibition de la GSK3 β réduisait les niveaux globaux de la protéine tau et inversait l'action de l'OKA sur les taux de phosphorylation de la protéine tau (Martin et al., 2011b). D'autre part, en

inhibant l'inositol monophosphatase induit l'autophagie indépendamment de la voie mTOR dans les COS-7 (Sarkar et al., 2005) et dans des cultures de fibroblastes (Sarkar et al., 2008). Nous avons donc étudié l'effet du lithium sur l'activité autophagique dans les cultures primaires corticales enrichies en neurones. Bien que le lithium ne semble pas induire l'activité autophagique dans ce modèle, les données obtenues plaident en faveur d'une accélération du flux autophagique. Ces données doivent être vérifiées en modifiant les modalités d'exposition des cellules au lithium et aux inhibiteurs de flux autophagique. Afin de contrôler l'effet du lithium sur nos cultures à travers l'analyse par western-blot de l'état de phosphorylation de tau, nous avons observé une hausse du signal correspondant à la détection de tau par l'anticorps phospho-dépendant AT8 lorsque les cellules étaient exposées à la rapamycine, les niveaux globaux de tau n'étant quant à eux pas affectés. Ceci s'accompagne par une diminution du signal correspondant à l'anticorps tau-1, complémentaire de AT8. Le pré-traitement des cellules par la rapamycine avant l'inhibition de la PP2A par l'OKA potentialise la phosphorylation de tau au niveau des sites détectés par AT8. L'activité de mTOR conduit à l'inhibition de la GSK3 β à travers une rétroaction positive sur la voie Akt. GSK3 β est un substrat de la PP2A qui peut lever la phosphorylation inhibitrice de GSK3 β en position S9. Par conséquent, l'action de la rapamycine, inhibitrice pour mTOR favorise l'action de GSK3 β en permettant la levée de son inhibition et également permettre l'activation de la PP2A. Dans nos conditions, il est probable qu'au regard de la phosphorylation de tau, l'activation de la GSK3 β soit prioritaire sur la fonction de la PP2A lorsque les cellules sont exposées à la rapamycine, ce qui peut expliquer l'effet potentialisateur de la rapamycine sur la phosphorylation de tau au niveau des sites reconnus par AT8 liés à l'inactivation de la PP2A par l'OKA.

L'ensemble de ces résultats montre que les neurones sont des cellules particulières à l'égard de la régulation autophagique. En effet, bien que de faible activité, l'autophagie constitutive est efficace est active dans ces cellules. L'autophagie adaptative est également fonctionnelle mais il est fortement probable que les voies de régulation soit différentes par rapport à d'autres types cellulaires de l'organisme. C'est pour cela qu'il est important de considérer les neurones comme des cellules placées dans un environnement particulier en communication avec les cellules de soutien que sont les astrocytes. L'étude des relations existant entre neurones et cellules gliales pourrait permettre d'apporter des réponses quant à l'organisation de la lutte contre des stress dans le SNC. Cette idée est renforcée par le fait que l'activité de substances inductrices de l'autophagie, ici la rapamycine, le lithium et l'AmB induisent l'autophagie de manière moins importante dans les neurones. Cela ne va pas à l'encontre de l'idée selon laquelle l'amplitude de la réponse est plus

élevée puisque cette notion est relative et que la comparaison directe entre cellules de types différents avec des activités métaboliques distinctes reste difficile. L'étude de l'AmB a permis de mettre en évidence un lien éventuel entre homéostasie lipidique et régulation de l'autophagie (macroautophagie et CMA) dans les neurones.

Enfin, cette étude a conduit à l'identification de facteurs neuronaux impliqués dans la régulation de l'autophagie et qui pourrait être des paramètres comptant dans la distinction de cette voie catabolique dans ce type cellulaire. La suite de ce travail sera d'établir les liens potentiels existant entre LC3, tau, microtubules et PP2A et leur implication au sein de l'autophagie neuronale *in vitro* et *in vivo*. Il est également prévu d'étudier si la sur-expression de formes anormales de la protéine tau peuvent directement perturber le processus autophagique. En fonction des résultats obtenus, la combinaison de substances inductrices de l'autophagie et de substances protectrices contre la pathologie de tau pourront être testées dans le but d'établir des stratégies de neuroprotection.

Matériel et Méthodes

CULTURES

I. CULTURES PRIMAIRES CORTICALES

A. Solutions

PBS 1X stérile auquel sont ajoutés :

-18 mM de glucose (5,6 mL d'une solution à 30%)

- Antibiotiques (facultatif)

Neurobasal medium (Gibco) auquel sont ajoutés :

- 10 mL (un flacon) de B27 (Gibco)

- 5 mL de L-glutamine (solution 100X, Gibco)

Trypsine-EDTA 0,05% (Gibco)

MEM (Gibco) auquel sont ajoutés :

- 5 mL de L-glutamine (solution 100X, Gibco)

- 18 mM de glucose (5,6 mL d'une solution à 30%)

Antibiotiques (facultatif) : pénicilline et streptomycine

Sérum de Veau Fœtal (Gibco)

Poly-L-lysine (Sigma)

DNase 10 mg/mL

B. Protocole

1. Préparation des supports de culture

La poly-L-lysine (5 mg) est reprise dans 5 mL d'eau distillée stérile ou de PBS 1X afin d'obtenir une solution stock à 1mg/mL. La solution de travail est constituée de 10 µL/mL de poly-L-lysine diluée dans de l'eau distillée ou du PBS 1X. Elle est ensuite répartie dans les supports de culture (1 à 1,5 mL dans les boîtes de diamètre 35mm, 400 µL dans les puits de plaques 24 puits). Après avoir vérifié qu'il n'y avait pas de bulles, les supports de culture contenant la poly-L-lysine

sont placées à l'étuve à 37°C au minimum pendant 1 heure. La poly-L-lysine non-polymérisée est retirée par aspiration et les supports de culture sont rincés une fois à l'eau distillée ou au PBS 1X.

2. Dissection

Avant de commencer, toutes les solutions sont placées à 37°C. Une ratte gestante de souche Wistar est sacrifiée selon les recommandations du comité local d'éthique. La cavité abdominale est ouverte, les embryons, âgés de 17,5 jours sont prélevés dans leur sac amniotique et sont placés dans une boîte de Pétri de diamètre 100 mm sans PBS. Pour chaque embryon, le cerveau est prélevé et gardé dans du PBS 1X stérile avec glucose. Les cortex sont ensuite disséqués sous une loupe binoculaire dans une boîte contenant du PBS 1X stérile et l'enveloppe méningée est retirée avec des pinces fines.

3. Culture

Les cortex sont placés dans un tube Falcon de 50 mL contenant du PBS 1X dans un volume en mL équivalent au nombre d'hémisphères cérébraux auquel est ajouté le même volume de trypsine-EDTA 0,05%. Les cortex sont incubés quinze minutes à 37°C en agitant régulièrement. A la fin de ce temps, 5% de SVF et 500 µL de DNase 10 mg/mL sont ajoutés à la suspension cellulaire. Le volume est complété à 25 mL avec du MEM. Après avoir laissé les gros morceaux se déposer au fond, le surnageant est transvasé dans un autre tube Falcon 50 mL. Dans le premier tube, le volume est ajusté à 25 mL avec du MEM. Les cellules sont dissociées en les faisant passer une dizaine de fois à la pipette Pasteur effilée à la flamme (dissociation mécanique). Après avoir laissé les morceaux de cortex restant se déposer dans le fond, le surnageant est transféré dans un autre tube Falcon 50 mL. Les morceaux restant sont passés une dizaine de fois à la pipette Pasteur. Les différents tubes sont équilibrés et centrifugés à 400g à température ambiante pendant quinze minutes. Le surnageant en résultant est jeté puis les culots cellulaires sont regroupés et repris dans un volume de Neurobasal en mL équivalent au nombre d'embryons. Les cellules sont comptées à l'aide d'une lame de Mallassez.

Un volume suffisant de Neurobasal complet supplémenté avec 5% de SVF est préparé. Les cellules sontensemencées à une densité de 750 000 cellules par boîte de 35 mm de diamètre et de 150 000 cellules par puits de plaque 24 puits. Une fois que les cellules ont adhéré au support (après 45 minutes au minimum, le milieu est totalement remplacé par du milieu frais.

Les cultures seront gardées durant sept jours à l'étuve, sous atmosphère saturée en humidité, à 5% de CO₂.

II. CULTURES PRIMAIRES CORTICALES ENRICHIES EN ASTROCYTES

Après la dissociation, les cellules sont ensemencées dans des flasques de 75 cm³ dans du MEM supplémenté par 18 mM de glucose, 100 mM de L-glutamine, et 20% de SVF. La concentration élevée en SVF est toxique pour les neurones, ceci, associé au fait que les astrocytes soient des cellules très adhérentes et que le support de culture n'ait pas été « coaté », empêchent la survie des neurones et favorise la croissance astrocytaire. Un risque de contamination par des oligodendrocytes ou des macrophages reste possible, le taux d'enrichissement de ces culture est vérifié par un marquage *in situ* par immunofluorescence indirecte utilisant un anticorps dirigé contre la GFAP (*Glial Fibrillary Acidic Protein*) en tant que marqueur astrocytaire, et un anticorps dirigé contre la protéine tau ou la β -III-tubuline pour marquer les neurones. Un contre-marquage utilisant un intercalant de l'ADN, le DAPI permet de marquer le noyau de toutes les cellules nucléées présentes et d'estimer le nombre de cellules appartenant à d'autres types cellulaires (cf §...).

III. LIGNÉES CELLULAIRES

1. COS-7

La lignée COS-7 est une lignée dérivée d'une tumeur de l'épithélium rénal de singe vert d'Afrique. Les cellules COS-7 présentent l'avantage d'être facilement transfectables.

Ces cellules, adhérentes, sont cultivées dans du DMEM supplémenté avec 2 mM de L-glutamine, 18 mM de glucose et 10% de SVF, un mélange d'acides aminés non-essentiels (Gibco), et du pyruvate de sodium. Lors des passages, les cellules sont rincées trois fois au PBS-glucose stérile. Elles sont décollées de leur support de culture par incubation dans de la trypsine 0,05%-EDTA pendant 10 minutes à 37°C. La trypsine est alors inactivée par ajout de 2,5 % de SVF. La suspension cellulaire est alors récupérée, centrifugée à 400g pendant 15 minutes. Le culot cellulaire

est repris dans du milieu de culture, les cellules sont alors comptées puisensemencées dans un volume adéquat de milieu et gardées à proliférer à l'étuve au minimum 48 heures, sous une atmosphère saturée en humidité contenant 5% de CO₂.

2. SH-SY5Y

Cette lignée est issue d'une métastase produite par un neuroblastome prélevé chez une fillette âgée de 4 ans en 1970. Elles présentent certaines caractéristiques de cellules neuronales comme l'expression de la protéine tau et constituent un modèle alternatif aux cultures primaires neuronales.

Ces cellules sont cultivées dans du RPMI supplémenté par 2 mM de L-glutamine, 18 mM de glucose et 10% de SVF. L'entretien et l'ensemencement des cellules se fait selon le même protocole que celui appliqué au COS-7 à l'exception de la nature et de la composition du milieu.

IV. TRAITEMENTS

1. Induction de l'autophagie

a. Par un stress nutritionnel

L'autophagie peut être induite par un stress nutritionnel comme qu'une privation en nutriments, en facteurs de croissance, en acides aminés... Pour induire l'autophagie par un tel stress, plusieurs méthodes existent, on peut supprimer le SVF, l'apport en acides aminés et l'apport en facteurs de croissance en utilisant un milieu comme l'EBSS (*Earle's Balanced Salt Solution*) ou l'HBSS (*Hanks' Balanced Salt Solution*).

Les cellules corticales sont cultivées dans un milieu riche en facteurs de croissance et en hormones. Afin de créer les conditions optimales d'une privation nutritionnelle, les cellules corticales sont rincées trois fois avec du PBS 1X afin d'éliminer les facteurs trophiques et sont gardées pendant 6 ou 24 heures dans du MEM non supplémenté. Ainsi, sont supprimés les facteurs trophiques et les facteurs de croissances contenus dans le milieu Neurobasal et surtout le B27 ainsi que ceux apportés par le SVF en plus de ceux produits par les cellules elles-mêmes. C'est pour cette raison que les conditions contrôles correspondront à des cellules cultivées dans le même volume de milieu conditionné, c'est-à-dire le milieu dans lequel les cellules ont été cultivées jusqu'au traitement.

Dans les lignées cellulaires et les cultures primaires de fibroblastes, les cellules sont rincées par trois fois au PBS 1X puis incubées durant 6 à 24 heures dans de l'EBSS (Gibco).

b. Pharmacologiquement

L'autophagie peut être induite par des stress d'origines diverses telles qu'une inhibition du protéasome, un stress du RE. Ces stress inducteurs peuvent être provoqués pharmacologiquement.

La rapamycine est un puissant inhibiteur de la protéine mTOR et induit l'autophagie de façon robuste. Afin de déterminer la dose optimale de rapamycine permettant d'induire l'autophagie dans notre modèle, les cellules ont été traitées par des doses croissantes de rapamycine pendant 24 heures. Toutes les doses utilisées inhibent la phosphorylation de mTOR. La dose de 250 nM est la première à provoquer une forte conversion de LC3-I en LC3-II.

Afin d'induire un stress du RE, les cellules ont été traitées avec de la tunicamycine (Sigma), un inhibiteur de la N-glycosylation à une concentration de 0,5 µg/mL pendant 6 heures.

L'inhibition du protéasome est réalisée en traitant les cellules avec des concentrations de MG132 (Sigma) comprises entre 2,5 et 10 µM pendant six heures.

c. Analyse du flux autophagique

L'analyse de la conversion de LC3-I en LC3-II constitue donc un bon marqueur de l'activité autophagique. Cependant, une augmentation du niveau de LC3-II n'est pas suffisante pour conclure que l'autophagie est induite. En effet, cette élévation du niveau de LC3-II peut également être le reflet d'une inhibition du flux autophagique c'est-à-dire d'un blocage des phases de maturation autophagosomale et/ou de la dégradation lysosomale. Il est alors nécessaire de comparer les variations de LC3-I et de LC3-II dans des conditions dites basales aux mêmes conditions en présence d'inhibiteurs du flux autophagique (Mizushima et Yoshimori, 2007; Rubinsztein et Nixon, 2010).

La bafilomycine est une toxine d'origine fongique agissant sur les pompes à protons vacuolaires permettant l'acidification lysosomales (H^+ V-ATPases). L'inhibition de l'acidification des vésicules de la voie lysosomale empêche la dégradation de leur contenu par inactivation des enzymes lysosomales qui ne peuvent fonctionner qu'en conditions de pH acide. Cette substance est utilisée à des concentrations de 50 ou 100 nM pendant six à huit heures.

La leupeptine et la pepstatine A sont des inhibiteurs des enzymes lysosomales. La leupeptine est un inhibiteur des protéases à cystéines, donc elle agit sur les cathepsines B, C, F, H, K, L, N, O, S, T, U, W et X tandis que la pepstatine inhibe les protéases à aspartate (principalement la cathepsine D). Ces toxines sont utilisées en association à des concentrations identiques de 20 μ M pendant 24 heures.

4. Evaluation de la survie cellulaire par le test MTT

Le MTT ou 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide est une substance jaune sous sa forme oxydée. Le milieu de culture de cellulesensemencées sur plaques 96 puits, traitées ou non, est remplacé par 25 μ l de solution de MTT (Sigma) à 2mg/ml dans du PBS stérile. Si les cellules sont vivantes, ou plus exactement métaboliquement actives, le MTT est réduit par la succinate deshydrogénase mitochondriale et former des cristaux bleu-noir de formazan qui sont dissous par 150 μ l de DMSO après une heure d'incubation à 37°C. On obtient une couleur plus ou moins mauve selon la quantité de cristaux formés. La mesure de la densité optique du produit, obtenu à 570 nm, permet de quantifier le taux de survie de cellules comparativement à un témoin. Après dissolution totale, les DO sont lues dans un lecteur de microplaques (Dynex technologies).

V. TRANSFECTIONS

1. Transfection de cellules COS-7 par le vecteur pEGFP-LC3

Le vecteur pEGFP-LC3, a été fourni par N. Mizushima, (*Department of Physiology et Cell Biology, Tokyo Medical et Dental University, Graduate School et Faculty of Medicine, Tokyo, Japon*, (Kabeya et al., 2000) ; numéro d'accession : NM 022867). Après transformation bactérienne, la présence de l'insert est vérifiée par le clivage du vecteur par l'enzyme de restriction XbaI (New England Biolabs) selon le protocole indiqué par le fournisseur, puis par migration sur gel d'agarose 1% (Sigma), l'ADN étant visualisé en utilisant la sonde *Sybr-Green*® (Invitrogen) et le système GelDoc (Biorad).

Des bactéries compétentes *Escherichia coli* de souche DH-5 α ont été transfectées par choc thermique (45 secondes à 42°C puis 5 minutes sur glace en présence du vecteur) puis propagées pendant une nuit à 37°C sur du LB-Agar (Sigma) contenant l'antibiotique de sélection (kanamycine, 50 μ g/mL ; Sigma). L'extraction de l'ADN plasmidique est réalisée à l'aide d'un kit d'extraction Quantum MiniPrep (Biorad) puis la quantité de vecteur obtenue est établie par spectrophotométrie (NanoDrop). Les cellules COS-7 ont ensuite été transfectées en utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) selon le protocole fourni par le fabricant.

2. Extinction de l'expression de la PP2A-C dans les cultures primaires corticales

Ce travail a été réalisé en collaboration avec Madame le Docteur Cornelia M. Wilson. Deux vecteurs commercialement disponibles ont été utilisés basés sur le vecteur lentiviral à shRNA pLKO.1 contenant l'une des deux séquences en épingles à cheveux correspondant au gène codant la sous-unité catalytique de la PP2A (Open Biosystems) suivantes :

- CCGGCACACAAGTTTATGGTTTCTACTCGAGTAGAAACCATAAACTTGTGTGTTTTT

ou

- CCGGGAGGGATATAACTGGTGCCATCTCGAGATGGCACCAGTTATATCCCTCTTTTT

Nous avons utilisé le vecteur lentiviral pLKO.1 contenant une séquence ciblant l'expression de OST48 (*dolichyl-diphospho-oligosaccharide-protein glycosyl transferase*) : CCGGCCCTTTGACGGAGATGACATTCTCGAGAATGTCATCTCCGTCAAAGGGTTTTTG.

Ces vecteurs ont été propagés dans des bactéries *E. coli XLI-blue*. Les vecteurs lentiviraux contenant les séquences shRNA ont été co-transfectés avec les plasmides pMDG (*vesicular stomatitis virus envelope protein (VSV-G)*) et p8.91 HIV-1 gag-pol (fournis par) dans des cellules HEK-293T afin de produire des particules lentivirales portant les shRNAs. Les surnageants de culture ont été prélevés 24, 48, 72 et 96 heures après transfection, filtrés au travers d'un filtre en PVDF de porosité 0,45 μ m (Millipore) et stockés à -80°C.

Avant infection, les particules lentivirales ont été centrifugées à 38 000g dans un rotor SW28 (Beckman) pendant 2 heures. Le culot ainsi obtenu a été resuspendu dans du milieu Neurobasal dans un dixième du volume initial. Le titre viral a été mesuré en utilisant des lignées cellulaires HEK293T et SH-SY5Y (10⁸ à 10⁹ particules / mL).

Les cultures primaires de neurones corticaux de rat ont ensuite été infectées en utilisant les stocks concentrés de lentivirus à 20-50 MOI (*multiplicity of infection*) pendant 24 heures, temps au bout duquel le milieu de culture a été remplacé par du milieu conditionné prélevé avant infection. Les cellules ont été récoltées 48 heures après l'infection. Un vecteur lentiviral pLKO.1 vide (sans séquence shRNA) a été utilisé en tant que contrôle négatif.

VI. WESTERN-BLOT

A. Solutions

Tris 1 M, pH 6.8 :

- 12,1 g de Tris base
- 80 mL d'eau distillée
- Ajuster le pH à 6,8
- Ajuster le volume à 100 ml

Tris 1.5 M, pH 8.8

- 18,15 g de Tris base
- 80 mL d'eau distillée
- Ajuster le pH à 8,8
- Ajuster le volume à 100 ml

Ammonium PerSulfate 10% (=APS) :

- 5 g d'APS (Sigma)
- 50 mL d'eau distillée

Acrylamide 30%

- 29,2 g d'acrylamide (Sigma)
- 0,8 g de bis-acrylamide (Sigma)
- 60 ml d'eau distillée
- Ajuster le volume à 100 ml

Tampon d'électrophorèse 1X :

- 3,03 g de Tris base (Euromedex)
- 14,42 g glycine (Sigma)
- 1,0 g SDS (Sigma)
- QSP 1L d'eau distillée

Tampon de transfert 1X :

- 5,8 g de Tris base (Euromedex)
- 2,9 g glycine (Sigma)
- 0,37 g SDS (Sigma)
- QSP 800 mL d'eau distillée
- 200 mL de méthanol (VWR)

TBS (=Tris Buffer Saline) 1X :

- 2,42 g Tris base (200 mM)
- 8,0 g NaCl (Sigma),
- 3,8 ml HCl 1M (Sigma),
- QSP 1L d'eau distillée

B. Extraction protéique

1. Extraction protéique totale

Les cellules cultivées sont rincées une fois au PBS 1X puis 150 μ L de tampon de lyse de Laemmli (Laemmli, 1970). Ce tampon contient :

- 60 mM de TRIS pH
- 2% de dodécylsulfate de sodium (SDS, *Sodium Dodecyl Sulfate*)
- 10% (v/v) de glycérol
- et de l'eau distillée en quantité suffisante.

Les lysats sont ensuite sonifiés (exposés à des ondes ultrasonores) pendant 1 minute, à une fréquence de 60 MHz par pulses de 3s puis sont centrifugés à 12 500g à température ambiante pendant 15 minutes. Les surnageants contenant les protéines sont conservés, dosés grâce au kit *DC Protein Assay* (Biorad), selon le protocole recommandé par le fournisseur. 10 mM de DiThioThréitol (DTT) (Sigma) permettant de rompre les ponts disulfure, ainsi que 0,01% de bleu

de bromophénol (Sigma) (permet de colorer les protéines en bleu) leur sont rajoutés et les protéines sont dénaturées en les portant à une température de 90°C pendant 10 minutes.

2. Fractionnement cellulaire

Cette technique permet une extraction différentielle des protéines en fonction de leur localisation cellulaire. Les protéines cellulaires sont séparées en deux fractions, l'une contenant les protéines solubles et l'autre les protéines nucléaires, agrégées et associées au cytosquelette. Ce fractionnement est basé sur les propriétés détergentes du Triton X-100. Ce détergent est suffisamment puissant pour créer des pores dans la membrane plasmique et la membrane de la plupart des organites mais pas assez pour passer la membrane nucléaire et pour solubiliser les composants cytosquelettiques.

Le tampon de lyse est composé de :

- 80 mM de PIPES (*Piperazine-1,4-bis(2-ethanesulfonic acid)*) ; Sigma), pH 6,8,
- 1,0 mM de chlorure de magnésium (MgCl₂) (Sigma),
- 2,0 mM de EGTA (Sigma),
- 30% de glycérol (v/v) (Euromedex),
- 10 mM de benzamidine (Sigma),
- 50 µg/mL de leupeptine (Sigma),
- 1,0 mM de PMSF (Sigma),
- 10 µg/mL d'aprotinine (Sigma),
- 10 µg/mL d'antipain (Sigma),
- 0,2 mM d'orthovanadate de sodium (Na₂VO₃) ; Sigma)
- eau distillée en quantité suffisante.

Les cellules sont rincées une fois, sur glace avec ce tampon ne contenant pas de détergent. 150 µL de tampon auquel été rajoutés 0,1% de Triton X-100 sont déposés sur les cellules qui sont ensuite récupérées à l'aide d'un *scraper* puis le lysat est placé sur un agitateur rotatif à 4°C pendant 30 minutes. Les cellules sont ensuite passées une vingtaine de fois dans une aiguille de 22 gauges montées sur une seringue et centrifugées à 18 000g pendant 10 minutes. Le surnageant, contenant les protéines solubles est placé pendant 10 minutes au bain-marie à 100°C puis un volume équivalent de tampon de Laemmli 2X lui est rajouté. Le culot est repris dans du tampon de Laemmli 1X.

Les lysats sont ensuite sonifiés (exposés à des ondes ultrasonores) pendant 1 minute, à une fréquence de 60 MHz. La concentration protéique est dosée par la méthode de Lowry à l'aide du kit BioRad *DC Protein Assay*. La D.O. est lue à l'aide d'un lecteur de microplaque (Dynex) réglé sur une longueur d'onde de 630 nm. La concentration protéique est alors estimée à l'aide d'une droite de régression déterminée à partir d'une gamme étalon de BSA. Les protéines sont ensuite dénaturées par incubation à 90°C pendant 10 minutes après que 100 mM de DTT et 0,1% de bleu de bromophénol aient été rajoutés.

C. Electrophorèse sur gel de polyacrylamide

Le pourcentage d'acrylamide contenu dans le gel de séparation est déterminé en fonction du poids moléculaire apparent de la protéine d'intérêt (tableau 3).

1. Préparation des gels « simples »

Les plaques de verre avec et sans espaceurs correspondant à l'épaisseur du gel souhaitée : 0.75 mm ou 1.0 mm sont lavées à l'éthanol 70% et montées sur le support adapté (Biorad).

Type de gel (% acrylamide) Composition (mL, pour 10 mL de solution)	4 %	10 %	12 %	15 %
Eau distillée	6,8	4,0	3,3	2,3
Mélange d'Acrylamide à 30%	1,7	3,3	4,0	5,0
Tris 1,5M (pH 8,8)	1,3	2,5	2,5	2,5
SDS 10%	0,1	0,1	0,1	0,1
APS 10%	0,1	0,1	0,1	0,1
TEMED	0,01	0,004	0,004	0,004

Tableau 3 : Composition des gels d'acrylamide

Une solution d'acrylamide pour le gel de séparation (cf. tableau 3) est préparée (environ 5 ml par gel) et « coulée » entre les plaques de verre. 200 µl d'isobutanol sont déposés au-dessus du futur gel pour que la polymérisation soit homogène. Après une demi-heure à trois quarts d'heure, l'isobutanol est aspiré. La solution d'acrylamide pour le gel de concentration (=stack ; généralement gel à 4%) est préparée, placée au-dessus du premier gel polymérisé et les peignes sont installés.

2. Préparation des gels en gradients de concentrations

Les gels de gradient de concentration sont préparés à partir de deux solutions différentes (généralement 4 et 10 %). Pour cela, un mélangeur composé d'une double cuve, est utilisé. Les plaques de verres sont installés dans une cassette prévue à cet effet (Biorad).

Ce dispositif est relié au mélangeur placé sur un système d'agitation magnétique, la cuve qui accueillera le gel de concentration d'acrylamide la plus faible contenant un barreau aimanté. Les solutions sont versées dans chaque cuve et le mélange se fait progressivement, sous agitation constante alors que la solution d'acrylamide est envoyée dans la cassette. Les peignes sont ensuite insérés.

3. Electrophorèse

Les extraits protéiques sont chargés dans les puits pour que chaque puits contienne la même quantité de protéines (cf tableau). L'électrophorèse est réalisée dans une cuve Mini PROTEAN Tetra Cell (Biorad) reliée à un générateur PowerPac (Biorad), à voltage constant (120 V) dans du tampon d'électrophorèse dont la composition est indiquée plus haut. L'électrophorèse est arrêtée lorsque le front de migration atteint le bord inférieur du gel à l'exception des gels destinés à analyser l'expression de mTOR, phospho-mTOR, ACC et phospho-ACC pour lesquels la migration est arrêtée lorsque la bande colorée du marqueur de taille (Fermentas) correspondant à environ 43 kDa atteint le bas du gel. Les gels sont alors démontés et recouvert de tampon de transfert.

4. Transfert sur membrane de PVDF

Des membranes de PVDF (PolyVinylidène Fluorure) de porosité 0,45 μM de taille adaptées sont régénérées dans du méthanol pur pendant trente-secondes avant d'être placées dans du tampon de transfert 1X et placées 30 minutes sous agitation. Dans le même temps, 6 feuilles de papier chromatographique (3MM Chr, Whatman) pour une membrane sont imbibées de tampon de transfert 1X. Un assemblage composé de 3 feuilles de papier chromatographique, la membrane, le gel, et les trois dernières feuilles de papier sont placées dans un appareil de transfert Trans-Blot SD semy-dry transfer cell (transfert semi-sec, Biorad) ensuite raccordé à un générateur PowerPac. Le transfert est effectué à voltage constant (10 mV) pendant deux heures.

Afin de vérifier la qualité du transfert, les membranes sont immédiatement placées pendant 30 secondes dans une solution de Ponceau S puis 30 secondes supplémentaires dans un bain de méthanol (Ponceau S 0,1% (m/v), 5% (v/v) d'acide acétique, Sigma). Elles sont ensuite rincées trois fois pendant cinq minutes dans du TBS 1X.

5. Saturation des sites antigéniques aspécifiques

Les sites antigéniques aspécifiques sont saturés par incubation, une heure à température ambiante, des membranes dans une solution de lait écrémé (Régilait) à 5% dans du TBS 1X et 0,1% de Tween-20 (Sigma).

6. Immunomarquage et révélation

Après trois rinçages de cinq minutes chacun dans du TBS 1X sous agitation, les membranes sont incubées en présence d'une solution d'hybridation contenant l'anticorps primaire à la dilution adaptée pendant une nuit, à la température correspondante indiquée dans le [tableau 4](#). Les membranes sont de nouveau rincées par trois fois pendant 5 minutes au TBS puis elles sont mises à incuber avec la solution d'anticorps secondaires couplés à la HRP (*Horse-Raddish Peroxydase*, Biorad) dirigés contre les immunoglobulines des espèces chez qui l'anticorps primaire a été produit, dilués au 1/4000^e dans du TBS 1X, et ce pendant une heure à température ambiante. Les membranes sont ensuite rincées trois fois durant 5 minutes dans du TBS.

La détection des protéines est réalisée en recouvrant les membranes du réactif chimioluminescent, substrat de la HRP, Immobilon Western® (Millipore) avant de les placer sous la caméra numérique de la G-Box (Syngene) pour la numérisation du signal ainsi obtenu. L'acquisition des images est réalisée à l'aide du logiciel GeneTools (Syngene). L'analyse semi-quantitative de l'intensité du signal (densité optique des bandes) a été faite sur le logiciel Image J (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>). Les résultats en rapport avec les niveaux totaux d'expression d'une protéine d'intérêt ont été normalisés (logiciel Numbers '09, version 2.0.5 Apple Inc.) en rapportant les données obtenues pour la protéine d'intérêt sur celles correspondant à la quantification du signal de l'actine, contrôle de charge protéique. En revanche, les quantifications en rapport avec la conversion de LC3-I en LC3-II correspondent au calcul du rapport des valeurs LC3-II/LC3-I. Ceux en relation avec les taux de phosphorylation de protéines données ont été obtenus en normalisant le signal correspondant aux épitopes phosphorylés sur celui relatif à la détection de la forme globale, indépendamment de l'état de phosphorylation).

Source (clone)	Protéine ciblée	Référence catalogue	Compagnie	Utilisation	Dilution	Température d'incubation	Poids moléculaire apparent	% du gel d'acrylamide (WB)	Solution d'hybridation
Lapin	LC3	NB100-2220	Novus Biologicals (EU)	IF	1/750	TA			
Lapin	LC3	PM036	MBL (Japon)	WB	1/1000	TA	18 et 16 kDa	15 %	TBS, 1% lait écrémé (m/v)
Souris	LC3	M152-3	MBL (Japon)	IF	1/200	TA			
Lapin	p62	PM045	MBL (Japon)	WB ; IF	1/2000 ; 1/1000	TA	62 kDa	12 %	TBS, 1% lait écrémé (m/v)
Lapin	Caspase-3 clivée	#2038	Cell Signalling Technology (EU)	WB	1/1000	4°C	20 kDa	15 %	TBS, 0,1% Tween-20
Lapin	PP2A-C	#2038	Cell Signalling Technology (EU)	WB	1/1000	4°C	36 kDa	12 %	TBS, 0,1% Tween-20
Lapin	mTOR	#2972	Cell Signalling Technology (EU)	WB	1/1000	4°C	289 kDa	gradient 4-12%	TBS, 0,1% Tween-20
Lapin	Phospho-mTOR (ser 2448)	#2971	Cell Signalling Technology (EU)	WB	1/1000	4°C	289 kDa	gradient 4-12%	TBS, 0,1% Tween-20
Lapin	P70S6K	#9202	Cell Signalling Technology (EU)	WB	1/1000	4°C	70 kDa	gradient 4-12%	TBS, 0,1% Tween-20
Souris (1A5)	phospho-P70S6K (Thr 389)	#9206	Cell Signalling Technology (EU)	WB	1/1000	4°C	70 kDa	gradient 4-12%	TBS, 0,1% Tween-20
Lapin (23A3)	AMPK	#2603	Cell Signalling Technology (EU)	WB	1/1000	4°C	62 kDa	gradient 4-12%	TBS, 0,1% Tween-20
Lapin (40H9)	Phospho-AMPK (Thr 172)	#2535	Cell Signalling Technology (EU)	WB	1/1000	4°C	62 kDa	gradient 4-12%	TBS, 0,1% Tween-20
Lapin	ACC	#3676	Cell Signalling Technology (EU)	WB	1/1000	4°C	280 kDa	gradient 4-12%	TBS, 0,1% Tween-20
Lapin (C83B10)	Phospho-ACC (Ser 79)	#3661	Cell Signalling Technology (EU)	WB	1/1000	4°C	280 kDa	gradient 4-12%	TBS, 0,1% Tween-20
Souris (P4D1)	Ubiquitin	#64301	Biologend (EU)	WB ; IF	1/1000 ; 1/200	TA		gradient 4-15%	TBS
Souris (T46)	tau (global)	T9450	Sigma-Aldrich (EU)	WB ; IF	1/2000 ; 1/1000	TA	45-70 kDa	12 %	TBS
Souris (Tau-1)	tau non phosphorylée	MAB3420	Millipore (EU)	WB	1/5000	TA	45-70 kDa	12 %	TBS
Souris (12E8)	tau phosphorylée	-	Don du Pr Seubert	WB	1/5000	TA	45-70 kDa	12 %	TBS
Souris (A18)	Tau phosphorylée		Innogenetics (Belgique)	WB	1/1000	TA	45-70 kDa	12 %	TBS
Souris (5G8)	β-III-tubuline	G7121	Promega (EU)	IF	1/1000	TA			
Souris (AC-40)	Actine	A0483	Sigma-Aldrich (EU)	WB	1/5000	TA	42 kDa	12 %	TBS
Lapin	GFAP	ZO334	DAKO (Danemark)	IF	1/200	TA			
Souris (G-A-5)	GFAP	G3893	Sigma-Aldrich (EU)	WB ; IF	1/1000 ; 1/200	TA	45-50 kDa	12 %	TBS
Lapin	Beclin-1	#3738	Cell Signalling Technology (EU)	WB ; IF	1/1000 ; 1/200	4°C	60 kDa	12 %	TBS, 0,1% Tween-20

Tableau 4 : Anticorps utilisés en western-blot (WB) et en immunofluorescence (IF) et en immunofluorescence (IF) et en immunofluorescence (IF) et en immunofluorescence (IF)

VII. IMMUNOFLUORESCENCES INDIRECTES

1. Fixation des cellules

Les cellules ont été préalablement ensemencées dans des supports contenant des lamelles de verre. Les cellules sont rincées deux fois au PBS 1X¹⁹ puis recouvertes d'une solution de paraformaldéhyde (Sigma) 4% froid (4°C), à pH 7,2 pendant vingt minutes puis rincées trois fois cinq minutes au PBS 1X.

2. Perméabilisation et saturation

Les membranes cellulaires sont ensuite perméabilisées 15 minutes au Triton X-100 (Sigma) 0,1% ou à la digitonine (Sigma) 100 µg/mL dans du PBS 1X. Après trois rinçages au PBS 1X, les sites antigéniques aspécifiques sont saturés par incubation des lamelles 1 heure dans du sérum normal de chèvre 5% dilué dans le PBS 1X.

3. Immunomarquage

	Espèce hôte	Dirigé contre	Couplé à	Référence catalogue
Anticorps secondaires utilisés en IF (Molecular probes)	Chèvre	IgG de lapin	Alexa 594®	A11012
	Chèvre	IgG de lapin	Alexa 488®	A11008
	Chèvre	IgG de souris	Alexa 594®	A11005
	Chèvre	IgG de souris	Alexa 488®	A11001
Anticorps secondaires utilisés en WB (Biorad)	Chèvre	Ig de lapin	HRP	170-6515
	Chèvre	Ig de souris	HRP	170-6516

Tableau 5 : Anticorps secondaires utilisés en immunofluorescence (IF) et en western-blotting (WB)

Les cellules sont ensuite incubées avec la solution d'hybridation contenant le(s) anticorps primaire(s) dilués comme indiqué dans le tableau 4 pendant trois heures à température ambiante. Les cellules sont ensuite de nouveau rincées trois fois au PBS 1X avant d'être incubées une heure

¹⁹ Lorsque les vésicules autophagiques sont marquées en utilisant l'anticorps dirigé contre LC3, monoclonal produit chez la souris (MBL) le tampon utilisé était du tampon phosphate de Sorensen pH 7,2 et les sites antigéniques aspécifiques ont été saturés après l'hybridation avant de réaliser une deuxième incubation (double-immunofluorescence) avec un anticorps primaire.

supplémentaire avec la solution contenant les anticorps secondaires couplés à des fluorochromes²⁰ (Molecular Probes), dilués au millième dans du PBS 1X (tableau 5).

4. Contre-marquage nucléaire

Après l'immunomarquage, les cellules sont rincées trois fois 5 minutes au PBS 1X. Elles sont ensuite incubées en présence d'une solution contenant du DAPI²¹ (*4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride* ; Sigma) à 1µg/mL pendant 1 minute 30 (ou TO-PRO-3²² (Invitrogen ; à 1µg/mL pendant 15 minutes). Après trois rinçages, les lamelles portant les cellules sont montées sur des lames porte-objet dans du Mowiol (Sigma).

5. Observation

Les lames sont observées au microscope Nikon Eclipse-800 au niveau duquel l'acquisition des images a été réalisée à l'aide d'une caméra CCD (*Charged-Coupled Device*) (Photonic science) et du logiciel VisioLab 2000 (Biocom) ou avec un microscope confocal Zeiss couplé au logiciel LSM 510 Meta (Zeiss).

B. Microscopie électronique

Les cellules COS-7 sont au préalable ensemencées dans des flasques de 75 mm³ au minimum 24 heures avant leur utilisation. Les cellules sont rincées trois fois au PBS-glucose stérile. Elles sont décollées de leur support de culture par incubation dans de la trypsine 0,05%-EDTA pendant 10 minutes à 37°C puis centrifugées pendant 15 min, à 400g et à température ambiante. Les cellules contenues dans le culot sont remises en suspension dans un tampon fixateur froid (4°C) composé de 1% de glutaraldéhyde, de 4% de paraformaldéhyde, 0,168M de NaH₂PO₄-H₂O et 7,4 M de NaOH et gardées ainsi pendant 24 à 48 h. L'analyse en microscopie électronique a été faite en collaboration avec le Professeur Phillipe Roingeard, INSERM ERI 19, laboratoire d'immunologie et

²⁰ Longueurs d'ondes d'émission / d'excitation :

Alexa 488® : λexcitation : 488 nm, λémission : 520 nm (émission dans le vert)

Alexa 594® : λexcitation : 594 nm, λémission : 618 nm (émission dans le rouge)

²¹ Spectre : λexcitation : 364 nm, λémission : 454 nm (quand il est complexé à l'ADN ; émission dans le bleu)

²² Spectre : λexcitation : 642 nm, λémission : 661 nm (émission dans le rouge lointain)

d'histocompatibilité, Tours, France, selon le protocole décrit dans l'article de Lehmann-Che et al., 2007 (Lehmann-Che et al., 2007).

BIBLIOGRAPHIE

- Abedin, M.J., D. Wang, M.A. McDonnell, U. Lehmann, et A. Kelekar. 2007. Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage *Cell Death Differ.* 14:500–510.
- Abraha, A., N. Ghoshal, T.C. Gamblin, V. Cryns, R.W. Berry, J. Kuret, et L.I. Binder. 2000. C-terminal inhibition of tau assembly in vitro et in Alzheimer's disease *J Cell Sci.* 113 Pt 21:3737–3745.
- Abramov, A.Y., M. Ionov, E. Pavlov, et M.R. Duchon. 2011. Membrane cholesterol content plays a key role in the neurotoxicity of β -amyloid: implications for Alzheimer's disease *Aging Cell.* 10:595–603.
- Agarraberes, F.A., et J.F. Dice. 2001. A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation *J Cell Sci.* 114:2491–2499.
- Aita, V.M., X.H. Liang, V.V. Murty, D.L. Pincus, W. Yu, E. Cayanis, S. Kalachikov, T.C. Gilliam, et B. Levine. 1999. Cloning et genomic organization of beclin 1, a candidate tumor suppressor gene on chromosome 17q21. *Genomics.* 59:59–65.
- Akbar, M.A., S. Ray, et H. Krämer. 2009. The SM protein Car/Vps33A regulates SNARE-mediated trafficking to lysosomes et lysosome-related organelles *Mol Biol Cell.* 20:1705–1714.
- Akdemir, F., R. Farkas, P. Chen, G. Juhász, L. Medved'ová, M. Sass, L. Wang, X. Wang, S. Chittaranjan, S.M. Gorski, A. Rodriguez, et J.M. Abrams. 2006. Autophagy occurs upstream or parallel to the apoptosome during histolytic cell death *Development.* 133:1457–1465.
- Alavez, S., M.C. Vantipalli, D.J.S. Zucker, I.M. Klang, et G.J. Lithgow. 2011. Amyloid-binding compounds maintain protein homeostasis during ageing et extend lifespan *Nature.* 472:226–229.
- Albani, D., L. Polito, A. Signorini, et G. Forloni. 2010. Neuroprotective properties of resveratrol in different neurodegenerative disorders *Biofactors.* 36:370–376.
- Alberti, A., X. Michelet, A. Djeddi, et R. Legouis. 2010. The autophagosomal protein LGG-2 acts synergistically with LGG-1 in dauer formation et longevity in *C. elegans* *Autophagy.* 6.
- Alirezaei, M., W.B. Kiesses, C.T. Flynn, N.R. Brady, et H.S. Fox. 2008. Disruption of neuronal autophagy by infected microglia results in neurodegeneration *PLoS ONE.* 3:e2906.
- Alirezaei, M., C.C. Kemball, C.T. Flynn, M.R. Wood, J.L. Whitton, et W.B. Kiesses. 2010. Short-term fasting induces profound neuronal autophagy *Autophagy.* 6:702–710.
- Alirezaei, M., C.C. Kemball, J.L. Whitton. 2011. Autophagy, inflammation et neurodegenerative disease *Eur J Neurosci.* 33:197–204.
- Allinson, T.M.J., E.T. Parkin, A.J. Turner, et N.M. Hooper. 2003. ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases *J Neurosci Res.* 74:342–352.
- Alzheimer, A., R.A. Stelzmann, H.N. Schnitzlein, et F.R. Murtagh. 1995. An English translation of Alzheimer's 1907 paper, "Über eine eigenartige Erkrankung der Hirnrinde".
- Amieva, H., H. Jacqmin-Gadda, J. Orgogozo, N. Le Carret, C. Helmer, L. Letenneur, P. Barberger-Gateau, C. Fabrigoule, et J.F. Dartigues. 2005. The 9 year cognitive decline before dementia of the Alzheimer type: a prospective population-based study *Brain.* 128:1093–1101.
- Andrade, M.A., C. Perez-Iratxeta, et C.P. Ponting. 2001. Protein repeats: structures, functions, et evolution *J Struct Biol.* 134:117–131.
- Andrade, M.A., et P. Bork. 1995. HEAT repeats in the Huntington's disease protein *Nat Genet.* 11:115–116.
- Anglade, P., S. Vyas, F. Javoy-Agid, M. Herrero, P. Michel, J. Marquez, A. Mouatt-Prigent, M. Ruberg, E. Hirsch, et Y. Agid. 1997. Apoptosis et autophagy in nigral neurons of patients with Parkinson's disease. *Histol Histopathol.* 12:25–31.
- Appelmans, F., R. Wattiaux, et C. de Duve. 1955. Tissue fractionation studies. 5. The association of acid phosphatase with a special class of cytoplasmic granules in rat liver *Biochem J.* 59:438–445.
- Appelmans, F., et C. de Duve. 1955. Tissue fractionation studies. 3. Further observations on the binding of acid phosphatase by rat-liver particles *Biochem J.* 59:426–433.
- Arai, T., T. Nonaka, M. Hasegawa, H. Akiyama, M. Yoshida, Y. Hashizume, K. Tsuchiya, T. Oda, et K. Ikeda. 2003. Neuronal et glial inclusions in frontotemporal dementia with or without motor neuron disease are immunopositive for p62 *Neurosci Lett.* 342:41–44.
- Araki, T., Y. Sasaki, et J. Milbrandt. 2004. Increased nuclear NAD biosynthesis et SIRT1 activation prevent axonal degeneration *Science.* 305:1010–1013.
- Aranda-Orgillés, B., J. Aigner, M. Kunath, R. Lurz, R. Schneider, et S. Schweiger. 2008. Active transport of the ubiquitin ligase MID1 along the microtubules is regulated by protein phosphatase 2A *PLoS ONE.* 3:e3507.
- Arias, E., et A.M. Cuervo. 2010. Chaperone-mediated autophagy in protein quality control. *Current opinion in cell biology.*

Arico, S., A. Petiot, C. Bauvy, P.F. Dubbelhuis, A.J. Meijer, P. Codogno, et E. Ogier-Denis. 2001. The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway *J Biol Chem*. 276:35243–35246.

Armour, S.M., J.A. Baur, S.N. Hsieh, A. Land-Bracha, S.M. Thomas, et D.A. Sinclair. 2009. Inhibition of mammalian S6 kinase by resveratrol suppresses autophagy *Aging (Albany NY)*. 1:515–528.

Aronova, S., K. Wedaman, S. Anderson, J. Yates, et T. Powers. 2007. Probing the membrane environment of the TOR kinases reveals functional interactions between TORC1, actin, et membrane trafficking in *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Biol Cell*. 18:2779–2794.

Arsham, A.M., J.J. Howell, et M.C. Simon. 2003. A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin et its targets *J Biol Chem*. 278:29655–29660.

Arsov, I., X. Li, G. Matthews, J. Coradin, B. Hartmann, A.K. Simon, S.C. Sealfon, et Z. Yue. 2008. BAC-mediated transgenic expression of fluorescent autophagic protein Beclin 1 reveals a role for Beclin 1 in lymphocyte development *Cell Death Differ*. 15:1385–1395.

Ashford, T.P., et K.R. Porter. 1962. Cytoplasmic components in hepatic cell lysosomes *J Cell Biol*. 12:198–202.

Au, A.K., H. Bayir, P.M. Kochanek, et R.S.B. Clark. 2010. Evaluation of autophagy using mouse models of brain injury *Biochim Biophys Acta*. 1802:918–923.

Austad, S.N. 2010. Methusaleh's Zoo: how nature provides us with clues for extending human health span *J. Comp. Pathol* 142 Suppl 1:S10–21.

Avruch, J., X. Long, S. Ortiz-Vega, J. Rapley, A. Papageorgiou, et N. Dai. 2009. Amino acid regulation of TOR complex 1. *American Journal of Physiology - Endocrinology et Metabolism*. 296:E592.

Axe, E.L., S.A. Walker, M. Manifava, P. Chandra, H.L. Roderick, A. Habermann, G. Griffiths, et N.T. Ktistakis. 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate et dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol*. 182:685–701.

Baba, M., K. Takeshige, N. Baba, et Y. Ohsumi. 1994. Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: detection of autophagosomes et their characterization *J Cell Biol*. 124:903–913.

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

Babu, J.R., T. Geetha, et M.W. Wooten. 2005. Sequestosome 1/p62 shuttles polyubiquitinated tau for proteasomal degradation. *J Neurochem*. 94:192–203.

Backer, J.M., L. Bourret, et J.F. Dice. 1983. Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A requires the amino-terminal 20 amino acids *Proc Natl Acad Sci USA*. 80:2166–2170.

Backer, J.M., et J.F. Dice. 1986. Covalent linkage of ribonuclease S-peptide to microinjected proteins causes their intracellular degradation to be enhanced during serum withdrawal *Proc Natl Acad Sci USA*. 83:5830–5834.

Baginski, M., H. Resat, et J.A. McCammon. 1997. Molecular properties of amphotericin B membrane channel: a molecular dynamics simulation *Mol Pharmacol*. 52:560–570.

Balch, W.E., R.I. Morimoto, A. Dillin, et J.W. Kelly. 2008. Adapting proteostasis for disease intervention. *Science*. 319:916–919.

Ballard, C., S. Gauthier, A. Corbett, C. Brayne, D. Aarsland, et E. Jones. 2011. Alzheimer's disease *Lancet*. 377:1019–1031.

Bandyopadhyay, U., S. Sridhar, S. Kaushik, R. Kiffin, et A.M. Cuervo. 2010. Identification of regulators of chaperone-mediated autophagy *Mol Cell*. 39:535–547.

Bandyopadhyay, U., et A.M. Cuervo. 2008. Entering the lysosome through a transient gate by chaperone-mediated autophagy *Autophagy*. 4:1101–1103.

Banerjee, R., M.F. Beal, et B. Thomas. 2010. Autophagy in neurodegenerative disorders: pathogenic roles et therapeutic implications *Trends Neurosci*. 33:541–549.

Bartke, A., J.C. Wright, J.A. Mattison, D.K. Ingram, R.A. Miller, et G.S. Roth. 2001. Extending the lifespan of long-lived mice *Nature*. 414:412.

Batlevi, Y., D.N. Martin, U.B. Pandey, C.R. Simon, C.M. Powers, J.P. Taylor, et E.H. Baehrecke. 2010. Dynein light chain 1 is required for autophagy, protein clearance, et cell death in *Drosophila* *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:742–747.

Baugh, J.M., E.G. Viktorova, et E.V. Pilipenko. 2009. Proteasomes can degrade a significant proportion of cellular proteins independent of ubiquitination. *J Mol Biol*. 386:814–827.

Baumann, K., E.M. Mandelkow, J. Biernat, H. Piwnica-Worms, et E. Mandelkow. 1993. Abnormal Alzheimer-like phosphorylation of tau-protein by cyclin-dependent kinases cdk2 et cdk5 *FEBS Lett*. 336:417–424.

Baumeister, W., J. Walz, F. Zühl, et E. Seemüller. 1998. The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell*. 92:367–380.

- Beaulaton, J., et R.A. Lockshin. 1977. Ultrastructural study of the normal degeneration of the intersegmental muscles of *Antheraea polyphemus* et *Manduca sexta* (Insecta, Lepidoptera) with particular reference of cellular autophagy *J. Morphol* 154:39–57.
- Bedford, L., S. Paine, N. Rezvani, M. Mee, J. Lowe, et R.J. Mayer. 2009. The UPS et autophagy in chronic neurodegenerative disease: six of one et half a dozen of the other--or not *Autophagy*. 5:224–227.
- Bedford, L. 2010. Assembly, structure, et function of the 26S proteasome *Trends Cell Biol*. 20:391–401.
- Beevers, C.S., L. Chen, L. Liu, Y. Luo, N.J.G. Webster, et S. Huang. 2009. Curcumin disrupts the Mammalian target of rapamycin-raptor complex *Cancer Res*. 69:1000–1008.
- Belbin, O., M.M. Carrasquillo, M. Crump, O.J. Culley, T.A. Hunter, L. Ma, G. Bisceglia, F. Zou, M. Allen, D.W. Dickson, N.R. Graff-Radford, R.C. Petersen, K. Morgan, et S.G. Younkin. 2011. Investigation of 15 of the top candidate genes for late-onset Alzheimer's disease *Hum. Genet* 129:273–282.
- Belletato, C.M., et M. Scarpa. 2010. Pathophysiology of neuropathic lysosomal storage disorders *J. Inherit. Metab. Dis* 33:347–362.
- Bence, N.F., R.M. Sampat, et R.R. Kopito. 2001. Impairment of the ubiquitin-proteasome system by protein aggregation *Science*. 292:1552–1555.
- Berger, Z., E.K. Tfofi, C.H. Michel, M.Y. Pasco, S. Tenant, D.C. Rubinsztein, et C.J. O'Kane. 2005. Lithium rescues toxicity of aggregate-prone proteins in *Drosophila* by perturbing Wnt pathway *Hum Mol Genet*. 14:3003–3011.
- Berger, Z., B. Ravikumar, F.M. Menzies, L.G. Oroz, B.R. Underwood, M.N. Pangalos, I. Schmitt, U. Wullner, B.O. Evert, C.J. O'Kane, et D.C. Rubinsztein. 2006. Rapamycin alleviates toxicity of different aggregate-prone proteins *Hum Mol Genet*. 15:433–442.
- Bernales, S., K.L. McDonald, et P. Walter. 2006. Autophagy counterbalances endoplasmic reticulum expansion during the unfolded protein response *PLoS Biol* 4:e423.
- Bertram, L., et R.E. Tanzi. 2010. Alzheimer disease: New light on an old CLU *Nat Rev Neurol*. 6:11–13.
- Betin, V.M.S., et J.D. Lane. 2009a. Caspase cleavage of Atg4D stimulates GABARAP-L1 processing et triggers mitochondrial targeting et apoptosis *J Cell Sci*. 122:2554–2566.
- Betin, V.M.S., et J.D. Lane. 2009 b. Atg4D at the interface between autophagy et apoptosis *Autophagy*. 5:1057–1059.
- Biernat, J., N. Gustke, G. Drewes, E.M. Mandelkow, et E. Mandelkow. 1993. Phosphorylation of Ser262 strongly reduces binding of tau to microtubules: distinction between PHF-like immunoreactivity et microtubule binding. *Neuron*. 11:153–163.
- Bishop, J.D., W.L. Nien, S.M. Dauphinee, et C.K.L. Too. 2006. Prolactin activates mammalian target-of-rapamycin through phosphatidylinositol 3-kinase et stimulates phosphorylation of p70S6K et 4E-binding protein-1 in lymphoma cells *J. Endocrinol* 190:307–312.
- Bjørkøy, G., T. Lamark, A. Brech, H. Outzen, M. Perander, A. Overvatn, H. Stenmark, et T. Johansen. 2005. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy et has a protective effect on huntingtin-induced cell death *J Cell Biol*. 171:603–614.
- Bjørkøy, G., T. Lamark, et T. Johansen. 2006. p62/SQSTM1: a missing link between protein aggregates et the autophagy machinery *Autophagy*. 2:138–139.
- Blagosklonny, M.V. 2010. Revisiting the antagonistic pleiotropy theory of aging: TOR-driven program et quasi-program *Cell Cycle*. 9:3151–3156.
- Blankson, H., I. Holen, et P.O. Seglen. 1995. Disruption of the cyokeratin cytoskeleton et inhibition of hepatocytic autophagy by okadaic acid *Exp Cell Res*. 218:522–530.
- Blennow, K., M.J. de Leon, et H. Zetterberg. 2006. Alzheimer's disease *Lancet*. 368:387–403.
- Boland, B., A. Kumar, S. Lee, F.M. Platt, J. Wegiel, W.H. Yu, et R.A. Nixon. 2008. Autophagy induction et autophagosome clearance in neurons: relationship to autophagic pathology in Alzheimer's disease *J Neurosci*. 28:6926–6937.
- Boland, B., D.A. Smith, D. Mooney, S.S. Jung, D.M. Walsh, et F.M. Platt. 2010. Macroautophagy is not directly involved in the metabolism of amyloid precursor protein *J Biol Chem*. 285:37415–37426.
- Boland, B., et R.A. Nixon. 2006. Neuronal macroautophagy: from development to degeneration *Mol Aspects Med*. 27:503–519.
- Bosco, D.A., G. Morfini, N.M. Karabacak, Y. Song, F. Gros-Louis, P. Pasinelli, H. Goolsby, B.A. Fontaine, N. Lemay, D. McKenna-Yasek, M.P. Frosch, J.N. Agar, J. Julien, S.T. Brady, et R.H. Brown. 2010. Wild-type et mutant SOD1 share an aberrant conformation et a common pathogenic pathway in ALS *Nat Neurosci*. 13:1396–1403.
- Botti, J., M. Djavaheri-Mergny, Y. Pilatte, et P. Codogno. 2006. Autophagy signaling et the cogwheels of cancer *Autophagy*. 2:67–73.
- Braak, H., et E. Braak. 1991. Neuropathological stageing of Alzheimer-related changes *Acta Neuropathol*. 82:239–259.
- Brajtburg, J., W.G. Powderly, G.S. Kobayashi, et G. Medoff. 1990. Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action *Antimicrob. Agents Chemother* 34:183–188.

- Brookmeyer, R., E. Johnson, K. Ziegler-Graham, et H.M. Arrighi. 2007. Forecasting the global burden of Alzheimer's disease *Alzheimers Dement.* 3:186–191.
- Brown-Borg, H.M., K.E. Borg, C.J. Meliska, et A. Bartke. 1996. Dwarf mice et the ageing process *Nature.* 384:33.
- Brugarolas, J., K. Lei, R.L. Hurley, B.D. Manning, J.H. Reiling, E. Hafen, L.A. Witters, L.W. Ellisen, et W.G. Kaelin. 2004. Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 et the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex *Genes Dev.* 18:2893–2904.
- Bruijn, L.I., T.M. Miller, et D.W. Cleveland. 2004. Unraveling the mechanisms involved in motor neuron degeneration in ALS. *Annu. Rev. Neurosci.* 27:723–749.
- Buchman, A.S., J.A. Schneider, S. Leurgans, et D.A. Bennett. 2008. Physical frailty in older persons is associated with Alzheimer disease pathology *Neurology.* 71:499–504.
- Budovskaya, Y.V., J.S. Stephan, F. Reggiori, D.J. Klionsky, et P.K. Herman. 2004. The Ras/cAMP-dependent protein kinase signaling pathway regulates an early step of the autophagy process in *Saccharomyces cerevisiae* *J Biol Chem.* 279:20663–20671.
- Budovskaya, Y.V., J.S. Stephan, S.J. Deminoff et P.K. Herman. 2005. An evolutionary proteomics approach identifies substrates of the cAMP-dependent protein kinase *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:13933–13938.
- Buee, L., T. Bussiere, V. Buee-Scherrer, A. Delacourte, et P. Hof. 2000. Tau protein isoforms, phosphorylation et role in neurodegenerative disorders. *Brain Res Brain Res Rev.* 33:95–130.
- Burman, C., et N.T. Ktistakis. 2010. Regulation of autophagy by phosphatidylinositol 3-phosphate. *FEBS Lett.* 584:1302–1312.
- Butler, D., R.A. Nixon, et B.A. Bahr. 2006. Potential compensatory responses through autophagic/lysosomal pathways in neurodegenerative diseases *Autophagy.* 2:234–237.
- Byfield, M.P., J.T. Murray, et J.M. Backer. 2005. hVPS34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase *J Biol Chem.* 280:33076–33082.
- Cabrera, S., G. Mariño, A.F. Fernández, et C. López-Otín. 2010. Autophagy, proteases et the sense of balance *Autophagy.* 6:961–963.
- Cadwell, K., J. Liu, S. Brown, H. Miyoshi, J. Loh, J. Lennerz, C. Kishi, W. Kc, J. Carrero, S. Hunt, C. Stone, E. Brunt, R. Xavier, B. Sleckman, E. Li, N. Mizushima, T. Stappenbeck, et H. Virgin. 2008. A key role for autophagy et the autophagy gene Atg16l1 in mouse et human intestinal Paneth cells. *Nature.* 456:259–263.
- Cadwell, K., K.K. Patel, M. Komatsu, H.W. Virgin, et T.S. Stappenbeck. 2009. A common role for Atg16L1, Atg5 et Atg7 in small intestinal Paneth cells et Crohn disease. *Autophagy.* 5:250–252.
- Cai, Q., L. Lu, J. Tian, Y. Zhu, H. Qiao, et Z. Sheng. 2010. Snapin-regulated late endosomal transport is critical for efficient autophagy-lysosomal function in neurons *Neuron.* 68:73–86.
- Cai, Q., et Z. Sheng. 2011. Uncovering the role of Snapin in regulating autophagy-lysosomal function *Autophagy.* 7.
- Callahan, J.W., R.D. Bagshaw, et D.J. Mahuran. 2009. The integral membrane of lysosomes: its proteins et their roles in disease. *Journal of Proteomics.* 72:23–33.
- Cardenas, M.E., N.S. Cutler, M.C. Lorenz, C.J. Di Como, et J. Heitman. 1999. The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients. *Genes Dev.* 13:3271–3279.
- Carter, A.P., C. Cho, L. Jin, et R.D. Vale. 2011. Crystal structure of the dynein motor domain *Science.* 331:1159–1165.
- Castellani, R.J., R.K. Rolston, et M.A. Smith. 2010. Alzheimer disease. *Dis Mon.* 56:484–546.
- Cataldo, A.M., G.W. Rebeck, B. Ghetti, C. Hulette, C. Lippa, C. Van Broeckhoven, C. van Duijn, P. Cras, N. Bogdanovic, T. Bird, C. Peterhoff, et R.A. Nixon. 2001. Endocytic disturbances distinguish among subtypes of Alzheimer's disease et related disorders. *Ann Neurol.* 50:661–665.
- Cataldo, A.M., J.L. Barnett, S.A. Berman, J. Li, S. Quarless, S. Bursztajn, C. Lippa, et R.A. Nixon. 1995. Gene expression et cellular content of cathepsin D in Alzheimer's disease brain: evidence for early up-regulation of the endosomal-lysosomal system *Neuron.* 14:671–680.
- Cataldo, A.M., J.L. Barnett, D.M. Mann, et R.A. Nixon. 1996. Colocalization of lysosomal hydrolase et beta-amyloid in diffuse plaques of the cerebellum et striatum in Alzheimer's disease et Down's syndrome. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55:704–715.
- Cataldo, A.M., J.L. Barnett, C. Pieroni, et R.A. Nixon. 1997. Increased neuronal endocytosis et protease delivery to early endosomes in sporadic Alzheimer's disease: neuropathologic evidence for a mechanism of increased beta-amyloidogenesis *J Neurosci.* 17:6142–6151.
- Cazzaniga, E., A. Bulbarelli, E. Lonati, A. Orlando, F. Re, M. Gregori, et M. Masserini. 2011. Abeta Peptide Toxicity is Reduced After Treatments Decreasing Phosphatidylethanolamine Content in Differentiated Neuroblastoma Cells *Neurochem Res.* 36:863–869.
- Cecconi, F., M. Piacentini, et G.M. Fimia. 2008. The involvement of cell death et survival in neural tube defects: a distinct role for apoptosis et autophagy *Cell Death Differ.* 15:1170–1177.

Chakrama, F.Z., S. Seguin-Py, J.N. Le Grand, A. Fraichard, R. Delage-Mourroux, G. Despouy, V. Perez, M. Jouvenot, et M. Boyer-Guittaut. 2010. GABARAPL1 (GEC1) associates with autophagic vesicles *Autophagy*. 6.

Chang, N.C., M. Nguyen, M. Germain, et G.C. Shore. 2010. Antagonism of Beclin 1-dependent autophagy by BCL-2 at the endoplasmic reticulum requires NAF-1 *EMBO J*. 29:606–618.

Chaumorcel, M., S. Souquère, G. Pierron, P. Codogno, et A. Esclatine. 2008. Human cytomegalovirus controls a new autophagy-dependent cellular antiviral defense mechanism *Autophagy*. 4:46–53.

Chen, J., R.T. Peterson, et S.L. Schreiber. 1998. Alpha 4 associates with protein phosphatases 2A, 4, et 6. *Biochem Biophys Res Commun*. 247:827–832.

Chen, S., B. Li, I. Grundke-Iqbal, et K. Iqbal. 2008a. 11PP2A affects tau phosphorylation via association with the catalytic subunit of protein phosphatase 2A. *J Biol Chem*. 283:10513–10521.

Chen, W., Y. Liao, H. Yu, I.H. Cheng, et Y. Chen. 2011a. Distinct effects of Zn²⁺, Cu²⁺, Fe³⁺, et Al³⁺ on amyloid-beta stability, oligomerization, et aggregation: amyloid-beta destabilization promotes annular protofibril formation *J Biol Chem*. 286:9646–9656.

Chen, Y., E. McMillan-Ward, J. Kong, S.J. Israels, et S.B. Gibson. 2007. Mitochondrial electron-transport-chain inhibitors of complexes I et II induce autophagic cell death mediated by reactive oxygen species *J Cell Sci*. 120:4155–4166.

Chen, Y., E. McMillan-Ward, J. Kong, S.J. Israels, et S.B. Gibson. 2008b. Oxidative stress induces autophagic cell death independent of apoptosis in transformed et cancer cells *Cell Death Differ*. 15:171–182.

Chen, Y., S. Wang, X. Lu, H. Zhang, Y. Fu, et Y. Luo. 2011b. Cholesterol sequestration by nystatin enhances the uptake et activity of endostatin in endothelium via regulating distinct endocytic pathways *Blood*. 117:6392–6403.

Chen, Y., et D.J. Klionsky. 2011. The regulation of autophagy - unanswered questions. *J Cell Sci*. 124:161–170.

Chen, Y., et S.B. Gibson. 2008. Is mitochondrial generation of reactive oxygen species a trigger for autophagy *Autophagy*. 4:246–248.

Cheng, H., S.R. Kim, T.F. Oo, T. Kareva, O. Yarygina, M. Rzhetskaya, C. Wang, M. Doring, Z. Tallozy, K. Tanaka, M. Komatsu, K. Kobayashi, H. Okano, N. Kholodilov, et R.E. Burke. 2011. Akt suppresses retrograde degeneration of dopaminergic axons by inhibition of macroautophagy *J Neurosci*. 31:2125–2135.

Cheng, J., Y. Ohsaki, K. Tauchi-Sato, A. Fujita, et T. Fujimoto. 2006. Cholesterol depletion induces autophagy *Biochem Biophys Res Commun*. 351:246–252.

Cherra, S.J., S.M. Kulich, G. Uechi, M. Balasubramani, J. Mountzouris, B.W. Day, et C.T. Chu. 2010. Regulation of the autophagy protein LC3 by phosphorylation *J Cell Biol*. 190:533–539.

Chételat, G. 2011. La neuro-imagerie au service de la maladie d'Alzheimer. *Med Sci (Paris)*. 27:193–198.

Chiang, H.L., et J.F. Dice. 1988. Peptide sequences that target proteins for enhanced degradation during serum withdrawal *J Biol Chem*. 263:6797–6805.

Chibnik, L.B., J.M. Shulman, S.E. Leurgans, J.A. Schneider, R.S. Wilson, D. Tran, C. Aubin, A.S. Buchman, C.B. Heward, A.J. Myers, J.A. Hardy, M.J. Huentelman, J.J. Corneveaux, E.M. Reiman, D.A. Evans, D.A. Bennett, et P.L. De Jager. 2011. CR1 is associated with amyloid plaque burden et age-related cognitive decline *Ann Neurol*. 69:560–569.

Cho, D., Y.J. Choi, S.A. Jo, J. Ryou, J.Y. Kim, J. Chung, et I. Jo. 2006. Troglitazone acutely inhibits protein synthesis in endothelial cells via a novel mechanism involving protein phosphatase 2A-dependent p70 S6 kinase inhibition *Am J Physiol, Cell Physiol*. 291:C317–26.

Cho, D., Y.K. Jo, J.J. Hwang, Y.M. Lee, S.A. Roh, et J.C. Kim. 2009. Caspase-mediated cleavage of ATG6/Beclin-1 links apoptosis to autophagy in HeLa cells *Cancer Lett* 274:95–100.

Chu, C.T., J. Zhu, et R. Dagda. 2007. Beclin 1-independent pathway of damage-induced mitophagy et autophagic stress: implications for neurodegeneration et cell death *Autophagy*. 3:663–666.

Chung, S. 2009. Aberrant phosphorylation in the pathogenesis of Alzheimer's disease *BMB Rep*. 42:467–474.

Chung, S., H. Yao, S. Caito, J. Hwang, G. Arunachalam, et I. Rahman. 2010. Regulation of SIRT1 in cellular functions: role of polyphenols. *Arch Biochem Biophys*. 501:79–90.

Ciechanover, A. 2005. Proteolysis: from the lysosome to ubiquitin et the proteasome. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:79–87.

Ciechanover, A. 2009. Tracing the history of the ubiquitin proteolytic system: the pioneering article *Biochem Biophys Res Commun*. 387:1–10.

Ciechanover, A., S. Elias, H. Heller, S. Ferber, et A. Hershko. 1980. Characterization of the heat-stable polypeptide of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes *J Biol Chem*. 255:7525–7528.

Ciechomska, I.A., G.C. Goemans, J.N. Skepper, et A.M. Tolkovsky. 2009. Bcl-2 complexed with Beclin-1 maintains full anti-apoptotic function *Oncogene*. 28:2128–2141.

Clarke, P.G. 1990. Developmental cell death: morphological diversity et multiple mechanisms *Anat. Embryol* 181:195–213.

Clausen, T.H., T. Lamark, P. Isakson, K. Finley, K.B. Larsen, A. Brech, A. Overvatn, H. Stenmark, G. Bjørkøy, A. Simonsen, et T. Johansen. 2010. p62/SQSTM1 et ALFY interact to facilitate the formation of p62 bodies/ALIS et their degradation by autophagy *Autophagy*. 6:330–344.

Clement, A.B., M. Gamerding, I.Y. Tamboli, D. Lütjohann, J. Walter, I. Greeve, G. Gimpl, et C. Behl. 2009. Adaptation of neuronal cells to chronic oxidative stress is associated with altered cholesterol et sphingolipid homeostasis et lysosomal function *J Neurochem*. 111:669–682.

Codogno, P. 2004. [ATG genes et macroautophagy] *Med Sci (Paris)*. 20:734–736.

Cohen, A., et M.N. Hall. 2009. An amino acid shuffle activates mTORC1 *Cell*. 136:399–400.

Cohen, B.E., G. Benaim, M.C. Ruiz, et F. Michelangeli. 1990. Increased calcium permeability is not responsible for the rapid lethal effects of amphotericin B on *Leishmania* sp *FEBS Lett*. 259:286–288.

Colman, R.J., R.M. Anderson, S.C. Johnson, E.K. Kastman, K.J. Kosmatka, T.M. Beasley, D.B. Allison, C. Cruzen, H.A. Simmons, J.W. Kemnitz, et R. Weindruch. 2009. Caloric restriction delays disease onset et mortality in rhesus monkeys. *Science*. 325:201–204.

Conde, C., et A. Caceres. 2009. Microtubule assembly, organization et dynamics in axons et dendrites *Nat Rev Neurosci*. 10:319–332.

Cooper, S.J. 2008. From Claude Bernard to Walter Cannon. Emergence of the concept of homeostasis. *Appetite*. 51:419–427.

Corcelle, E., N. Djerbi, M. Mari, M. Nebout, C. Fiorini, P. Fénichel, P. Hofman, P. Poujeol, et B. Mograbi. 2007. Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK et p38: lessons from environmental carcinogens *Autophagy*. 3:57–59.

Corder, E.H., A.M. Saunders, W.J. Strittmatter, D.E. Schmechel, P.C. Gaskell, G.W. Small, A.D. Roses, J.L. Haines, et M.A. Pericak-Vance. 1993. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele et the risk of Alzheimer's disease in late onset families *Science*. 261:921–923.

Cordy, J.M., I. Hussain, C. Dingwall, N.M. Hooper, et A.J. Turner. 2003. Exclusively targeting beta-secretase to lipid rafts by GPI-anchor addition up-regulates beta-site processing of the amyloid precursor protein *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:11735–11740.

Corneveaux, J.J., A.J. Myers, A.N. Allen, J.J. Pruzin, M. Ramirez, A. Engel, M.A. Nalls, K. Chen, W. Lee, K. Chewning, S.E. Villa, H.B. Meechoovet, J.D. Gerber, D. Frost, H.L. Benson, S. O'Reilly, L.B. Chibnik, J.M. Shulman, A.B. Singleton, D.W. Craig, K.R. Van Keuren-Jensen, T. Dunckley, D.A. Bennett, P.L. De Jager, C. Heward, J. Hardy, E.M. Reiman, et M.J. Huentelman. 2010. Association of CR1, CLU et PICALM with Alzheimer's disease in a cohort of clinically characterized et neuropathologically verified individuals *Hum Mol Genet*. 19:3295–3301.

Crews, L., B. Spencer, P. Desplats, C. Patrick, A. Paulino, E. Rockenstein, L. Hansen, A. Adame, D. Galasko, et E. Masliah. 2010. Selective molecular alterations in the autophagy pathway in patients with Lewy body disease et in models of alpha-synucleinopathy *PLoS ONE*. 5:e9313.

Criollo, A., M.C. Maiuri, E. Tasdemir, I. Vitale, A.A. Fiebig, D. Andrews, J. Molgó, J. Díaz, S. Lavandro, F. Harper, G. Pierron, D. di Stefano, R. Rizzuto, G. Szabadkai, et G. Kroemer. 2007. Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor *Cell Death Differ*. 14:1029–1039.

Criollo, A., P. Dessen, et G. Kroemer. 2009. DRAM: a phylogenetically ancient regulator of autophagy *Cell Cycle*. 8:2319–2320.

Cuervo, A.M. 2004. Autophagy: many paths to the same end *Mol. Cell. Biochem* 263:55–72.

Cuervo, A.M. 2010. The plasma membrane brings autophagosomes to life *Nat Cell Biol*. 12:735–737.

Cuervo, A.M., L. Mann, E.J. Bonten, A. d'Azzo, et J.F. Dice. 2003. Cathepsin A regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor *EMBO J*. 22:47–59.

Cuervo, A.M., et J.F. Dice 1998. How do intracellular proteolytic systems change with age *Front. Biosci* 3:d25–43.

Cuervo, A.M., et J.F. Dice 2000a. When lysosomes get old *Exp Gerontol*. 35:119–131.

Cuervo, A.M., et J.F. Dice. 2000b. Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane *Traffic*. 1:570–583.

Cuervo, A.M., et J.F. Dice. 2000c. Age-related decline in chaperone-mediated autophagy *J Biol Chem*. 275:31505–31513.

Cutler, N.S., J. Heitman, et M.E. Cardenas. 1999. TOR kinase homologs function in a signal transduction pathway that is conserved from yeast to mammals. *Mol Cell Endocrinol*. 155:135–142.

Czub, J., et M. Baginski. 2006. Modulation of amphotericin B membrane interaction by cholesterol et ergosterol—a molecular dynamics study *J Phys Chem B*. 110:16743–16753.

Dagda, R.K., J. Zhu, S.M. Kulich, et C.T. Chu. 2008. Mitochondrially localized ERK2 regulates mitophagy et autophagic cell stress: implications for Parkinson's disease *Autophagy*. 4:770–782.

Dagda, R.K., S.J. Cherra, S.M. Kulich, A. Tandon, D. Park, et C.T. Chu. 2009. Loss of PINK1 function promotes mitophagy through effects on oxidative stress et mitochondrial fission *J Biol Chem*. 284:13843–13855.

- Dahl, vom, S., F. Schliess, R. Reissman, B. Görg, O. Weiergräber, M. Kocalkova, F. Dombrowski, et D. Haussinger. 2003. Involvement of integrins in osmosensing et signaling toward autophagic proteolysis in rat liver *J Biol Chem*. 278:27088–27095.
- Dahl, vom, S., F. Dombrowski, M. Schmitt, F. Schliess, U. Pfeifer, et D. Haussinger. 2001. Cell hydration controls autophagosome formation in rat liver in a microtubule-dependent way downstream from p38MAPK activation *Biochem J*. 354:31–36.
- Dames, S.A. 2005. The Solution Structure of the FATC Domain of the Protein Kinase Target of Rapamycin Suggests a Role for Redox-dependent Structural et Cellular Stability. *Journal of Biological Chemistry*. 280:20558–20564.
- David, D.C., R. Layfield, L. Serpell, Y. Narain, M. Goedert, et M.G. Spillantini. 2002. Proteasomal degradation of tau protein. *J Neurochem*. 83:176–185.
- De Baere, I., R. Derua, V. Janssens, C. Van Hoof, E. Waelkens, W. Merlevede, et J. Goris. 1999. Purification of porcine brain protein phosphatase 2A leucine carboxyl methyltransferase et cloning of the human homologue *Biochemistry*. 38:16539–16547.
- de Duve, C. 2005. The lysosome turns fifty *Nat Cell Biol*. 7:847–849.
- de Duve, C., B.C. PRESSMAN, R. GIANETTO, R. Wattiaux, et F. APPELMANS. 1955. Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue *Biochem J*. 60:604–617.
- de Duve, C., et R. Wattiaux. 1966. Functions of lysosomes *Annu. Rev. Physiol* 28:435–492.
- De Strooper, B. 2003. Aph-1, Pen-2, et Nicastrin with Presenilin generate an active gamma-Secretase complex *Neuron*. 38:9–12.
- Deas, E., N.W. Wood, et H. Plun-Favreau. 2011. Mitophagy et Parkinson's disease: the PINK1-parkin link *Biochim Biophys Acta*. 1813:623–633.
- Debnath, J., E.H. Baehrecke, et G. Kroemer. 2005. Does autophagy contribute to cell death *Autophagy*. 1:66–74.
- Decuyper, J., G. Monaco, G. Bultynck, L. Missiaen, H. De Smedt, et J.B. Parys. 2010. The IP(3) receptor-mitochondria connection in apoptosis et autophagy *Biochim Biophys Acta*.
- Degenhardt, K., R. Mathew, B. Beaudoin, K. Bray, D. Anderson, G. Chen, C. Mukherjee, Y. Shi, C. Gelinas, Y. Fan, D. Nelson, S. Jin, et E. White. 2006. Autophagy promotes tumor cell survival et restricts necrosis, inflammation, et tumorigenesis. *Cancer Cell*. 10:51–64.
- Dehay, B., J. Bové, N. Rodríguez-Muela, C. Perier, A. Recasens, P. Boya, et M. Vila. 2010. Pathogenic lysosomal depletion in Parkinson's disease *J Neurosci*. 30:12535–12544.
- del Roso, A., S. Vittorini, G. Cavallini, A. Donati, Z. Gori, M. Masini, M. Pollera, et E. Bergamini. 2003. Ageing-related changes in the in vivo function of rat liver macroautophagy et proteolysis. *Exp Gerontol*. 38:519–527.
- Delobel, P., O. Leroy, M. Hamdane, A.V. Sambo, A. Delacourte, et L. Buee. 2005. Proteasome inhibition et Tau proteolysis: an unexpected regulation *FEBS Lett*. 579:1–5.
- Demarchi, F., C. Bertoli, T. Copetti, I. Tanida, C. Brancolini, E. Eskelinen, et C. Schneider. 2006. Calpain is required for macroautophagy in mammalian cells *J Cell Biol*. 175:595–605.
- Demarchi, F., C. Bertoli, T. Copetti, E. Eskelinen, et C. Schneider 2007. Calpain as a novel regulator of autophagosome formation *Autophagy*. 3:235–237.
- Deminoff, S.J., et P.K. Herman. 2007. Identifying Atg1 substrates: four means to an end *Autophagy*. 3:667–673.
- Demontis, F., et N. Perrimon. 2010. FOXO/4E-BP signaling in Drosophila muscles regulates organism-wide proteostasis during aging *Cell*. 143:813–825.
- Dengjel, J., A.R. Kristensen, et J.S. Andersen. 2008. Ordered bulk degradation via autophagy *Autophagy*. 4:1057–1059.
- Denton, D., B. Shrivage, R. Simin, K. Mills, D. Berry, E. Baehrecke, et S. Kumar. 2009. Autophagy, not apoptosis, is essential for midgut cell death in Drosophila. *Curr Biol*. 19:1741–1746.
- Deretic, V. 2010a. A Master Conductor for Aggregate Clearance by Autophagy. *Developmental Cell*. 18:694–696.
- Deretic, V. 2010b. Similarities in autophagic clearance of mitochondria et microbes – more than a mere coincidence? Oral presentation *68th Harden Conference*
- Deretic, V. 2011a. Thematic issue on how autophagosomes find their targets *Autophagy*. 7:257–259.
- Deretic, V. 2011b. Autophagy in immunity et cell-autonomous defense against intracellular microbes *Immunol. Rev* 240:92–104.
- Deter, R.L., et C. de Duve. 1967. Influence of glucagon, an inducer of cellular autophagy, on some physical properties of rat liver lysosomes *J Cell Biol*. 33:437–449.
- Di Bartolomeo, S., F. Nazio, et F. Cecconi. 2010a. The role of autophagy during development in higher eukaryotes *Traffic*. 11:1280–1289.
- Di Bartolomeo, S., M. Corazzari, F. Nazio, S. Oliverio, G. Lisi, M. Antonioli, V. Pagliarini, S. Matteoni, C. Fuoco, L. Giunta, M. D'Amelio, R. Nardacci, A. Romagnoli, M. Piacentini, F. Cecconi, et G.M. Fimia. 2010b. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy *J Cell Biol*. 191:155–168.

- Di Como, C.J., et K.T. Arndt. 1996. Nutrients, via the Tor proteins, stimulate the association of Tap42 with type 2A phosphatases. *Genes Dev.* 10:1904–1916.
- Di Como, C.J., et Y. Jiang. 2006. The association of Tap42 phosphatase complexes with TORC1: another level of regulation in Tor signaling. *Cell Cycle.* 5:2729–2732.
- Dice, J.F., H.L. Chiang, E.P. Spencer, et J.M. Backer. 1986. Regulation of catabolism of microinjected ribonuclease A. Identification of residues 7-11 as the essential pentapeptide *J Biol Chem.* 261:6853–6859.
- Ding, Q., V. Cecarini, et J.N. Keller. 2007. Interplay between protein synthesis et degradation in the CNS: physiological et pathological implications. *Trends Neurosci.* 30:31–36.
- Dixit, R., J.L. Ross, Y.E. Goldman, et E.L.F. Holzbaur. 2008. Differential regulation of dynein et kinesin motor proteins by tau *Science.* 319:1086–1089.
- Djavaheiri-Mergny, M., M.C. Maiuri, et G. Kroemer. 2010. Cross talk between apoptosis et autophagy by caspase-mediated cleavage of Beclin 1 *Oncogene.* 29:1717–1719.
- Dolan, P.J., et G.V.W. Johnson. 2010. A caspase cleaved form of tau is preferentially degraded through the autophagy pathway. *J Biol Chem.* 285:21978–21987.
- Donaldson, K.M., W. Li, K.A. Ching, S. Batalov, C. Tsai, et C.A.P. Joazeiro. 2003. Ubiquitin-mediated sequestration of normal cellular proteins into polyglutamine aggregates *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:8892–8897.
- Douglas, P.M., et A. Dillin. 2010. Protein homeostasis et aging in neurodegeneration. *J Cell Biol.* 190:719–729.
- Dove, S.K., R.C. Piper, R.K. McEwen, J.W. Yu, M.C. King, D.C. Hughes, J. Thuring, A.B. Holmes, F.T. Cooke, R.H. Michell, P.J. Parker, et M.A. Lemmon. 2004. Svp1p defines a family of phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate effectors *EMBO J.* 23:1922–1933.
- Drewes, G., B. Trinczek, S. Illenberger, J. Biernat, G. Schmitt-Ulms, H.E. Meyer, E.M. Mandelkow, et E. Mandelkow. 1995. Microtubule-associated protein/microtubule affinity-regulating kinase (p110mark). A novel protein kinase that regulates tau-microtubule interactions et dynamic instability by phosphorylation at the Alzheimer-specific site serine 262 *J Biol Chem.* 270:7679–7688.
- Du, Y., M.C. Wooten, M. Gearing, et M.W. Wooten. 2009a. Age-associated oxidative damage to the p62 promoter: implications for Alzheimer disease *Free Radic Biol Med.* 46:492–501.
- Du, Y., M.C. Wooten, et M.W. Wooten. 2009b. Oxidative damage to the promoter region of SQSTM1/p62 is common to neurodegenerative disease *Neurobiol Dis.* 35:302–310.
- Dubois, B., H.H. Feldman, C. Jacova, S.T. Dekosky, P. Barberger-Gateau, J. Cummings, A. Delacourte, D. Galasko, S. Gauthier, G. Jicha, K. Meguro, J. O'Brien, F. Pasquier, P. Robert, M. Rossor, S. Salloway, Y. Stern, P.J. Visser, et P. Scheltens. 2007. Research criteria for the diagnosis of Alzheimer's disease: revising the NINCDS-ADRDA criteria *Lancet Neurol.* 6:734–746.
- Dubois, B., H.H. Feldman, C. Jacova, J.L. Cummings, S.T. Dekosky, P. Barberger-Gateau, A. Delacourte, G. Frisoni, N.C. Fox, D. Galasko, S. Gauthier, H. Hampel, G.A. Jicha, K. Meguro, J. O'Brien, F. Pasquier, P. Robert, M. Rossor, S. Salloway, M. Sarazin, L.C. de Souza, Y. Stern, P.J. Visser, et P. Scheltens. 2010. Revising the definition of Alzheimer's disease: a new lexicon *In Lancet neurology.* 1118–1127.
- Dubouloz, F., O. Deloche, V. Wanke, E. Cameroni, et C. de Virgilio. 2005. The TOR et EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Mol Cell.* 19:15–26.
- Duran, A., M. Serrano, M. Leitges, J.M. Flores, S. Picard, J.P. Brown, J. Moscat, et M.T. Diaz-Meco. 2004. The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis *Dev Cell.* 6:303–309.
- Duran, A., J.F. Linares, A.S. Galvez, K. Wikenheiser, J.M. Flores, M.T. Diaz-Meco, et J. Moscat. 2008. The signaling adaptor p62 is an important NF-kappaB mediator in tumorigenesis *Cancer Cell.* 13:343–354.
- Dutcher, J.D., M.B. Young, J.H. Sherman, W. Hibbits, et D.R. Walters. 1956. Chemical studies on amphotericin B. I. Preparation of the hydrogenation product et isolation of mycosamine, an acetolysis product *Antibiot Annu.* 866–869.
- Efe, J.A., R.J. Botelho, et S.D. Emr. 2007. Atg18 regulates organelle morphology et Fab1 kinase activity independent of its membrane recruitment by phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate *Mol Biol Cell.* 18:4232–4244.
- Egami, Y., S. Kiryu-Seo, T. Yoshimori, et H. Kiyama. 2005. Induced expressions of Rab24 GTPase et LC3 in nerve-injured motor neurons *Biochem Biophys Res Commun.* 337:1206–1213.
- Egan, D.F., J. Kim, R.J. Shaw, et K.L. Guan 2011a. The autophagy initiating kinase ULK1 is regulated via opposing phosphorylation by AMPK et mTOR *Autophagy.* 7.
- Egan, D.F., D.B. Shackelford, M.M. Mihaylova, S. Gelino, R.A. Kohnz, W. Mair, D.S. Vasquez, A. Joshi, D.M. Gwinn, R. Taylor, J.M. Asara, J. Fitzpatrick, A. Dillin, B. Viollet, M. Kundu, M. Hansen, et R.J. Shaw. 2011b. Phosphorylation of ULK1 (hATG1) by AMP-activated protein kinase connects energy sensing to mitophagy *Science.* 331:456–461.
- Eichhorn, P.J.A., M.P. Creighton, et R. Bernards. 2009. Protein phosphatase 2A regulatory subunits et cancer *Biochim Biophys Acta.* 1795:1–15.
- Eisenberg-Lerner, A., S. Bialik, H. Simon, et A. Kimchi. 2009. Life et death partners: apoptosis, autophagy et the cross-talk between them *Cell Death Differ.* 16:966–975.

- Elazar, Z., R. Scherz-Shouval, et H. Shorer. 2003. Involvement of LMA1 et GATE-16 family members in intracellular membrane dynamics *Biochim Biophys Acta*. 1641:145–156.
- Ellington, A.A., M.A. Berhow, et K.W. Singletary. 2006. Inhibition of Akt signaling et enhanced ERK1/2 activity are involved in induction of macroautophagy by triterpenoid B-group soyasaponins in colon cancer cells *Carcinogenesis*. 27:298–306.
- Elmore, S.P., T. Qian, S.F. Grissom, et J.J. Lemasters. 2001. The mitochondrial permeability transition initiates autophagy in rat hepatocytes *FASEB J*. 15:2286–2287.
- Eskelinen, E.-L., A.R. Prescott, J. Cooper, S.M. Brachmann, L. Wang, X. Tang, J.M. Backer, and J.M. Lucocq. 2002. Inhibition of autophagy in mitotic animal cells *Traffic*. 3:878–893.
- Eskelinen, E. 2005. Maturation of autophagic vacuoles in Mammalian cells *Autophagy*. 1:1–10.
- Eskelinen, E. 2006. Roles of LAMP-1 et LAMP-2 in lysosome biogenesis et autophagy *Mol Aspects Med*. 27:495–502.
- Eskelinen, E. 2008. Fine structure of the autophagosome *Methods Mol Biol*. 445:11–28.
- Eskelinen, E., A.L. Illert, Y. Tanaka, G. Schwarzmann, J. Blanz, K. von Figura, et P. Saftig. 2002. Role of LAMP-2 in lysosome biogenesis et autophagy *Mol Biol Cell*. 13:3355–3368.
- Eskelinen, E., C.K. Schmidt, S. Neu, M. Willenborg, G. Fuertes, N. Salvador, Y. Tanaka, R. Lüllmann-Rauch, D. Hartmann, J. Heeren, K. von Figura, E. Knecht, et P. Saftig. 2004. Disturbed cholesterol traffic but normal proteolytic function in LAMP-1/LAMP-2 double-deficient fibroblasts *Mol Biol Cell*. 15:3132–3145.
- Esselens, C., V. Oorschot, V. Baert, T. Raemaekers, K. Spittaels, L. Serneels, H. Zheng, P. Saftig, B. De Strooper, J. Klumperman, et W. Annaert. 2004. Presenilin 1 mediates the turnover of telencephalin in hippocampal neurons via an autophagic degradative pathway *J Cell Biol*. 166:1041–1054.
- Exley, C. 2006. Aluminium et iron, but neither copper nor zinc, are key to the precipitation of beta-sheets of Abeta_{42} in senile plaque cores in Alzheimer's disease *J Alzheimers Dis*. 10:173–177.
- Fader, C.M., D. Sánchez, M. Furlán, et M.I. Colombo. 2008. Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells *Traffic*. 9:230–250.
- Fader, C.M., D.G. Sánchez, M.B. Mestre, et M.I. Colombo. 2009. TI-VAMP/VAMP7 et VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways *Biochim Biophys Acta*. 1793:1901–1916.
- Fader, C.M., et M.I. Colombo. 2009. Autophagy et multivesicular bodies: two closely related partners *Cell Death Differ*. 16:70–78.
- Farré, J., et S. Subramani. 2004. Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process *Trends Cell Biol*. 14:515–523.
- Fass, E., E. Shvets, I. Degani, K. Hirschberg, et Z. Elazar. 2006. Microtubules support production of starvation-induced autophagosomes but not their targeting et fusion with lysosomes *J Biol Chem*. 281:36303–36316.
- Feijoo, C., D.G. Campbell, R. Jakes, M. Goedert, et A. Cuenda. 2005. Evidence that phosphorylation of the microtubule-associated protein Tau by SAPK4/p38delta at Thr50 promotes microtubule assembly *J Cell Sci*. 118:397–408.
- Fengsrud, M., E.S. Erichsen, T.O. Berg, C. Raiborg, et P.O. Seglen. 2000. Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes et amphisomes by freeze-fracture electron microscopy *Eur. J. Cell Biol* 79:871–882.
- Ferri, C.P., M. Prince, C. Brayne, H. Brodaty, L. Fratiglioni, M. Ganguli, K. Hall, K. Hasegawa, H. Hendrie, Y. Huang, A. Jorm, C. Mathers, P.R. Menezes, E. Rimmer, M. Sczufca, Alzheimer's Disease International. 2005. Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study *Lancet*. 366:2112–2117.
- Filimonenko, M., S. Stuffers, C. Raiborg, A. Yamamoto, L. Malerød, E.M.C. Fisher, A. Isaacs, A. Brech, H. Stenmark, et A. Simonsen. 2007. Functional multivesicular bodies are required for autophagic clearance of protein aggregates associated with neurodegenerative disease *J Cell Biol*. 179:485–500.
- Filimonenko, M., P. Isakson, K.D. Finley, M. Anderson, H. Jeong, T.J. Melia, B.J. Bartlett, K.M. Myers, H.C.G. Birkeland, T. Lamark, D. Krainc, A. Brech, H. Stenmark, A. Simonsen, et A. Yamamoto. 2010. The selective macroautophagic degradation of aggregated proteins requires the PI3P-binding protein Alfy *Mol Cell*. 38:265–279.
- Fimia, G.M., A. Stoykova, A. Romagnoli, L. Giunta, S. Di Bartolomeo, R. Nardacci, M. Corazzari, C. Fuoco, A. Ucar, P. Schwartz, P. Gruss, M. Piacentini, K. Chowdhury, et F. Cecconi. 2007. Ambra1 regulates autophagy et development of the nervous system *Nature*. 447:1121–1125.
- Fimia, G.M., S. Di Bartolomeo, M. Piacentini, et F. Cecconi. 2011. Unleashing the Ambra1-Beclin 1 complex from dynein chains: Ulk1 sets Ambra1 free to induce autophagy *Autophagy*. 7:115–117.
- Finley, D. 2009. Recognition et processing of ubiquitin-protein conjugates by the proteasome. *Annu Rev Biochem*. 78:477–513.
- Flinn, R.J., Y. Yan, S. Goswami, P.J. Parker, et J.M. Backer. 2010. The late endosome is essential for mTORC1 signaling *Mol Biol Cell*. 21:833–841.

- Forno, L., et R. Norville. 1976. Ultrastructure of Lewy bodies in the stellate ganglion. *Acta Neuropathol.* 34:183–197.
- Fortunato, F., H. Bürgers, F. Bergmann, P. Rieger, M.W. Büchler, G. Kroemer, et J. Werner. 2009. Impaired autolysosome formation correlates with Lamp-2 depletion: role of apoptosis, autophagy, et necrosis in pancreatitis *Gastroenterology.* 137:350–60, 360.e1–5.
- Fourie, A.M., J.F. Sambrook, et M.J. Gething. 1994. Common et divergent peptide binding specificities of hsp70 molecular chaperones *J Biol Chem.* 269:30470–30478.
- Fraldi, A., F. Annunziata, A. Lombardi, H. Kaiser, D.L. Medina, C. Spampanato, A.O. Fedele, R. Polishchuk, N.C. Sorrentino, K. Simons, et A. Ballabio. 2010. Lysosomal fusion et SNARE function are impaired by cholesterol accumulation in lysosomal storage disorders *EMBO J.* 29:3607–3620.
- Fujioka, Y., N.N. Noda, H. Nakatogawa, Y. Ohsumi, et F. Inagaki. 2010. Dimeric coiled-coil structure of *Saccharomyces cerevisiae* Atg16 et its functional significance in autophagy *J Biol Chem.* 285:1508–1515.
- Fujita, N., M. Hayashi-Nishino, H. Fukumoto, H. Omori, A. Yamamoto, T. Noda, et T. Yoshimori. 2008. An Atg4B mutant hampers the lipidation of LC3 paralogues et causes defects in autophagosome closure *Mol Biol Cell.* 19:4651–4659.
- Fujita, N., T. Noda et T. Yoshimori 2009a. Atg4B(C74A) hampers autophagosome closure: a useful protein for inhibiting autophagy *Autophagy.* 5:88–89.
- Fujita, N., T. Saitoh, S. Kageyama, S. Akira, T. Noda, et T. Yoshimori. 2009b. Differential involvement of Atg16L1 in Crohn disease et canonical autophagy: analysis of the organization of the Atg16L1 complex in fibroblasts *J Biol Chem.* 284:32602–32609.
- Funakoshi, T., A. Matsuura, T. Noda, et Y. Ohsumi. 1997. Analyses of APG13 gene involved in autophagy in yeast, *Saccharomyces cerevisiae* *Gene.* 192:207–213.
- Furuta, S., E. Hidaka, A. Ogata, S. Yokota, et T. Kamata. 2004. Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene.* 23:3898–3904.
- Furuya, T., M. Kim, M. Lipinski, J. Li, D. Kim, T. Lu, Y. Shen, L. Rameh, B. Yankner, L. Tsai, et J. Yuan. 2010. Negative regulation of Vps34 by Cdk mediated phosphorylation. *Mol Cell.* 38:500–511.
- Gajewska, M., A. Sobolewska, M. Kozłowski, et T. Motyl. 2008. Role of autophagy in mammary gland development *J Physiol Pharmacol.* 59 Suppl 9:237–249.
- Gal, J., A. Strom, R. Kilty, F. Zhang, et H. Zhu. 2007. p62 accumulates et enhances aggregate formation in model systems of familial amyotrophic lateral sclerosis *J Biol Chem.* 282:11068–11077.
- Gamblin, T.C., F. Chen, A. Zambrano, A. Abraha, S. Lagalwar, A.L. Guillozet, M. Lu, Y. Fu, F. Garcia-Sierra, N. LaPointe, R. Miller, R.W. Berry, L.I. Binder, et V.L. Cryns. 2003. Caspase cleavage of tau: linking amyloid et neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:10032–10037.
- Ganley, I.G., D.H. Lam, J. Wang, X. Ding, S. Chen, et X. Jiang. 2009. ULK1.ATG13.FIP200 complex mediates mTOR signaling et is essential for autophagy *J Biol Chem.* 284:12297–12305.
- Gao, C., W. Cao, L. Bao, W. Zuo, G. Xie, T. Cai, W. Fu, J. Zhang, W. Wu, X. Zhang, et Y. Chen. 2010. Autophagy negatively regulates Wnt signalling by promoting Dishevelled degradation *Nat Cell Biol.* 12:781–790.
- Gao, C., et Y. Chen. 2011. Selective removal of Dishevelled by autophagy: A role of p62 *Autophagy.* 7:20–21.
- Gao, W., W. Ding, D.B. Stolz, et X. Yin. 2008. Induction of macroautophagy by exogenously introduced calcium *Autophagy.* 4:754–761.
- García-Mata, R., Z. Bebök, E.J. Sorscher, et E.S. Sztul. 1999. Characterization et dynamics of aggresome formation by a cytosolic GFP-chimera *J Cell Biol.* 146:1239–1254.
- Garg, S., T. Timm, E. Mandelkow, E. Mandelkow, et Y. Wang. 2011. Cleavage of Tau by calpain in Alzheimer's disease: the quest for the toxic 17 kD fragment *Neurobiol Aging.* 32:1–14.
- Geeraert, C., A. Ratier, S.G. Pfisterer, D. Perdiz, I. Cantaloube, A. Rouault, S. Pattingre, T. Proikas-Cezanne, P. Codogno, et C. Poüs. 2010. Starvation-induced hyperacetylation of tubulin is required for the stimulation of autophagy by nutrient deprivation *J Biol Chem.* 285:24184–24194.
- Gegg, M.E., J.M. Cooper, K.Y. Chau, M. Rojo, A.H.V. Schapira, et J.W. Taanman. 2010. Mitofusin 1 et mitofusin 2 are ubiquitinated in a PINK1/parkin-dependent manner upon induction of mitophagy. *Hum Mol Genet.* 19:4861–4870.
- Gibbons, I.R. 1996. The role of dynein in microtubule-based motility *Cell Struct Funct.* 21:331–342.
- Gingras, A.C., S.G. Kennedy, M.A. O'Leary, N. Sonenberg, et N. Hay. 1998. 4E-BP1, a repressor of mRNA translation, is phosphorylated et inactivated by the Akt(PKB) signaling pathway. *Genes Dev.* 12:502–513.
- Glenner, G.G., et C.W. Wong. 1984. Alzheimer's disease et Down's syndrome: sharing of a unique cerebrovascular amyloid fibril protein *Biochem Biophys Res Commun.* 122:1131–1135.
- Glickman, M.H., D.M. Rubin, V.A. Fried, et D. Finley. 1998. The regulatory particle of the *Saccharomyces cerevisiae* proteasome *Mol Cell Biol.* 18:3149–3162.

Goate, A., M.C. Chartier-Harlin, M. Mullan, J. Brown, F. Crawford, L. Fidani, L. Giuffra, A. Haynes, N. Irving, et L. James. 1991. Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease *Nature*. 349:704–706.

Goedert, M., R. Jakes, Z. Qi, J.H. Wang, et P. Cohen. 1995. Protein phosphatase 2A is the major enzyme in brain that dephosphorylates tau protein phosphorylated by proline-directed protein kinases or cyclic AMP-dependent protein kinase *J Neurochem*. 65:2804–2807.

Goedert, M., et M.G. Spillantini. 2006. A century of Alzheimer's disease. *Science*. 314:777–781.

Goldbourt, U., M. Schnaider-Beeri, et M. Davidson. 2007. Socioeconomic status in relationship to death of vascular disease et late-life dementia *J. Neurol. Sci* 257:177–181.

Gong, C.X., T.J. Singh, I. Grundke-Iqbal, et K. Iqbal. 1993. Phosphoprotein phosphatase activities in Alzheimer disease brain. *J Neurochem*. 61:921–927.

Gong, J. 1999. Differential Stimulation of PKC Phosphorylation of Potassium Channels by ZIP1 et ZIP2. *Science*. 285:1565–1569.

Gordon, P.B., H. Høyvik, et P.O. Seglen. 1992. Prelysosomal et lysosomal connections between autophagy et endocytosis *Biochem J*. 283 (Pt 2):361–369.

Gordon, P.B., I. Holen, M. Fosse, J.S. Røtnes, et P.O. Seglen. 1993. Dependence of hepatocytic autophagy on intracellularly sequestered calcium *J Biol Chem*. 268:26107–26112.

Gordon, P.B., I. Holen, et P.O. Seglen. 1995. Protection by naringin et some other flavonoids of hepatocytic autophagy et endocytosis against inhibition by okadaic acid *J Biol Chem*. 270:5830–5838.

Gordon, P.B., et P.O. Seglen. 1988. Prelysosomal convergence of autophagic et endocytic pathways *Biochem Biophys Res Commun*. 151:40–47.

Gorman, A.M. 2008. Neuronal cell death in neurodegenerative diseases: recurring themes around protein handling *J Cell Mol Med*. 12:2263–2280.

Gozuacik, D., S. Bialik, T. Raveh, G. Mitou, G. Shohat, H. Sabanay, N. Mizushima, T. Yoshimori, et A. Kimchi. 2008. DAP-kinase is a mediator of endoplasmic reticulum stress-induced caspase activation et autophagic cell death. *Cell Death Differ*. 15:1875–1886.

Gómez-Isla, T., R. Hollister, H. West, S. Mui, J.H. Growdon, R.C. Petersen, J.E. Parisi, et B.T. Hyman. 1997. Neuronal loss correlates with but exceeds neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease. *Ann Neurol*. 41:17–24.

Gómez-Isla, T., W.B. Growdon, M.J. McNamara, D. Nochlin, T.D. Bird, J.C. Arango, F. Lopera, K.S. Kosik, P.L. Lantos, N.J. Cairns, et B.T. Hyman. 1999. The impact of different presenilin 1 and presenilin 2 mutations on amyloid deposition, neurofibrillary changes et neuronal loss in the familial Alzheimer's disease brain: evidence for other phenotype-modifying factors *Brain*. 122 (Pt 9):1709–1719.

Greenwood, J.A., C.W. Scott, R.C. Spreen, C.B. Caputo, et G.V. Johnson. 1994. Casein kinase II preferentially phosphorylates human tau isoforms containing an amino-terminal insert. Identification of threonine 39 as the primary phosphate acceptor *J Biol Chem*. 269:4373–4380.

Griffin, R.J., A. Moloney, M. Kelliher, J.A. Johnston, R. Ravid, P. Dockery, R. O'Connor, et C. O'Neill. 2005. Activation of Akt/PKB, increased phosphorylation of Akt substrates et loss et altered distribution of Akt et PTEN are features of Alzheimer's disease pathology. *J Neurochem*. 93:105–117.

Grotomeier, A., S. Alers, S.G. Pfisterer, F. Paasch, M. Daubrawa, A. Dieterle, B. Viollet, S. Wesselborg, T. Proikas-Cezanne, et B. Stork. 2010. AMPK-independent induction of autophagy by cytosolic Ca²⁺ increase *Cell Signal*. 22:914–925.

Groves, M.R., N. Hanlon, P. Turowski, B.A. Hemmings, et D. Barford. 1999. The structure of the protein phosphatase 2A PR65/A subunit reveals the conformation of its 15 tandemly repeated HEAT motifs *Cell*. 96:99–110.

Grundke-Iqbal, I., K. Iqbal, M. Quinlan, Y.C. Tung, M.S. Zaidi, et H.M. Wisniewski. 1986. Microtubule-associated protein tau. A component of Alzheimer paired helical filaments. *J Biol Chem*. 261:6084–6089.

Gu, Y., J.W. Nieves, Y. Stern, J.A. Luchsinger, et N. Scarmeas. 2010. Food Combination et Alzheimer Disease Risk: A Protective Diet. *Arch. Neurol* 67:699–706.

Guarente, L. 2005. Calorie restriction et SIR2 genes--towards a mechanism. *Mech Ageing Dev*. 126:923–928.

Guggenheim, K.Y. 1991. Rudolf Schoenheimer et the concept of the dynamic state of body constituents.

Guicciardi, M.E., S.F. Bronk, N.W. Werneburg, X. Yin, et G.J. Gores. 2005. Bid is upstream of lysosome-mediated caspase 2 activation in tumor necrosis factor alpha-induced hepatocyte apoptosis *Gastroenterology*. 129:269–284.

Guimarães, C.A., M. Benchimol, G.P. Amarante-Mendes, et R. Linden. 2003. Alternative programs of cell death in developing retinal tissue *J Biol Chem*. 278:41938–41946.

Gulati, P., L.D. Gaspers, S.G. Dann, M. Joaquin, T. Nobukuni, F. Natt, S.C. Kozma, A.P. Thomas, et G. Thomas. 2008. Amino acids activate mTOR complex 1 via Ca²⁺/CaM signaling to hVPS34 *Cell Metab*. 7:456–465.

Haase, C., J.T. Stieler, T. Arendt, et M. Holzer. 2004. Pseudophosphorylation of tau protein alters its ability for self-aggregation *J Neurochem*. 88:1509–1520.

Hadano, S., A. Otomo, R. Kunita, K. Suzuki-Utsunomiya, A. Akatsuka, M. Koike, M. Aoki, Y. Uchiyama, Y. Itoyama, et J. Ikeda. 2010. Loss of ALS2/Alsin exacerbates motor dysfunction in a SOD1-expressing mouse ALS model by disturbing endolysosomal trafficking *PLoS ONE*. 5:e9805.

Haigis, M.C., et B.A. Yankner. 2010. The aging stress response. *Mol Cell*. 40:333–344.

Hailey, D.W., A.S. Rambold, P. Satpute-Krishnan, K. Mitra, R. Sougrat, P.K. Kim, et J. Lippincott-Schwartz. 2010. Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation *Cell*. 141:656–667.

Hakansson, K., S. Rovio, E.L. Helkala, A.R. Vilska, B. Winblad, H. Soininen, A. Nissinen, A.H. Mohammed, et M. Kivipelto. 2009. Association between mid-life marital status et cognitive function in later life: population based cohort study. *BMJ*. 339:b2462–b2462.

Halpain, S., et L. Dehmelt. 2006. The MAP1 family of microtubule-associated proteins. *Genome Biol*. 7:224.

Hamano, T., T.F. Gendron, E. Causevic, S. Yen, W. Lin, C. Isidoro, M. Deture, et L. Ko. 2008. Autophagic-lysosomal perturbation enhances tau aggregation in transfectants with induced wild-type tau expression *Eur J Neurosci*. 27:1119–1130.

Hamasaki, M., et T. Yoshimori. 2010. Where do they come from? Insights into autophagosome formation. *FEBS Lett*. 584:1296–1301.

Hamshere, M.L., P.A. Holmans, D. Avramopoulos, S.S. Bassett, D. Blacker, L. Bertram, H. Wiener, N. Rochberg, R.E. Tanzi, A. Myers, F. Wavrant-De Vrièze, R. Go, D. Fallin, S. Lovestone, J. Hardy, A. Goate, M. O'Donovan, J. Williams, et M.J. Owen. 2007. Genome-wide linkage analysis of 723 affected relative pairs with late-onset Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet*. 16:2703–2712.

Hanada, T., N.N. Noda, Y. Satomi, Y. Ichimura, Y. Fujioka, T. Takao, F. Inagaki, et Y. Ohsumi. 2007. The Atg12-Atg5 conjugate has a novel E3-like activity for protein lipidation in autophagy *J Biol Chem*. 282:37298–37302.

Hanger, D.P., H.L. Byers, S. Wray, K. Leung, M.J. Saxton, A. Seereeram, C.H. Reynolds, M.A. Ward, et B.H. Anderton. 2007. Novel phosphorylation sites in tau from Alzheimer brain support a role for casein kinase 1 in disease pathogenesis *J Biol Chem*. 282:23645–23654.

Hansen, M., A. Chandra, L.L. Mitic, B. Onken, M. Driscoll, et C. Kenyon. 2008. A role for autophagy in the extension of lifespan by dietary restriction in *C. elegans* *PLoS Genet*. 4:e24.

Hapala, I., V. Klobučníková, K. Mazánová, et P. Kohút. 2005. Two mutants selectively resistant to polyenes reveal distinct mechanisms of antifungal activity by nystatin et amphotericin B *Biochem. Soc. Trans* 33:1206–1209.

Hara, T., K. Nakamura, M. Matsui, A. Yamamoto, Y. Nakahara, R. Suzuki-Migishima, M. Yokoyama, K. Mishima, I. Saito, H. Okano, et N. Mizushima. 2006. Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature*. 441:885–889.

Hara, T., A. Takamura, C. Kishi, S. Iemura, T. Natsume, J. Guan, et N. Mizushima. 2008. FIP200, a ULK-interacting protein, is required for autophagosome formation in mammalian cells *J Cell Biol*. 181:497–510.

Hara, T., et N. Mizushima. 2009. Role of ULK-FIP200 complex in mammalian autophagy: FIP200, a counterpart of yeast Atg17 *Autophagy*. 5:85–87.

Hardie, D.G. 2011. AMPK et autophagy get connected *EMBO J*. 30:634–635.

Hardy, J., et D.J. Selkoe. 2002. The amyloid hypothesis of Alzheimer's disease: progress et problems on the road to therapeutics *Science*. 297:353–356.

Harman, D. 1956. Aging: a theory based on free radical et radiation chemistry *J Gerontol*. 11:298–300.

Harold, D., R. Abraham, P. Hollingworth, R. Sims, A. Gerrish, M.L. Hamshere, J.S. Pahwa, V. Moskva, K. Dowzell, A. Williams, N. Jones, C. Thomas, A. Stretton, A.R. Morgan, S. Lovestone, J. Powell, P. Proitsi, M.K. Lupton, C. Brayne, D.C. Rubinsztein, M. Gill, B. Lawlor, A. Lynch, K. Morgan, K.S. Brown, P.A. Passmore, D. Craig, B. McGuinness, S. Todd, C. Holmes, D. Mann, A.D. Smith, S. Love, P.G. Kehoe, J. Hardy, S. Mead, N. Fox, M. Rossor, J. Collinge, W. Maier, F. Jessen, B. Schürmann, H. van den Bussche, I. Heuser, J. Kornhuber, J. Wiltfang, M. Dichgans, L. Frölich, H. Hampel, M. Hüll, D. Rujescu, A.M. Goate, J.S.K. Kauwe, C. Cruchaga, P. Nowotny, J.C. Morris, K. Mayo, K. Sleegers, K. Bettens, S. Engelborghs, P.P. De Deyn, C. Van Broeckhoven, G. Livingston, N.J. Bass, H. Gurling, A. McQuillin, R. Gwilliam, P. Deloukas, A. Al-Chalabi, C.E. Shaw, M. Tsolaki, A.B. Singleton, R. Guerreiro, T.W. Mühlisen, M.M. Nöthen, S. Moebus, K. Jöckel, N. Klopp, H. Wichmann, M.M. Carrasquillo, V.S. Pankratz, S.G. Younkin, P.A. Holmans, M. O'Donovan, M.J. Owen, et J. Williams. 2009. Genome-wide association study identifies variants at CLU et PICALM associated with Alzheimer's disease *Nat Genet*. 41:1088–1093.

Harrison, B., M. Kraus, L. Burch, C. Stevens, A. Craig, P. Gordon-Weeks, et T.R. Hupp. 2008. DAPK-1 binding to a linear peptide motif in MAP1B stimulates autophagy et membrane blebbing *J Biol Chem*. 283:9999–10014.

Hartley, D., et G.M. Cooper. 2002. Role of mTOR in the degradation of IRS-1: regulation of PP2A activity *J Cell Biochem*. 85:304–314.

Harwood, F.C., L. Shu, et P.J. Houghton. 2008. mTORC1 signaling can regulate growth factor activation of p44/42 mitogen-activated protein kinases through protein phosphatase 2A *J Biol Chem*. 283:2575–2585.

Hawkes, K. 2010. Colloquium paper: how grandmother effects plus individual variation in frailty shape fertility et mortality: guidance from human-chimpanzee comparisons *Proc Natl Acad Sci USA*. 107 Suppl 2:8977–8984.

- Hayashi-Nishino, M., N. Fujita, T. Noda, A. Yamaguchi, T. Yoshimori, et A. Yamamoto. 2009. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation *Nat Cell Biol.* 11:1433–1437.
- Hayashi-Nishino, M., N. Fujita, T. Noda, A. Yamaguchi, T. Yoshimori et A. Yamamoto. 2010. Electron tomography reveals the endoplasmic reticulum as a membrane source for autophagosome formation *Autophagy.* 6:301–303.
- He, C., et D.J. Klionsky. 2007. Atg9 trafficking in autophagy-related pathways *Autophagy.* 3:271–274.
- He, C., et D.J. Klionsky. 2009. Regulation mechanisms et signaling pathways of autophagy *Annu. Rev. Genet.* 43:67–93.
- He, H., Y. Dang, F. Dai, Z. Guo, J. Wu, X. She, Y. Pei, Y. Chen, W. Ling, C. Wu, S. Zhao, J.O. Liu, et L. Yu. 2003. Post-translational modifications of three members of the human MAP1LC3 family et detection of a novel type of modification for MAP1LC3B *J Biol Chem.* 278:29278–29287.
- Heath-Engel, H.M., N.C. Chang, et G.C. Shore. 2008. The endoplasmic reticulum in apoptosis et autophagy: role of the BCL-2 protein family *Oncogene.* 27:6419–6433.
- Heiseke, A., Y. Aguib, C. Riemer, M. Baier, et H.M. Schatzl. 2009. Lithium induces clearance of protease resistant prion protein in prion-infected cells by induction of autophagy *J Neurochem.* 109:25–34.
- Heiseke, A., Y. Aguib, et H.M. Schatzl. 2010. Autophagy, prion infection et their mutual interactions *Curr Issues Mol Biol.* 12:87–97.
- Heitman, J., N.R. Movva, et M.N. Hall. 1991. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science.* 253:905–909.
- Helmer, C., D. Damon, L. Letenneur, C. Fabrigoule, P. Barberger-Gateau, S. Lafont, R. Fuhrer, T. Antonucci, D. Commenges, J.M. Orgogozo, et J. Dartigues. 1999. Marital status et risk of Alzheimer's disease: a French population-based cohort study *Neurology.* 53:1953–1958.
- Hemmings, B.A., C. Adams-Pearson, F. Maurer, P. Müller, J. Goris, W. Merlevede, J. Hofsteenge, et S.R. Stone. 1990. alpha- et beta-forms of the 65-kDa subunit of protein phosphatase 2A have a similar 39 amino acid repeating structure *Biochemistry.* 29:3166–3173.
- Heo, S.R., A.M. Han, Y.K. Kwon, et I. Joung. 2009. p62 protects SH-SY5Y neuroblastoma cells against H2O2-induced injury through the PDK1/Akt pathway *Neurosci Lett.* 450:45–50.
- Hernández, F., et J. Avila. 2007. Tauopathies *Cell Mol Life Sci.* 64:2219–2233.
- Herranz, D., et M. Serrano. 2010. SIRT1: recent lessons from mouse models. *Nat Rev Cancer.* 10:819–823.
- Hershko, A., A. Ciechanover, et I.A. Rose. 1979. Resolution of the ATP-dependent proteolytic system from reticulocytes: a component that interacts with ATP *Proc Natl Acad Sci USA.* 76:3107–3110.
- Hershko, A., A. Ciechanover, H. Heller, A.L. Haas, et I.A. Rose. 1980. Proposed role of ATP in protein breakdown: conjugation of protein with multiple chains of the polypeptide of ATP-dependent proteolysis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 77:1783–1786.
- Ho, L., L.H. Chen, J. Wang, W. Zhao, S.T. Talcott, K. Ono, D. Teplow, N. Humala, A. Cheng, S.S. Percival, M. Ferruzzi, E. Janle, D.L. Dickstein, et G.M. Pasinetti. 2009. Heterogeneity in red wine polyphenolic contents differentially influences Alzheimer's disease-type neuropathology et cognitive deterioration *J Alzheimers Dis.* 16:59–72.
- Hoffman, K.B., X. Bi, J.T. Pham, et G. Lynch. 1998. Beta-amyloid increases cathepsin D levels in hippocampus *Neurosci Lett.* 250:75–78.
- Holen, I., P.B. Gordon, et P.O. Seglen. 1992. Protein kinase-dependent effects of okadaic acid on hepatocytic autophagy et cytoskeletal integrity *Biochem J.* 284 (Pt 3):633–636.
- Holen, I., P.B. Gordon, et P.O. Seglen. 1993. Inhibition of hepatocytic autophagy by okadaic acid et other protein phosphatase inhibitors *Eur J Biochem.* 215:113–122.
- Hosokawa, N., T. Hara, T. Kaizuka, C. Kishi, A. Takamura, Y. Miura, S. Iemura, T. Natsume, K. Takehana, N. Yamada, J. Guan, N. Oshiro, et N. Mizushima. 2009a. Nutrient-dependent mTORC1 association with the ULK1-Atg13-FIP200 complex required for autophagy *Mol Biol Cell.* 20:1981–1991.
- Hosokawa, N., T. Sasaki, S. Iemura, T. Natsume, T. Hara, et N. Mizushima. 2009b. Atg101, a novel mammalian autophagy protein interacting with Atg13 *Autophagy.* 5:973–979.
- Huang, C., A.M. Andres, E.P. Ratliff, G. Hernandez, P. Lee, et R.A. Gottlieb. 2011. Preconditioning Involves Selective Mitophagy Mediated by Parkin et p62/SQSTM1. *PLoS ONE.* 6:e20975.
- Hughes, T., et T.E. Rusten. 2007. Origin et evolution of self-consumption: autophagy *Adv. Exp. Med. Biol.* 607:111–118.
- Hung, S., W. Huang, H. Liou, et W. Fu. 2009. Autophagy protects neuron from Abeta-induced cytotoxicity. *Autophagy.* 5:502–510.
- Hutchins, M.U., et D.J. Klionsky. 2001. Vacuolar localization of oligomeric alpha-mannosidase requires the cytoplasm to vacuole targeting et autophagy pathway components in *Saccharomyces cerevisiae* *J Biol Chem.* 276:20491–20498.
- Hutt D.M., E.T. Powers, et W.E. Balch. 2009. The proteostasis boundary in misfolding diseases of membrane traffic. *FEBS Lett.* 583:2639–2646.

- Huynh, K.K., E. Eskelinen, C.C. Scott, A. Malevanets, P. Saftig, et S. Grinstein. 2007. LAMP proteins are required for fusion of lysosomes with phagosomes *EMBO J.* 26:313–324.
- Høyer-Hansen, M., L. Bastholm, P. Szyniarowski, M. Campanella, G. Szabadkai, T. Farkas, K. Bianchi, N. Fehrenbacher, F. Elling, R. Rizzuto, I.S. Mathiasen, et M. Jäättelä. 2007. Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase-beta, et Bcl-2 *Mol Cell.* 25:193–205.
- Høyer-Hansen, M., et M. Jäättelä. 2007. AMP-activated protein kinase: a universal regulator of autophagy *Autophagy.* 3:381–383.
- Ichimura, Y., T. Kirisako, T. Takao, Y. Satomi, Y. Shimonishi, N. Ishihara, N. Mizushima, I. Tanida, E. Kominami, M. Ohsumi, T. Noda, et Y. Ohsumi. 2000. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation *Nature.* 408:488–492.
- Ichimura, Y., T. Kumanomidou, Y. Sou, T. Mizushima, J. Ezaki, T. Ueno, E. Kominami, T. Yamane, K. Tanaka, et M. Komatsu. 2008. Structural basis for sorting mechanism of p62 in selective autophagy. *J Biol Chem.* 283:22847–22857.
- Ikeda, F., et I. Dikic. 2008. Atypical ubiquitin chains: new molecular signals. “Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects” review series. *EMBO Rep.* 9:536–542.
- Ikonen, E. 2008. Cellular cholesterol trafficking et compartmentalization *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:125–138.
- Inoki, K., et K. Guan. 2006. Complexity of the TOR signaling network. *Trends Cell Biol.* 16:206–212.
- Inui, S., H. Sanjo, K. Maeda, H. Yamamoto, E. Miyamoto, et N. Sakaguchi. 1998. Ig receptor binding protein 1 (alpha4) is associated with a rapamycin-sensitive signal transduction in lymphocytes through direct binding to the catalytic subunit of protein phosphatase 2A *Blood.* 92:539–546.
- Iqbal, K., F. Liu, C. Gong, A.D.C. Alonso, et I. Grundke-Iqbal. 2009. Mechanisms of tau-induced neurodegeneration *Acta Neuropathol.* 118:53–69.
- Irrcher, I., H. Aleyasin, E.L. Seifert, S.J. Hewitt, S. Chhabra, M. Phillips, A.K. Lutz, M.W.C. Rousseaux, L. Bevilacqua, A. Jahani-Asl, S. Callaghan, J.G. MacLaurin, K.F. Winklhofer, P. Rizzu, P. Rippstein, R.H. Kim, C.X. Chen, E.A. Fon, R.S. Slack, M.E. Harper, H.M. McBride, T.W. Mak, et D.S. Park. 2010. Loss of the Parkinson's disease-linked gene DJ-1 perturbs mitochondrial dynamics *Hum Mol Genet.* 19:3734–3746.
- Ishihara, N., M. Hamasaki, S. Yokota, K. Suzuki, Y. Kamada, A. Kihara, T. Yoshimori, T. Noda, et Y. Ohsumi. 2001. Autophagosome requires specific early Sec proteins for its formation et NSF/SNARE for vacuolar fusion *Mol Biol Cell.* 12:3690–3702.
- Itakura, E., et N. Mizushima. 2009. Atg14 et UVRAG: mutually exclusive subunits of mammalian Beclin 1-PI3K complexes *Autophagy.* 5:534–536.
- Itoh, T., N. Fujita, E. Kanno, A. Yamamoto, T. Yoshimori, et M. Fukuda. 2008. Golgi-resident small GTPase Rab33B interacts with Atg16L et modulates autophagosome formation *Mol Biol Cell.* 19:2916–2925.
- Ittner, L.M., et J. Götz. 2011. Amyloid- β et tau--a toxic pas de deux in Alzheimer's disease *Nat Rev Neurosci.* 12:65–72.
- Iwata, A., B.E. Riley, J.A. Johnston, et R.R. Kopito. 2005. HDAC6 et microtubules are required for autophagic degradation of aggregated huntingtin *J Biol Chem.* 280:40282–40292.
- Iwata, J., J. Ezaki, M. Komatsu, S. Yokota, T. Ueno, I. Tanida, T. Chiba, K. Tanaka, et E. Kominami. 2006. Excess peroxisomes are degraded by autophagic machinery in mammals *J Biol Chem.* 281:4035–4041.
- Jacinto, E., B. Guo, K.T. Arndt, T. Schmelzle, et M.N. Hall. 2001. TIP41 interacts with TAP42 et negatively regulates the TOR signaling pathway. *Mol Cell.* 8:1017–1026.
- Jacinto, E., R. Loewith, A. Schmidt, S. Lin, M.A. Ruegg, A. Hall, et M.N. Hall. 2004. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton et is rapamycin insensitive. *Nat Cell Biol.* 6:1122–1128.
- Jacinto, E., et M.N. Hall. 2003. Tor signalling in bugs, brain et brawn. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:117–126.
- Jaeger, P.A., F. Pickford, C. Sun, K.M. Lucin, E. Masliah, et T. Wyss-Coray. 2010. Regulation of amyloid precursor protein processing by the Beclin 1 complex *PLoS ONE.* 5:e11102.
- Jaeger, P.A., et T. Wyss-Coray. 2009. All-you-can-eat: autophagy in neurodegeneration et neuroprotection *Mol Neurodegener.* 4:16.
- Jahreiss, L., F.M. Menzies, et D.C. Rubinsztein. 2008. The itinerary of autophagosomes: from peripheral formation to kiss-et-run fusion with lysosomes *Traffic.* 9:574–587.
- Jain, A., T. Lamark, E. Sjøttem, K.B. Larsen, J.A. Awuh, A. Overvatn, M. McMahon, J.D. Hayes, et T. Johansen. 2010. p62/SQSTM1 is a target gene for transcription factor NRF2 et creates a positive feedback loop by inducing antioxidant response element-driven gene transcription *J Biol Chem.* 285:22576–22591.
- Janssens, V., S. Longin, et J. Goris. 2008. PP2A holoenzyme assembly: in cauda venenum (the sting is in the tail) *Trends Biochem Sci.* 33:113–121.
- Janssens, V., et J. Goris. 2001. Protein phosphatase 2A: a highly regulated family of serine/threonine phosphatases implicated in cell growth et signalling *Biochem J.* 353:417–439.
- Jäger, S., C. Bucci, I. Tanida, T. Ueno, E. Kominami, P. Saftig, et E. Eskelinen. 2004. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles *J Cell Sci.* 117:4837–4848.

- Jänen, S.B., H. Chaachouay, et C. Richter-Landsberg. 2010. Autophagy is activated by proteasomal inhibition et involved in aggresome clearance in cultured astrocytes *Glia*. 58:1766–1774.
- Jiang, H., D. Cheng, W. Liu, J. Peng, et J. Feng. 2010. Protein kinase C inhibits autophagy et phosphorylates LC3. *Biochem Biophys Res Commun*. 395:471–476.
- Jiang, J., K. Parameshwaran, M.L. Seibenhener, M. Kang, V. Suppiramaniam, R.L. Huganir, M.T. Diaz-Meco, et M.W. Wooten. 2009. AMPA receptor trafficking et synaptic plasticity require SQSTM1/p62 *Hippocampus*. 19:392–406.
- Jick, H., G.L. Zornberg, S.S. Jick, S. Seshadri, et D.A. Drachman. 2000. Statins et the risk of dementia *Lancet*. 356:1627–1631.
- Jin, H., S. Seo, S. Woo, E. Kim, H. Lee, D. Yoo, S. An, T. Choe, S. Lee, S. Hong, C. Rhee, J. Kim, et I. Park. 2009a. Activating transcription factor 4 et CCAAT/enhancer-binding protein-beta negatively regulate the mammalian target of rapamycin via Redd1 expression in response to oxidative et endoplasmic reticulum stress *Free Radic Biol Med*. 46:1158–1167.
- Jin, M., N. Shepardson, T. Yang, G. Chen, D. Walsh, et D.J. Selkoe. 2011. Soluble amyloid beta-protein dimers isolated from Alzheimer cortex directly induce Tau hyperphosphorylation et neuritic degeneration *Proc Natl Acad Sci USA*. 108:5819–5824.
- Jin, N., C.Y. Chow, L. Liu, S.N. Zolov, R. Bronson, M. Davisson, J.L. Petersen, Y. Zhang, S. Park, J.E. Duex, D. Goldowitz, M.H. Meisler, et L.S. Weisman. 2008. VAC14 nucleates a protein complex essential for the acute interconversion of PI3P et PI(3,5)P(2) in yeast et mouse *EMBO J*. 27:3221–3234.
- Jin, Z., Y. Li, R. Pitti, D. Lawrence, V.C. Pham, J.R. Lill, et A. Ashkenazi. 2009b. Cullin3-based polyubiquitination et p62-dependent aggregation of caspase-8 mediate extrinsic apoptosis signaling *Cell*. 137:721–735.
- Johansen, T., et T. Lamark. 2011. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins *Autophagy*. 7.
- Johnson, G.V.W., et W.H. Stoothoff. 2004. Tau phosphorylation in neuronal cell function et dysfunction. *J Cell Sci*. 117:5721–5729.
- Johnston, J.A., C.L. Ward, et R.R. Kopito. 1998. Aggresomes: a cellular response to misfolded proteins *J Cell Biol*. 143:1883–1898.
- Journet, A., et M. Ferro. 2004. The potentials of MS-based subproteomic approaches in medical science: the case of lysosomes et breast cancer *Mass Spectrom Rev*. 23:393–442.
- Juhász, G., et T.P. Neufeld. 2006. Autophagy: a forty-year search for a missing membrane source *PLoS Biol* 4:e36.
- Juhász, G., et T.P. Neufeld. 2008. Drosophila Atg7: required for stress resistance, longevity et neuronal homeostasis, but not for metamorphosis *Autophagy*. 4:357–358.
- Jun, G., A.C. Naj, G.W. Beecham, L. Wang, J. Buros, P.J. Gallins, J.D. Buxbaum, N. Ertekin-Taner, M.D. Fallin, R. Friedland, R. Inzelberg, P. Kramer, E. Rogaeva, P. St George-Hyslop, Alzheimer's Disease Genetics Consortium, L.B. Cantwell, B.A. Dombroski, A.J. Saykin, E.M. Reiman, D.A. Bennett, J.C. Morris, K.L. Lunetta, E.R. Martin, T.J. Montine, A.M. Goate, D. Blacker, D.W. Tsuang, D. Beekly, L.A. Cupples, H. Hakonarson, W. Kukull, T.M. Foroud, J. Haines, R. Mayeux, L.A. Farrer, M.A. Pericak-Vance, et G.D. Schellenberg. 2010. Meta-analysis confirms CR1, CLU, et PICALM as alzheimer disease risk loci et reveals interactions with APOE genotypes *Arch. Neurol* 67:1473–1484.
- Jung, C.H., C.B. Jun, S. Ro, Y. Kim, N.M. Otto, J. Cao, M. Kundu, et D. Kim. 2009. ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery *Mol Biol Cell*. 20:1992–2003.
- Jung, C.H., S. Ro, J. Cao, N.M. Otto, et D. Kim. 2010. mTOR regulation of autophagy *FEBS Lett*. 584:1287–1295.
- Kaasinen, S.K., L. Harvey, A.J. Reynolds, et I.A. Hendry. 2008. Autophagy generates retrogradely transported organelles: a hypothesis *Int. J. Dev. Neurosci* 26:625–634.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, T. Ueno, A. Yamamoto, T. Kirisako, T. Noda, E. Kominami, Y. Ohsumi, et T. Yoshimori. 2000. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing *EMBO J*. 19:5720–5728.
- Kabeya, Y., N. Mizushima, A. Yamamoto, S. Oshitani-Okamoto, Y. Ohsumi, et T. Yoshimori. 2004. LC3, GABARAP et GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation *J Cell Sci*. 117:2805–2812.
- Kabeya, Y., Y. Kamada, M., Baba, H., Takikawa, H. Sasaki, M., Sasaki, et Y. Ohsumi. 2005. Atg17 functions in cooperation with Atg1 et Atg13 in yeast autophagy *Mol Biol Cell*. 16:2544–2553.
- Kabeya, Y., N.N. Noda, Y. Fujioka, K. Suzuki, F. Inagaki, et Y. Ohsumi. 2009. Characterization of the Atg17-Atg29-Atg31 complex specifically required for starvation-induced autophagy in *Saccharomyces cerevisiae* *Biochem Biophys Res Commun*. 389:612–615.
- Kaeberlein, M., and P.S. Rabinovitch. 2006. Medicine: grapes versus gluttony *Nature*. 444:280–281.
- Kalaany, N.Y., et D.M. Sabatini. 2009. Tumours with PI3K activation are resistant to dietary restriction *Nature*. 458:725–731.
- Kamada, Y. 2010. Prime-numbered Atg proteins act at the primary step in autophagy: unphosphorylatable Atg13 can induce autophagy without TOR inactivation *Autophagy*. 6:415–416.
- Kamada, Y., K. Yoshino, C. Kondo, T. Kawamata, N. Oshiro, K. Yonezawa, et Y. Ohsumi. 2010. Tor directly controls the Atg1 kinase complex to regulate autophagy *Mol Cell Biol*. 30:1049–1058.

Kang, R., H.J. Zeh, M.T. Lotze, et D. Tang. 2011. The Beclin 1 network regulates autophagy et apoptosis *Cell Death Differ.* 18:571–580.

Kanzawa, T., L. Zhang, L. Xiao, I.M. Germano, Y. Kondo, et S. Kondo. 2005. Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3 *Oncogene.* 24:980–991.

Karim, M.R., S. Fujimura, et M. Kadowaki. 2010. Vitamin E as a novel enhancer of macroautophagy in rat hepatocytes et H4-II-E cells *Biochem Biophys Res Commun.* 394:981–987.

Katsumata, K., J. Nishiyama, T. Inoue, N. Mizushima, J. Takeda, et M. Yuzaki. 2010. Dynein- et activity-dependent retrograde transport of autophagosomes in neuronal axons *Autophagy.* 6:378–385.

Kaushik, S., A.C. Massey, et A.M. Cuervo. 2006. Lysosome membrane lipid microdomains: novel regulators of chaperone-mediated autophagy *EMBO J.* 25:3921–3933.

Kaushik, S., et A.M. Cuervo. 2009. Methods to monitor chaperone-mediated autophagy *Meth Enzymol.* 452:297–324.

Kawaguchi, Y., J.J. Kovacs, A. McLaurin, J.M. Vance, A. Ito, et T.P. Yao. 2003. The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation et cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell.* 115:727–738.

Kawai, A., S. Takano, N. Nakamura, et S. Ohkuma. 2006. Quantitative monitoring of autophagic degradation *Biochem Biophys Res Commun.* 351:71–77.

Kawai, K., A. Saito, T. Sudo, et H. Osada. 2008. Specific regulation of cytokine-dependent p38 MAP kinase activation by p62/SQSTM1 *J Biochem.* 143:765–772.

Kawajiri, S., S. Saiki, S. Sato, F. Sato, T. Hatano, H. Eguchi, et N. Hattori. 2010. PINK1 is recruited to mitochondria with parkin et associates with LC3 in mitophagy *FEBS Lett.* 584:1073–1079.

Kawamata, T., Y. Kamada, Y. Kabeya, T. Sekito, et Y. Ohsumi. 2008. Organization of the pre-autophagosomal structure responsible for autophagosome formation *Mol Biol Cell.* 19:2039–2050.

Kågedal, K., W.S. Kim, H. Appelqvist, S. Chan, D. Cheng, L. Agholme, K. Barnham, H. McCann, G. Halliday, et B. Garner. 2010. Increased expression of the lysosomal cholesterol transporter NPC1 in Alzheimer's disease *Biochim Biophys Acta.* 1801:831–838.

Kegel, K.B., M. Kim, E. Sapp, C. McIntyre, J.G. Castaño, N. Aronin, et M. DiFiglia. 2000. Huntingtin expression stimulates endosomal-lysosomal activity, endosome tubulation, et autophagy *J Neurosci.* 20:7268–7278.

Keller, J.N., K.B. Hanni, et W.R. Markesbery. 2000a. Possible involvement of proteasome inhibition in aging: implications for oxidative stress. *Mech Ageing Dev.* 113:61–70.

Keller, J.N., K.B. Hanni, et W.R. Markesbery. 2000b. Impaired proteasome function in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 75:436–439.

Keller, J.N., J. Gee, et Q. Ding. 2002. The proteasome in brain aging. *Ageing Res Rev.* 1:279–293.

Keller, J.N., E. Dimayuga, Q. Chen, J. Thorpe, J. Gee, et Q. Ding. 2004. Autophagy, proteasomes, lipofuscin, et oxidative stress in the aging brain *Int J Biochem Cell Biol.* 36:2376–2391.

Khalfan, W.A., et D.J. Klionsky. 2002. Molecular machinery required for autophagy et the cytoplasm to vacuole targeting (Cvt) pathway in *S. cerevisiae* *Curr Opin Cell Biol.* 14:468–475.

Khan, M.T., et S.K. Joseph. 2010. Role of inositol trisphosphate receptors in autophagy in DT40 cells *J Biol Chem.* 285:16912–16920.

Kickstein, E., S. Krauss, P. Thornhill, D. Rutschow, R. Zeller, J. Sharkey, R. Williamson, M. Fuchs, A. Köhler, H. Glossmann, R. Schneider, C. Sutherland, et S. Schweiger. 2010. Biguanide metformin acts on tau phosphorylation via mTOR/protein phosphatase 2A (PP2A) signaling *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:21830–21835.

Kiffin, R., C. Christian, E. Knecht, et A.M. Cuervo. 2004. Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress *Mol Biol Cell.* 15:4829–4840.

Kihara, A., T. Noda, N. Ishihara, et Y. Ohsumi. 2001a. Two distinct Vps34 phosphatidylinositol 3-kinase complexes function in autophagy et carboxypeptidase Y sorting in *Saccharomyces cerevisiae* *J Cell Biol.* 152:519–530.

Kihara, A., Y. Kabeya, Y. Ohsumi, et T. Yoshimori. 2001b. Beclin-phosphatidylinositol 3-kinase complex functions at the trans-Golgi network *EMBO Rep.* 2:330–335.

Kim, E., P. Goraksha-Hicks, L. Li, T.P. Neufeld, et K. Guan. 2008a. Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response *Nat Cell Biol.* 10:935–945.

Kim, J., S.V. Scott, M.N. Oda, et D.J. Klionsky. 1997. Transport of a large oligomeric protein by the cytoplasm to vacuole protein targeting pathway *J Cell Biol.* 137:609–618.

Kim, J., M. Kundu, B. Viollet, et K. Guan. 2011. AMPK et mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 *Nat Cell Biol.* 13:132–141.

Kim, J., et D.J. Klionsky. 2000. Autophagy, cytoplasm-to-Vacuole targeting pathway, et pexophagy in yeast et mammalian cells. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev.biochem.69.1.303>. 69:303–342.

Kim, P.K., D.W. Hailey, R.T. Mullen, et J. Lippincott-Schwartz. 2008b. Ubiquitin signals autophagic degradation of cytosolic proteins et peroxisomes *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:20567–20574.

Kimura, S., T. Noda, et T. Yoshimori. 2007. Dissection of the autophagosome maturation process by a novel reporter protein, tandem fluorescent-tagged LC3 *Autophagy*. 3:452–460.

Kimura, S., T. Noda, et T. Yoshimori. 2008. Dynein-dependent movement of autophagosomes mediates efficient encounters with lysosomes. *Cell Struct Funct*. 33:109–122.

Kirkegaard, K., M.P. Taylor, et W.T. Jackson. 2004. Cellular autophagy: surrender, avoidance et subversion by microorganisms *Nat. Rev. Microbiol* 2:301–314.

Kirkin, V., T. Lamark, Y. Sou, G. Bjørkøy, J.L. Nunn, J. Bruun, E. Shvets, D.G. McEwan, T.H. Clausen, P. Wild, I. Bilusic, J. Theurillat, A. Overvatn, T. Ishii, Z. Elazar, M. Komatsu, I. Dikic, et T. Johansen. 2009a. A role for NBR1 in autophagosomal degradation of ubiquitinated substrates *Mol Cell*. 33:505–516.

Kirkin, V., T. Lamark, T. Johansen, et I. Dikic 2009b. NBR1 cooperates with p62 in selective autophagy of ubiquitinated targets *Autophagy*. 5:732–733.

Kirkin, V., et I. Dikic. 2007. Role of ubiquitin- et Ubl-binding proteins in cell signaling *Curr Opin Cell Biol*. 19:199–205.

Kirstein-Miles, J., et R.I. Morimoto. 2010. Caenorhabditis elegans as a model system to study intercompartmental proteostasis: Interrelation of mitochondrial function, longevity, et neurodegenerative diseases. *Dev Dyn*. 239:1529–1538.

Kittler, J.T., P. Delmas, J.N. Jovanovic, D.A. Brown, T.G. Smart, et S.J. Moss. 2000. Constitutive endocytosis of GABAA receptors by an association with the adaptin AP2 complex modulates inhibitory synaptic currents in hippocampal neurons *J Neurosci*. 20:7972–7977.

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

Klionsky, D.J. 2008. Autophagy revisited: a conversation with Christian de Duve. *Autophagy*. 4:740–743.

Klionsky, D.J., R. Cueva, et D.S. Yaver. 1992. Aminopeptidase I of Saccharomyces cerevisiae is localized to the vacuole independent of the secretory pathway *J Cell Biol*. 119:287–299.

Klionsky, D.J., J.M. Cregg, W.A. Dunn, S.D. Emr, Y. Sakai, I.V. Sandoval, A. Sibirny, S. Subramani, M. Thumm, M. Veenhuis, et Y. Ohsumi. 2003. A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes *Dev Cell*. 5:539–545.

Klionsky, D.J., A.M. Cuervo, W.A. Dunn, B. Levine, I. van der Klei, et P.O. Seglen. 2007. How shall I eat thee *Autophagy*. 3:413–416.

Klionsky, D.J., Z. Elazar, P.O. Seglen, et D.C. Rubinsztein. 2008. Does bafilomycin A1 block the fusion of autophagosomes with lysosomes *Autophagy*. 4:849–950.

Klionsky, D.J., et Y. Ohsumi. 1999. Vacuolar import of proteins et organelles from the cytoplasm *Annu Rev Cell Dev Biol*. 15:1–32.

Knaevelsrud, H., et A. Simonsen. 2010. Fighting disease by selective autophagy of aggregate-prone proteins *FEBS Lett*. 584:2635–2645.

Komatsu, M., S. Waguri, T. Ueno, J. Iwata, S. Murata, I. Tanida, J. Ezaki, N. Mizushima, Y. Ohsumi, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka, et T. Chiba. 2005a. Impairment of starvation-induced et constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *J Cell Biol*. 169:425–434.

Komatsu, M., S. Waguri, T. Ueno, J. Iwata, S. Murata, I. Tanida, J. Ezaki, N. Mizushima, Y. Ohsumi, Y. Uchiyama, E. Kominami, K. Tanaka, et T. Chiba. 2005b. Impairment of starvation-induced et constitutive autophagy in Atg7-deficient mice *J Cell Biol*. 169:425–434.

Komatsu, M., S. Waguri, T. Chiba, S. Murata, J. Iwata, I. Tanida, T. Ueno, M. Koike, Y. Uchiyama, E. Kominami, et K. Tanaka. 2006a. Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice *Nature*. 441:880–884.

Komatsu, M., E. Kominami, et K. Tanaka. 2006b. Autophagy et neurodegeneration. *Autophagy*. 2:315–317.

Komatsu, M., T. Ueno, S. Waguri, Y. Uchiyama, E. Kominami, et K. Tanaka. 2007a. Constitutive autophagy: vital role in clearance of unfavorable proteins in neurons. *Cell Death Differ*. 14:887–894.

Komatsu, M., Q. Wang, G. Holstein, V. Friedrich, J. Iwata, E. Kominami, B. Chait, K. Tanaka, et Z. Yue. 2007b. Essential role for autophagy protein Atg7 in the maintenance of axonal homeostasis et the prevention of axonal degeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:14489–14494.

Komatsu, M., S. Waguri, M. Koike, Y. Sou, T. Ueno, T. Hara, N. Mizushima, J. Iwata, J. Ezaki, S. Murata, J. Hamazaki, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Yanagawa, J. Uwayama, E. Warabi, H. Yoshida, T. Ishii, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Z. Yue, Y. Uchiyama, E. Kominami, et K. Tanaka. 2007c. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice. *Cell*. 131:1149–1163.

Komatsu, M., S. Waguri, M. Koike, Y. Sou, T. Ueno, T. Hara, N. Mizushima, J. Iwata, J. Ezaki, S. Murata, J. Hamazaki, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Yanagawa, J. Uwayama, E. Warabi, H. Yoshida, T. Ishii, A. Kobayashi, M. Yamamoto, Z. Yue, Y. Uchiyama, E. Kominami, et K. Tanaka. 2007d. Homeostatic levels of p62 control cytoplasmic inclusion body formation in autophagy-deficient mice *Cell*. 131:1149–1163.

Komatsu, M., H. Kurokawa, S. Waguri, K. Taguchi, A. Kobayashi, Y. Ichimura, Y. Sou, I. Ueno, A. Sakamoto, K.I. Tong, M. Kim, Y. Nishito, S. Iemura, T. Natsume, T. Ueno, E. Kominami, H. Motohashi, K. Tanaka, et M. Yamamoto.

2010. The selective autophagy substrate p62 activates the stress responsive transcription factor Nrf2 through inactivation of Keap1 *Nat Cell Biol.* 12:213–223.

Komatsu, M., et Y. Ichimura. 2010. Physiological significance of selective degradation of p62 by autophagy. *FEBS Lett.* 584:1374–1378.

Kondo, Y., T. Kanzawa, R. Sawaya, et S. Kondo. 2005. The role of autophagy in cancer development et response to therapy *Nat Rev Cancer.* 5:726–734.

Kopito, R.R. 2000. Aggresomes, inclusion bodies et protein aggregation *Trends Cell Biol.* 10:524–530.

Korolchuk, V.I., A. Mansilla, F.M. Menzies, et D.C. Rubinsztein. 2009a. Autophagy inhibition compromises degradation of ubiquitin-proteasome pathway substrates *Mol Cell.* 33:517–527.

Korolchuk, V.I., F.M. Menzies, et D.C. Rubinsztein. 2009b. A novel link between autophagy et the ubiquitin-proteasome system. *Autophagy.* 5:862–863.

Korolchuk, V.I., S. Saiki, M. Lichtenberg, F.H. Siddiqi, E.A. Roberts, S. Imarisio, L. Jahreiss, S. Sarkar, M. Futter, F.M. Menzies, C.J. O’Kane, V. Deretic, et D.C. Rubinsztein. 2011. Lysosomal positioning coordinates cellular nutrient responses *Nat Cell Biol.*

Korolchuk, V.I., et D.C. Rubinsztein. 2011. Regulation of autophagy by lysosomal positioning *Autophagy.* 7.

Kosuga, S., E. Tashiro, T. Kajioaka, M. Ueki, Y. Shimizu, et M. Imoto. 2005. GSK-3beta directly phosphorylates et activates MARK2/PAR-1 *J Biol Chem.* 280:42715–42722.

Kourtis, N., et N. Tavernarakis. 2009. Autophagy et cell death in model organisms *Cell Death Differ.* 16:21–30.

Kovacs, G.G., et H. Budka. 2009. Molecular pathology of human prion diseases *Int J Mol Sci.* 10:976–999.

Kozutsumi, Y., M. Segal, K. Normington, M.J. Gething, et J. Sambrook. 1988. The presence of malfolded proteins in the endoplasmic reticulum signals the induction of glucose-regulated proteins *Nature.* 332:462–464.

Köchl, R., X.W. Hu, E.Y.W. Chan, et S.A. Tooze. 2006. Microtubules facilitate autophagosome formation et fusion of autophagosomes with endosomes *Traffic.* 7:129–145.

Kraft, C., A. Deplazes, M. Sohrmann, et M. Peter. 2008. Mature ribosomes are selectively degraded upon starvation by an autophagy pathway requiring the Ubp3p/Bre5p ubiquitin protease *Nat Cell Biol.* 10:602–610.

Kraft, C., F. Reggiori, et M. Peter. 2009. Selective types of autophagy in yeast *Biochim Biophys Acta.* 1793:1404–1412.

Kremmer, E., K. Ohst, J. Kiefer, N. Brewis, et G. Walter. 1997. Separation of PP2A core enzyme et holoenzyme with monoclonal antibodies against the regulatory A subunit: abundant expression of both forms in cells *Mol Cell Biol.* 17:1692–1701.

Krick, R., Y. Mühe, T. Prick, M. Bredschneider, S. Bremer, D. Wenzel, E. Eskelinen, et M. Thumm. 2009. Piecemeal microautophagy of the nucleus: genetic et morphological traits *Autophagy.* 5:270–272.

Kroemer, G., L. Galluzzi, P. Vandenabeele, J. Abrams, E.S. Alnemri, E.H. Baehrecke, M.V. Blagosklonny, W.S. El-Deiry, P. Golstein, D.R. Green, M. Hengartner, R.A. Knight, S. Kumar, S.A. Lipton, W. Malorni, G. Nuñez, M.E. Peter, J. Tschopp, J. Yuan, M. Piacentini, B. Zhivotovsky, G. Melino, Nomenclature Committee on Cell Death 2009. 2009. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009 *Cell Death Differ.* 16:3–11.

Kroemer, G., G. Mariño, et B. Levine. 2010. Autophagy et the integrated stress response *Mol Cell.* 40:280–293.

Ktistakis, N.T., S. Andrews, et J. Long. 2011. What is the advantage of a transient precursor in autophagosome biogenesis *Autophagy.* 7.

Kuma, A., N. Mizushima, N. Ishihara, et Y. Ohsumi. 2002. Formation of the approximately 350-kDa Apg12-Apg5-Apg16 multimeric complex, mediated by Apg16 oligomerization, is essential for autophagy in yeast. *J Biol Chem.* 277:18619–18625.

Kuma, A., M. Hatano, M. Matsui, A. Yamamoto, H. Nakaya, T. Yoshimori, Y. Ohsumi, T. Tokuhiya, et N. Mizushima. 2004. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature.* 432:1032–1036.

Kuma, A., M. Matsui, et N. Mizushima. 2007. LC3, an autophagosome marker, can be incorporated into protein aggregates independent of autophagy: caution in the interpretation of LC3 localization. *Autophagy.* 3:323–328.

Kume, K., H. Hanyu, T. Sato, K. Hirao, S. Shimizu, H. Kanetaka, H. Sakurai, et T. Iwamoto. 2011. Vascular risk factors are associated with faster decline of Alzheimer disease: a longitudinal SPECT study *J Neurol.*

Kundu, M., T. Lindsten, C. Yang, J. Wu, F. Zhao, J. Zhang, M.A. Selak, P.A. Ney, et C.B. Thompson. 2008. Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria et ribosomes during reticulocyte maturation *Blood.* 112:1493–1502.

Kurihara, N., Y. Hiruma, H. Zhou, M.A. Subler, D.W. Dempster, F.R. Singer, S.V. Reddy, H.E. Gruber, J.J. Windle, et G.D. Roodman. 2007. Mutation of the sequestosome 1 (p62) gene increases osteoclastogenesis but does not induce Paget disease. *J Clin Invest.* 117:133–142.

Kuroyanagi, H., J. Yan, N. Seki, Y. Yamanouchi, Y. Suzuki, T. Takano, M. Muramatsu, et T. Shirasawa. 1998. Human ULK1, a novel serine/threonine kinase related to UNC-51 kinase of *Caenorhabditis elegans*: cDNA cloning, expression, et chromosomal assignment *Genomics.* 51:76–85.

- Kuusisto, E., T. Suuronen, et A. Salminen. 2001. Ubiquitin-binding protein p62 expression is induced during apoptosis et proteasomal inhibition in neuronal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 280:223–228.
- Kuusisto, E., Salminen, A., et I. Alafuzoff. 2002. Early accumulation of p62 in neurofibrillary tangles in Alzheimer's disease: possible role in tangle formation. *Neuropathology et applied neurobiology.* 28:228–237.
- Kuusisto, E., T. Kauppinen, et I. Alafuzoff. 2008. Use of p62/SQSTM1 antibodies for neuropathological diagnosis. *Neuropathology et applied neurobiology.* 34:169–180.
- Kvam, E., et D.S. Goldfarb. 2007. Nucleus-vacuole junctions et piecemeal microautophagy of the nucleus in *S. cerevisiae*. *Autophagy.* 3:85–92.
- Lafay-Chebassier, C., M. Paccalin, G. Page, S. Barc-Pain, M.C. Perault-Pochat, R. Gil, L. Pradier, et J. Hugon. 2005. mTOR/p70S6k signalling alteration by Abeta exposure as well as in APP-PS1 transgenic models et in patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 94:215–225.
- Lai, T., et G. Garriga. 2004. The conserved kinase UNC-51 acts with VAB-8 et UNC-14 to regulate axon outgrowth in *C. elegans*. *Development.* 131:5991–6000.
- Lamark, T., M. Perander, H. Outzen, K. Kristiansen, A. Overvatn, E. Michaelsen, G. Bjørkøy, et T. Johansen. 2003. Interaction codes within the family of mammalian Phox et Bem1p domain-containing proteins. *J Biol Chem.* 278:34568–34581.
- Laplanche, M., et D.M. Sabatini. 2009. mTOR signaling at a glance. *J Cell Sci.* 122:3589–3594.
- Laurin, N., J.P. Brown, J. Morissette, et V. Raymond. 2002. Recurrent mutation of the gene encoding sequestosome 1 (SQSTM1/p62) in Paget disease of bone. *Am. J. Hum. Genet.* 70:1582–1588.
- Lavieu, G., F. Scarlatti, G. Sala, S. Carpentier, T. Levade, R. Ghidoni, J. Botti, et P. Codogno. 2006. Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 et its role in cell survival during nutrient starvation. *J Biol Chem.* 281:8518–8527.
- Lee, E., et C. Tournier. 2011. The requirement of uncoordinated 51-like kinase 1 (ULK1) et ULK2 in the regulation of autophagy. *Autophagy.* 7.
- Lee, I.H., L. Cao, R. Mostoslavsky, D.B. Lombard, J. Liu, N.E. Bruns, M. Tsokos, F.W. Alt, et T. Finkel. 2008. A role for the NAD-dependent deacetylase Sirt1 in the regulation of autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 105:3374–3379.
- Lee, J., Y. Chen, T. Tolstykh, et J. Stock. 1996. A specific protein carboxyl methyltransferase that demethylates phosphoprotein phosphatase 2A in bovine brain. *Proc Natl Acad Sci USA.* 93:6043–6047.
- Lee, J., W.H. Yu, A. Kumar, S. Lee, P.S. Mohan, C.M. Peterhoff, D.M. Wolfe, M. Martinez-Vicente, A.C. Massey, G. Sovak, Y. Uchiyama, D. Westaway, A.M. Cuervo, et R.A. Nixon. 2010a. Lysosomal proteolysis et autophagy require presenilin 1 et are disrupted by Alzheimer-related PS1 mutations. *Cell.* 141:1146–1158.
- Lee, J., et F. Gao. 2008. Regulation of Abeta pathology by beclin 1: a protective role for autophagy. *J Clin Invest.* 118:2015–2018.
- Lee, J.W., S. Park, Y. Takahashi, et H. Wang. 2010b. The association of AMPK with ULK1 regulates autophagy. *PLoS ONE.* 5:e15394.
- Lee, M.N., S.H. Ha, J. Kim, A. Koh, C.S. Lee, J.H. Kim, H. Jeon, D. Kim, P. Suh, et S.H. Ryu. 2009. Glycolytic flux signals to mTOR through glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase-mediated regulation of Rheb. *Mol Cell Biol.* 29:3991–4001.
- Lee, S., Y. Sato, et R.A. Nixon. 2011. Lysosomal Proteolysis Inhibition Selectively Disrupts Axonal Transport of Degradative Organelles et Causes an Alzheimer's-Like Axonal Dystrophy. *J Neurosci.* 31:7817–7830.
- Lee, Y., M. Seo, Y. Kim, S.Y. Kim, U.G. Kang, Y. Kim, et Y. Juhn. 2005. Membrane depolarization induces the undulating phosphorylation/dephosphorylation of glycogen synthase kinase 3beta, et this dephosphorylation involves protein phosphatases 2A et 2B in SH-SY5Y human neuroblastoma cells. *J Biol Chem.* 280:22044–22052.
- Lee, Y.H., J. Ko, I. Joung, J.H. Kim, et J. Shin. 1998. Immediate early response of the p62 gene encoding a non-proteasomal multiubiquitin chain binding protein. *FEBS Lett.* 438:297–300.
- Legakis, J.E., W. Yen, et D.J. Klionsky. 2007. A cycling protein complex required for selective autophagy. *Autophagy.* 3:422–432.
- Lehmann, M. 2008. Roles of the FOXA transcription factor Fork head in autophagic developmental cell death. *Autophagy.* 4:713–714.
- Lehmann-Che, J., N. Renault, M.L. Giron, P. Roingeard, E. Clave, J. Tobaly-Tapiero, P. Bittoun, A. Toubert, H. de Thé, et A. Saïb. 2007. Centrosomal latency of incoming foamy viruses in resting cells. *PLoS Pathog.* 3:e74.
- Lemasters, J.J., A.L. Nieminen, T. Qian, L.C. Trost, S.P. Elmore, Y. Nishimura, R.A. Crowe, W.E. Cascio, C.A. Bradham, D.A. Brenner, et B. Herman. 1998. The mitochondrial permeability transition in cell death: a common mechanism in necrosis, apoptosis et autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 1366:177–196.
- Lemke, A., A.F. Kiderlen, et O. Kayser. 2005. Amphotericin B. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 68:151–162.
- Letenneur, L., V. Gilleron, D. Commenges, C. Helmer, J.M. Orgogozo, et J. Dartigues. 1999. Are sex et educational level independent predictors of dementia et Alzheimer's disease? Incidence data from the PAQUID project. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 66:177–183.
- Levine, B., N. Mizushima, et H.W. Virgin. 2011. Autophagy in immunity et inflammation. *Nature.* 469:323–335.

- Levine, B., et G. Kroemer. 2008. Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell*. 132:27–42.
- Levine, B., et G. Kroemer. 2009. Autophagy in aging, disease et death: the true identity of a cell death impostor *Cell Death Differ*. 16:1–2.
- Levine, B., et J. Abrams. 2008. p53: The Janus of autophagy *Nat Cell Biol*. 10:637–639.
- Li, B., C. Li, R. Peng, X. Wu, H. Wang, D. Wan, X. Zhu, et X. Zhang. 2009. The expression of beclin 1 is associated with favorable prognosis in stage IIIB colon cancers *Autophagy*. 5:303–306.
- Li, H., C.K. Tsang, M. Watkins, P.G. Bertram, et X.F.S. Zheng. 2006. Nutrient regulates Tor1 nuclear localization et association with rDNA promoter. *Nature*. 442:1058–1061.
- Li, J., M. Ni, B. Lee, E. Barron, D.R. Hinton, et A.S. Lee. 2008. The unfolded protein response regulator GRP78/BiP is required for endoplasmic reticulum integrity et stress-induced autophagy in mammalian cells. *Cell Death Differ*. 15:1460–1471.
- Li, L., E. Kim, H. Yuan, K. Inoki, P. Goraksha-Hicks, R.L. Schiesher, T.P. Neufeld, et K. Guan. 2010. Regulation of mTORC1 by the Rab et Arf GTPases *J Biol Chem*. 285:19705–19709.
- Li, L., X. Wang, X. Fei, L. Xia, Z. Qin, et Z. Liang. 2011a. Parkinson's disease involves autophagy et abnormal distribution of cathepsin L *Neurosci Lett*. 489:62–67.
- Li, L., et K. Guan. 2009. Amino acid signaling to TOR activation: Vam6 functioning as a Gtr1 GEF *Mol Cell*. 35:543–545.
- Li, M., Y. Hou, J. Wang, X. Chen, Z. Shao, et X. Yin. 2011b. Kinetics comparisons of mammalian Atg4 homologues indicate selective preferences toward diverse Atg8 substrates *J Biol Chem*. 286:7327–7338.
- Liang, C., J. Lee, K. Inn, M.U. Gack, Q. Li, E.A. Roberts, I. Vergne, V. Deretic, P. Feng, C. Akazawa, et J.U. Jung. 2008a. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation et endocytic trafficking *Nat Cell Biol*. 10:776–787.
- Liang, C., D. Sir, S. Lee, J.J. Ou, et J.U. Jung. 2008b. Beyond autophagy: the role of UVRAG in membrane trafficking *Autophagy*. 4:817–820.
- Liang, J., S.H. Shao, Z. Xu, B. Hennessy, Z. Ding, M. Larrea, S. Kondo, D.J. Dumont, J.U. Gutterman, C.L. Walker, J.M. Slingerland, et G.B. Mills. 2007. The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis *Nat Cell Biol*. 9:218–224.
- Liang, X.H., S. Jackson, M. Seaman, K. Brown, B. Kempkes, H. Hibshoosh, et B. Levine. 1999. Induction of autophagy et inhibition of tumorigenesis by beclin 1 *Nature*. 402:672–676.
- Liang, X.H., J. Yu, K. Brown, et B. Levine. 2001. Beclin 1 contains a leucine-rich nuclear export signal that is required for its autophagy et tumor suppressor function *Cancer Res*. 61:3443–3449.
- Liao, G., Y. Yao, J. Liu, Z. Yu, S. Cheung, A. Xie, X. Liang, et X. Bi. 2007. Cholesterol accumulation is associated with lysosomal dysfunction et autophagic stress in Npc1 ^{-/-} mouse brain *Am J Pathol*. 171:962–975.
- Liberski, P.P. 2004. Spongiform change--an electron microscopic view *Folia Neuropathol*. 42 Suppl B:59–70.
- Liberski, P.P., B. Sikorska, J. Bratosiewicz-Wasik, D.C. Gajdusek, et P. Brown. 2004. Neuronal cell death in transmissible spongiform encephalopathies (prion diseases) revisited: from apoptosis to autophagy *Int J Biochem Cell Biol*. 36:2473–2490.
- Lim, J., H. Kim, M.B.H. Youdim, I.J. Rhyu, K. Choe, et Y.J. Oh. 2011. Binding preference of p62 towards LC3-II during dopaminergic neurotoxin-induced impairment of autophagic flux *Autophagy*. 7:51–60.
- Lin, C., C. Chen, C. Chiang, M. Jan, W. Huang, et Y. Lin. 2007. GSK-3beta acts downstream of PP2A et the PI 3-kinase-Akt pathway, et upstream of caspase-2 in ceramide-induced mitochondrial apoptosis. *J Cell Sci*. 120:2935–2943.
- Lin, M.G., et Q. Zhong. 2011. Interaction between small GTPase Rab7 et PI3KC3 links autophagy et endocytosis: A new Rab7 effector protein sheds light on membrane trafficking pathways *Small Gtpases*. 2:85–88.
- Lin, Y., T.R. Hupp, et C. Stevens. 2010. Death-associated protein kinase (DAPK) et signal transduction: additional roles beyond cell death *FEBS J*. 277:48–57.
- Linares, J.F., R. Amanchy, M.T. Diaz-Meco, et J. Moscat. 2011. Phosphorylation of p62 by cdk1 controls the timely transit of cells through mitosis et tumor cell proliferation *Mol Cell Biol*. 31:105–117.
- Ling, D., H. Song, D. Garza, T.P. Neufeld, et P.M. Salvaterra. 2009. Abeta42-induced neurodegeneration via an age-dependent autophagic-lysosomal injury in *Drosophila* *PLoS ONE*. 4:e4201.
- Liou, W., H.J. Geuze, M.J. Geelen, et J.W. Slot. 1997. The autophagic et endocytic pathways converge at the nascent autophagic vacuoles *J Cell Biol*. 136:61–70.
- Liu, B., A. Moloney, S. Meehan, K. Morris, S.E. Thomas, L.C. Serpell, R. Hider, S.J. Marciniak, D.A. Lomas, et D.C. Crowther. 2011a. Iron promotes the toxicity of amyloid beta peptide by impeding its ordered aggregation *J Biol Chem*. 286:4248–4256.
- Liu, E., C.A. Knutzen, S. Krauss, S. Schweiger, et G.G. Chiang. 2011b. Control of mTORC1 signaling by the Opitz syndrome protein MID1 *Proc Natl Acad Sci USA*. 108:8680–8685.
- Liu, F., K. Iqbal, I. Grundke-Iqbal, S. Rossie et C. Gong. 2005a. Dephosphorylation of tau by protein phosphatase 5: impairment in Alzheimer's disease. *J Biol Chem*. 280:1790–1796.

- Liu, F., I. Grundke-Iqbal, K. Iqbal, et C. Gong. 2005b. Contributions of protein phosphatases PP1, PP2A, PP2B et PP5 to the regulation of tau phosphorylation *Eur J Neurosci*. 22:1942–1950.
- Liu, L., L. Chen, Y. Luo, W. Chen, H. Zhou, B. Xu, X. Han, T. Shen, et S. Huang. 2010. Rapamycin inhibits IGF-1 stimulated cell motility through PP2A pathway *PLoS ONE*. 5:e10578.
- Loewith, R., E. Jacinto, S. Wullschleger, A. Lorberg, J.L. Crespo, D. Bonenfant, W. Oppliger, P. Jenoe, et M.N. Hall. 2002. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control. *Mol Cell*. 10:457–468.
- Long, J., T.R.A. Gallagher, J.R. Cavey, P.W. Sheppard, S.H. Ralston, R. Layfield, et M.S. Searle. 2008. Ubiquitin recognition by the ubiquitin-associated domain of p62 involves a novel conformational switch *J Biol Chem*. 283:5427–5440.
- Longatti, A., et S.A. Tooze. 2009. Vesicular trafficking et autophagosome formation *Cell Death Differ*. 16:956–965.
- Longin, S., K. Zwaenepoel, J.V. Louis, S. Dilworth, J. Goris, et V. Janssens. 2007. Selection of protein phosphatase 2A regulatory subunits is mediated by the C terminus of the catalytic Subunit *J Biol Chem*. 282:26971–26980.
- Lorin, S., G. Pierron, K.M. Ryan, P. Codogno, et M. Djavaheri-Mergny. 2010. Evidence for the interplay between JNK et p53-DRAM signalling pathways in the regulation of autophagy *Autophagy*. 6:153–154.
- Löffler, A.S., S. Alers, A.M. Dieterle, H. Keppeler, M. Franz-Wachtel, M. Kundu, D.G. Campbell, S. Wesselborg, D.R. Alessi, et B. Stork. 2011. Ulk1-mediated phosphorylation of AMPK constitutes a negative regulatory feedback loop *Autophagy*. 7.
- Luchsinger, J.A., J.M. Noble, et N. Scarmeas. 2007. Diet et Alzheimer's disease *Curr Neurol Neurosci Rep*. 7:366–372.
- Luchsinger, J.A., M.X. Tang, J. Miller, R. Green, et R. Mayeux. 2008. Higher folate intake is related to lower risk of Alzheimer's disease in the elderly *J Nutr Health Aging*. 12:648–650.
- Lum, J.J., R.J. DeBerardinis, et C.B. Thompson. 2005. Autophagy in metazoans: cell survival in the land of plenty *Nat Rev Mol Cell Biol*. 6:439–448.
- Luo, C., X. Chen, R. Yang, Y. Sun, Q. Li, H. Bao, Q. Cao, H. Ni, Z. Qin, et L. Tao. 2010. Cathepsin B contributes to traumatic brain injury-induced cell death through a mitochondria-mediated apoptotic pathway *J Neurosci Res*. 88:2847–2858.
- Luo, S., et D.C. Rubinsztein. 2010. Apoptosis blocks Beclin 1-dependent autophagosome synthesis: an effect rescued by Bcl-xL *Cell Death Differ*. 17:268–277.
- Lynch-Day, M.A., et D.J. Klionsky. 2010. The Cvt pathway as a model for selective autophagy *FEBS Lett*. 584:1359–1366.
- Maeda, S., N. Sahara, Y. Saito, S. Murayama, A. Ikai, et A. Takashima. 2006. Increased levels of granular tau oligomers: an early sign of brain aging et Alzheimer's disease *Neurosci Res*. 54:197–201.
- Magnani, E., J. Fan, L. Gasparini, M. Golding, M. Williams, G. Schiavo, M. Goedert, L.A. Amos, et M.G. Spillantini. 2007. Interaction of tau protein with the dynactin complex *EMBO J*. 26:4546–4554.
- Magwire, M.M., A. Yamamoto, M.A. Carbone, N.V. Roshina, A.V. Symonenko, E.G. Pasyukova, T.V. Morozova, et T.F.C. Mackay. 2010. Quantitative et molecular genetic analyses of mutations increasing Drosophila life span *PLoS Genet*. 6:e1001037.
- Maiuri, M.C., A. Criollo, E. Tasdemir, J.M. Vicencio, N. Tajeddine, J.A. Hickman, O. Geneste, et G. Kroemer. 2007. BH3-only proteins et BH3 mimetics induce autophagy by competitively disrupting the interaction between Beclin 1 et Bcl-2/Bcl-X(L) *Autophagy*. 3:374–376.
- Majeski, A.E., et J.F. Dice. 2004. Mechanisms of chaperone-mediated autophagy *Int J Biochem Cell Biol*. 36:2435–2444.
- Malicdan, M.C., S. Noguchi, I. Nonaka, P. Saftig, et I. Nishino. 2008. Lysosomal myopathies: an excessive build-up in autophagosomes is too much to handle *Neuromuscul. Disord* 18:521–529.
- Mandelkow, E.M., G. Drewes, J. Biernat, N. Gustke, J. van Lint, J.R. Vandenheede, et E. Mandelkow. 1992. Glycogen synthase kinase-3 et the Alzheimer-like state of microtubule-associated protein tau *FEBS Lett*. 314:315–321.
- Mandelkow, E.M., K. Stamer, R. Vogel, E. Thies, et E. Mandelkow. 2003. Clogging of axons by tau, inhibition of axonal traffic et starvation of synapses *Neurobiol Aging*. 24:1079–1085.
- Mann, S.S., et J.A. Hammarback. 1994. Molecular characterization of light chain 3. A microtubule binding subunit of MAP1A et MAP1B *J Biol Chem*. 269:11492–11497.
- Mari, M., et F. Reggiori. 2010. Atg9 reservoirs, a new organelle of the yeast endomembrane system *Autophagy*. 6:1221–1223.
- Marino, G., N. Salvador-Montoliu, A. Fueyo, E. Knecht, N. Mizushima, et C. Lopez-Otin. 2007. Tissue-specific Autophagy Alterations et Increased Tumorigenesis in Mice Deficient in Atg4C/Autophagin-3. *J Biol Chem*. 282:18573–18583.
- Marino, M.L., S. Fais, M. Djavaheri-Mergny, A. Villa, S. Meschini, F. Lozupone, G. Venturi, P. Della Mina, S. Pattingre, L. Rivoltini, P. Codogno, et A. De Milito. 2010. Proton pump inhibition induces autophagy as a survival mechanism following oxidative stress in human melanoma cells *Cell Death Dis*. 1:e87.

- Mariño, G., A.F. Fernández, S. Cabrera, Y.W. Lundberg, R. Cabanillas, F. Rodríguez, N. Salvador-Montoliu, J.A. Vega, A. Germanà, A. Fueyo, J.M.P. Freije, et C. López-Otín. 2010. Autophagy is essential for mouse sense of balance *J Clin Invest.* 120:2331–2344.
- Martens, S., et H.T. McMahon. 2008. Mechanisms of membrane fusion: disparate players et common principles *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9:543–556.
- Martin, A., J.A. Joseph, et A.M. Cuervo. 2002. Stimulatory effect of vitamin C on autophagy in glial cells *J Neurochem.* 82:538–549.
- Martin, L., A. Magnaudeix, F. Esclaire, C. Yardin, et F. Terro. 2009. Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β downregulates total tau proteins in cultured neurons et its reversal by the blockade of protein phosphatase-2A *Brain Res.* 1252:66–75.
- Martin, L., X. Latypova, et F. Terro. 2011a. Post-translational modifications of tau protein: implications for Alzheimer's disease *Neurochem Int.* 58:458–471.
- Martin, L., G. Page, et F. Terro. 2011b. Tau phosphorylation et neuronal apoptosis induced by the blockade of PP2A preferentially involve GSK3 β . *Neurochem Int.*
- Martinet, W., G. de Meyer, L. Andries, A. Herman, et M. Kockx. 2006. In situ detection of starvation-induced autophagy. *J Histochem Cytochem.* 54:85–96.
- Martinez-Vicente, M., Z. Talloczy, E. Wong, G. Tang, H. Koga, S. Kaushik, R. de Vries, E. Arias, S. Harris, D. Sulzer, et A.M. Cuervo. 2010. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease *Nat Neurosci.* 13:567–576.
- Martinez-Vicente, M., et A.M. Cuervo. 2007. Autophagy et neurodegeneration: when the cleaning crew goes on strike *Lancet Neurol.* 6:352–361.
- Massey, A.C., S. Kaushik, G. Sovak, R. Kiffin, et A.M. Cuervo. 2006a. Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:5805–5810.
- Massey, A.C., S. Kaushik, et A.M. Cuervo. 2006b. Lysosomal chat maintains the balance *Autophagy.* 2:325–327.
- Massey, A.C., A. Follenzi, R. Kiffin, C. Zhang, et A.M. Cuervo. 2008. Early cellular changes after blockage of chaperone-mediated autophagy *Autophagy.* 4:442–456.
- Matsuda, N., S. Sato, K. Shiba, K. Okatsu, K. Saisho, C.A. Gautier, Y. Sou, S. Saiki, S. Kawajiri, F. Sato, M. Kimura, M. Komatsu, N. Hattori, et K. Tanaka. 2010. PINK1 stabilized by mitochondrial depolarization recruits Parkin to damaged mitochondria et activates latent Parkin for mitophagy *J Cell Biol.* 189:211–221.
- Matsunaga, K., T. Noda, et T. Yoshimori. 2009. Binding Rubicon to cross the Rubicon *Autophagy.* 5:876–877.
- Matsunaga, K., E. Morita, T. Saitoh, S. Akira, N.T. Ktistakis, T. Izumi, T. Noda, et T. Yoshimori. 2010. Autophagy requires endoplasmic reticulum targeting of the PI3-kinase complex via Atg14L. *J Cell Biol.* 190:511–521.
- Matsuura, A., M. Tsukada, Y. Wada, et Y. Ohsumi. 1997. Apg1p, a novel protein kinase required for the autophagic process in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene.* 192:245–250.
- McCay, C.M., M.F. Crowell, et L.A. Maynard. 1935. The effect of retarded growth upon the length of life span et upon the ultimate body size. *Nutrition.* 5:63–79.
- McConnell, J.L., R.J. Gomez, L.R.A. McCorvey, B.K. Law, et B.E. Wadzinski. 2007. Identification of a PP2A-interacting protein that functions as a negative regulator of phosphatase activity in the ATM/ATR signaling pathway *Oncogene.* 26:6021–6030.
- McEwan, D.G., et I. Dikic. 2010. Not all autophagy membranes are created equal *Cell.* 141:564–566.
- McPhee, C., et E. Baehrecke. 2009. Autophagy in *Drosophila melanogaster*. *Biochim Biophys Acta.* 1793:1452–1460.
- McPhee, C.K., et E.H. Baehrecke. 2010. The engulfment receptor Draper is required for autophagy during cell death *Autophagy.* 6:1192–1193.
- Mehrpour, M., A. Esclatine, I. Beau, et P. Codogno. 2010. Autophagy in health et disease. 1. Regulation et significance of autophagy: an overview. *Am J Physiol, Cell Physiol.* 298:C776–85.
- Meijer, A.J., et P. Codogno. 2004. Regulation et role of autophagy in mammalian cells *Int J Biochem Cell Biol.* 36:2445–2462.
- Meley, D., C. Bauvy, J.H.P.M. Houben-Weerts, P.F. Dubbelhuis, M.T.J. Helmond, P. Codogno, et A.J. Meijer. 2006. AMP-activated protein kinase et the regulation of autophagic proteolysis *J Biol Chem.* 281:34870–34879.
- Meléndez, A., Z. Talloczy, M. Seaman, E. Eskelinen, D.H. Hall, et B. Levine. 2003. Autophagy genes are essential for dauer development et life-span extension in *C. elegans* *Science.* 301:1387–1391.
- Meléndez, A., et T.P. Neufeld. 2008. The cell biology of autophagy in metazoans: a developing story *Development.* 135:2347–2360.
- Mercer, C.A., A. Kaliappan, et P.B. Dennis. 2009. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 et is essential for macroautophagy. *Autophagy.* 5:649–662.

Meske, V., F. Albert, et T.G. Ohm. 2008. Coupling of mammalian target of rapamycin with phosphoinositide 3-kinase signaling pathway regulates protein phosphatase 2A- et glycogen synthase kinase-3 -dependent phosphorylation of Tau *J Biol Chem.* 283:100–109.

Metzger, S., M. Saukko, H. Van Che, L. Tong, Y. Puder, O. Riess, et H.P. Nguyen. 2010. Age at onset in Huntington's disease is modified by the autophagy pathway: implication of the V471A polymorphism in *Atg7 Hum. Genet* 128:453–459.

Miller, B.C., Z. Zhao, L.M. Stephenson, K. Cadwell, H.H. Pua, H.K. Lee, N.N. Mizushima, A. Iwasaki, Y. He, W. Swat, et H.W. Virgin. 2008. The autophagy gene ATG5 plays an essential role in B lymphocyte development *Autophagy.* 4:309–314.

Millward, T.A., S. Zolnierowicz, et B.A. Hemmings. 1999. Regulation of protein kinase cascades by protein phosphatase 2A *Trends Biochem Sci.* 24:186–191.

Miyasaka, T., S. Sato, Y. Tatebayashi, et A. Takashima. 2010. Microtubule destruction induces tau liberation et its subsequent phosphorylation *FEBS Lett.* 584:3227–3232.

Mizuno, Y., M. Amari, M. Takatama, H. Aizawa, B. Mihara, et K. Okamoto. 2006. Immunoreactivities of p62, an ubiquitin-binding protein, in the spinal anterior horn cells of patients with amyotrophic lateral sclerosis *J. Neurol. Sci* 249:13–18.

Mizushima, N. 2004. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:2491–2502.

Mizushima, N. 2009. Methods for monitoring autophagy using GFP-LC3 transgenic mice. *Methods Enzymol.* 452:13–23.

Mizushima, N. 2010. The role of the Atg1/ULK1 complex in autophagy regulation *Current opinion in cell biology.* 22:132–139.

Mizushima, N., H. Sugita, T. Yoshimori, et Y. Ohsumi. 1998. A new protein conjugation system in human. The counterpart of the yeast Apg12p conjugation system essential for autophagy *J Biol Chem.* 273:33889–33892.

Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Hatano, Y. Kobayashi, Y. Kabeya, K. Suzuki, T. Tokuhisa, Y. Ohsumi, et T. Yoshimori. 2001. Dissection of Autophagosome Formation Using Apg5-Deficient Mouse Embryonic Stem Cells. *J Cell Biol.* 152:657–668.

Mizushima, N., Y. Ohsumi, et T. Yoshimori. 2002. Autophagosome formation in mammalian cells *Cell Struct Funct.* 27:421–429.

Mizushima, N., A. Kuma, Y. Kobayashi, A. Yamamoto, M. Matsubae, T. Takao, T. Natsume, Y. Ohsumi, et T. Yoshimori. 2003. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate *J Cell Sci.* 116:1679–1688.

Mizushima, N., A. Yamamoto, M. Matsui, T. Yoshimori, et Y. Ohsumi. 2004. In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker *Mol Biol Cell.* 15:1101–1111.

Mizushima, N., B. Levine, A.M. Cuervo, et D.J. Klionsky. 2008. Autophagy fights disease through cellular self-digestion *Nature.* 451:1069–1075.

Mizushima, N., et T. Hara. 2006. Intracellular Quality Control by Autophagy: How Does Autophagy Prevent Neurodegeneration *Autophagy.* 2:298–300.

Mizushima, N., et T. Yoshimori. 2007. How to interpret LC3 immunoblotting *Autophagy.* 3:542–545.

Mizushima, N., et Y. Ohsumi. 1999. Apg16p is required for the function of the Apg12p-Apg5p conjugate in the yeast autophagy pathway *The EMBO Journal.* 18:3888–3896.

Monastyrska, I., T. Shintani, D.J. Klionsky, et F. Reggiori. 2006. Atg11 directs autophagosome cargoes to the PAS along actin cables *Autophagy.* 2:119–121.

Monastyrska, I., C. He, J. Geng, A.D. Hoppe, Z. Li, et D.J. Klionsky. 2008. Arp2 links autophagic machinery with the actin cytoskeleton *Mol Biol Cell.* 19:1962–1975.

Monastyrska, I., E. Rieter, D.J. Klionsky, et F. Reggiori. 2009. Multiple roles of the cytoskeleton in autophagy *Biol Rev Camb Philos Soc.* 84:431–448.

Moreno, S., V. Imbroglini, E. Ferraro, C. Bernardi, A. Romagnoli, A.S. Berrebi, et F. Cecconi. 2006. Apoptosome impairment during development results in activation of an autophagy program in cerebral cortex *Apoptosis.* 11:1595–1602.

Morimoto, R.I. 2008. Proteotoxic stress et inducible chaperone networks in neurodegenerative disease et aging. *Genes Dev.* 22:1427–1438.

Morselli, E., M.C. Maiuri, M. Markaki, E. Megalou, A. Pasparaki, K. Palikaras, A. Criollo, L. Galluzzi, S.A. Malik, I. Vitale, M. Michaud, F. Madeo, N. Tavernarakis, et G. Kroemer. 2010a. Caloric restriction et resveratrol promote longevity through the Sirtuin-1-dependent induction of autophagy *Cell Death Dis.* 1:e10.

Morselli, E., M.C. Maiuri, M. Markaki, E. Megalou, A. Pasparaki, K. Palikaras, A. Criollo, L. Galluzzi, S.A. Malik, I. Vitale, M. Michaud, F. Madeo, N. Tavernarakis, et G. Kroemer. 2010b. The life span-prolonging effect of sirtuin-1 is mediated by autophagy *Autophagy.* 6:186–188.

Mortimore, G.E., K.H. Woodside, et J.E. Henry. 1972. Compartmentation of free valine et its relation to protein turnover in perfused rat liver *J Biol Chem.* 247:2776–2784.

Morvan, J., R. Köchl, R. Watson, L.M. Collinson, H.B.J. Jefferies, et S.A. Tooze. 2009. In vitro reconstitution of fusion between immature autophagosomes et endosomes *Autophagy.* 5:676–689.

Moscat, J., et M.T. Diaz-Meco. 2009. p62 at the crossroads of autophagy, apoptosis, et cancer *Cell.* 137:1001–1004.

Motyl, T., M. Gajewska, J. Zarzynska, A. Sobolewska, et B. Gajkowska. 2007. Regulation of autophagy in bovine mammary epithelial cells *Autophagy.* 3:484–486.

Mukaiyama, H., M. Nakase, T. Nakamura, Y. Kakinuma, and K. Takegawa. 2010. Autophagy in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *FEBS Lett.* 584:1327–1334.

Muller, F.L., M.S. Lustgarten, Y. Jang, A. Richardson, et H. Van Remmen. 2007. Trends in oxidative aging theories *Free Radic Biol Med.* 43:477–503.

Munafò, D.B., et M.I. Colombo. 2002. Induction of autophagy causes dramatic changes in the subcellular distribution of GFP-Rab24 *Traffic.* 3:472–482.

Munro, S., et H.R. Pelham. 1986. An Hsp70-like protein in the ER: identity with the 78 kd glucose-regulated protein et immunoglobulin heavy chain binding protein *Cell.* 46:291–300.

Nada, S., A. Hondo, A. Kasai, M. Koike, K. Saito, Y. Uchiyama, et M. Okada. 2009. The novel lipid raft adaptor p18 controls endosome dynamics by anchoring the MEK-ERK pathway to late endosomes *EMBO J.* 28:477–489.

Nair, U., Y. Cao, Z. Xie, et D.J. Klionsky. 2010. Roles of the lipid-binding motifs of Atg18 et Atg21 in the cytoplasm to vacuole targeting pathway et autophagy *J Biol Chem.* 285:11476–11488.

Nakamura, K., A.J. Kimple, D.P. Siderovski, et G.L. Johnson. 2010. PB1 domain interaction of p62/sequestosome 1 et MEK3 regulates NF-kappaB activation *J Biol Chem.* 285:2077–2089.

Nakaso, K., Y. Yoshimoto, T. Nakano, T. Takeshima, Y. Fukuhara, K. Yasui, S. Araga, T. Yanagawa, T. Ishii, et K. Nakashima. 2004. Transcriptional activation of p62/A170/ZIP during the formation of the aggregates: possible mechanisms et the role in Lewy body formation in Parkinson's disease *Brain Res.* 1012:42–51.

Nakatogawa, H., Y. Ichimura, et Y. Ohsumi. 2007. Atg8, a ubiquitin-like protein required for autophagosome formation, mediates membrane tethering et hemifusion *Cell.* 130:165–178.

Nakatogawa, H., K. Oh-oka, et Y. Ohsumi. 2008. Lipidation of Atg8: how is substrate specificity determined without a canonical E3 enzyme *Autophagy.* 4:911–913.

Nakatogawa, H., K. Suzuki, Y. Kamada, et Y. Ohsumi. 2009. Dynamics et diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10:458–467.

Nanahoshi, M., T. Nishiuma, Y. Tsujishita, K. Hara, S. Inui, N. Sakaguchi, et K. Yonezawa. 1998. Regulation of protein phosphatase 2A catalytic activity by alpha4 protein et its yeast homolog Tap42 *Biochem Biophys Res Commun.* 251:520–526.

Nandi, D., P. Tahiliani, A. Kumar, et D. Chandu. 2006. The ubiquitin-proteasome system. *J Biosci.* 31:137–155.

Nara, A., N. Mizushima, A. Yamamoto, Y. Kabeya, Y. Ohsumi, et T. Yoshimori. 2002. SKD1 AAA ATPase-Dependent Endosomal Transport is Involved in Autolysosome Formation. *Cell Structure et Function.* 27:29–37.

Narendra, D., A. Tanaka, D. Suen, et R. Youle. 2008. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria et promotes their autophagy. *J Cell Biol.* 183:795–803.

Narendra, D., A. Tanaka, D. Suen, et R.J. Youle. 2009. Parkin-induced mitophagy in the pathogenesis of Parkinson disease. *Autophagy.* 5:706–708.

Narendra, D., L.A. Kane, D.N. Hauser, I.M. Fearnley, et R.J. Youle. 2010a. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both *Autophagy.* 6:1090–1106.

Narendra, D.P., S.M. Jin, A. Tanaka, D. Suen, C.A. Gautier, J. Shen, M.R. Cookson, et R.J. Youle. 2010b. PINK1 Is Selectively Stabilized on Impaired Mitochondria to Activate Parkin. *PLoS Biol* 8:e1000298.

Nascimento-Ferreira, I., T. Santos-Ferreira, L. Sousa-Ferreira, G. Auregan, I. Onofre, S. Alves, N. Dufour, V.F. Colomer Gould, A. Koeppen, N. Déglon, et L. Pereira de Almeida. 2011. Overexpression of the autophagic beclin-1 protein clears mutant ataxin-3 et alleviates Machado-Joseph disease *Brain.* 134:1400–1415.

Nazarko, V.Y., T.Y. Nazarko, J. Farré, O.V. Stasyk, D. Warnecke, S. Ulaszewski, J.M. Cregg, A.A. Sibirny, et S. Subramani. 2011. Atg35, a micropexophagy-specific protein that regulates micropexophagic apparatus formation in *Pichia pastoris* *Autophagy.* 7:375–385.

Nedjic, J., M. Aichinger, J. Emmerich, N. Mizushima, et L. Klein. 2008. Autophagy in thymic epithelium shapes the T-cell repertoire et is essential for tolerance. *Nature.* 455:396–400.

Neely, K.M., K.N. Green, et F.M. Laferla. 2011. Presenilin Is Necessary for Efficient Proteolysis through the Autophagy-Lysosome System in a {gamma}-Secretase-Independent Manner *J Neurosci.* 31:2781–2791.

Neely, K.M., et K.N. Green. 2011. Presenilins mediate efficient proteolysis via the autophagosome-lysosome system *Autophagy.* 7.

- Neff, N.T., L. Bourret, P. Miao, et J.F. Dice. 1981. Degradation of proteins microinjected into IMR-90 human diploid fibroblasts *J Cell Biol.* 91:184–194.
- Neve, R.L., P. Harris, K.S. Kosik, D.M. Kurnit, et T.A. Donlon. 1986. Identification of cDNA clones for the human microtubule-associated protein tau et chromosomal localization of the genes for tau et microtubule-associated protein 2 *Brain Res.* 387:271–280.
- Nezis, I.P., A. Simonsen, A.P. Sagona, K. Finley, S. Gaumer, D. Contamine, T.E. Rusten, H. Stenmark, et A. Brech. 2008. Ref(2)P, the *Drosophila melanogaster* homologue of mammalian p62, is required for the formation of protein aggregates in adult brain *J Cell Biol.* 180:1065–1071.
- Ni, H., A. Bockus, A.L. Wozniak, K. Jones, S. Weinman, X. Yin, et W. Ding. 2011. Dissecting the dynamic turnover of GFP-LC3 in the autolysosome *Autophagy.* 7:188–204.
- Nicklin, P., P. Bergman, B. Zhang, E. Triantafellow, H. Wang, B. Nyfeler, H. Yang, M. Hild, C. Kung, C. Wilson, V.E. Myer, J.P. MacKeigan, J.A. Porter, Y.K. Wang, L.C. Cantley, P.M. Finan, et L.O. Murphy. 2009. Bidirectional transport of amino acids regulates mTOR et autophagy *Cell.* 136:521–534.
- Nijholt, D.A.T., T.R. de Graaf, E.S. van Haastert, A.O. Oliveira, C.R. Berkers, R. Zwart, H. Ovaas, F. Baas, J.J.M. Hoozemans, et W. Scheper. 2011. Endoplasmic reticulum stress activates autophagy but not the proteasome in neuronal cells: implications for Alzheimer's disease *Cell Death Differ.*
- Nishino, I., J. Fu, K. Tanji, T. Yamada, S. Shimojo, T. Koori, M. Mora, J.E. Riggs, S.J. Oh, Y. Koga, C.M. Sue, A. Yamamoto, N. Murakami, S. Shanske, E. Byrne, E. Bonilla, I. Nonaka, S. DiMauro, et M. Hirano. 2000. Primary LAMP-2 deficiency causes X-linked vacuolar cardiomyopathy et myopathy (Danon disease) *Nature.* 406:906–910.
- Nixon, R.A. 2006. Autophagy in neurodegenerative disease: friend, foe or turncoat *Trends Neurosci.* 29:528–535.
- Nixon, R.A. 2007. Autophagy, amyloidogenesis et Alzheimer disease *J Cell Sci.* 120:4081–4091.
- Nixon, R.A., A.M. Cataldo, et P.M. Mathews. 2000. The endosomal-lysosomal system of neurons in Alzheimer's disease pathogenesis: a review *Neurochem Res.* 25:1161–1172.
- Nixon, R.A., J. Wegiel, A. Kumar, W.H. Yu, C. Peterhoff, A. Cataldo, et A.M. Cuervo. 2005. Extensive involvement of autophagy in Alzheimer disease: an immuno-electron microscopy study *J Neuropathol Exp Neurol.* 64:113–122.
- Nixon, R.A., D. Yang, et J. Lee. 2008. Neurodegenerative lysosomal disorders: a continuum from development to late age *Autophagy.* 4:590–599.
- Nixon, R.A., et D. Yang. 2011. Autophagy failure in Alzheimer's disease-locating the primary defect *Neurobiol Dis.*
- Nobukuni, T., M. Joaquin, M. Rocco, S.G. Dann, S.Y. Kim, P. Gulati, M.P. Byfield, J.M. Backer, F. Natt, J.L. Bos, F.J.T. Zwartkruis, et G. Thomas. 2005. Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase *Proc Natl Acad Sci USA.* 102:14238–14243.
- Noda, N.N., H. Kumeta, H. Nakatogawa, K. Satoo, W. Adachi, J. Ishii, Y. Fujioka, Y. Ohsumi, et F. Inagaki. 2008a. Structural basis of target recognition by Atg8/LC3 during selective autophagy *Genes Cells.* 13:1211–1218.
- Noda, N.N., Y. Ohsumi, et F. Inagaki. 2010. Atg8-family interacting motif crucial for selective autophagy *FEBS Lett.* 584:1379–1385.
- Noda, T., J. Kim, W.P. Huang, M. Baba, C. Tokunaga, Y. Ohsumi, et D.J. Klionsky. 2000. Apg9p/Cvt7p is an integral membrane protein required for transport vesicle formation in the Cvt et autophagy pathways *J Cell Biol.* 148:465–480.
- Noda, T., K. Suzuki, et Y. Ohsumi. 2002. Yeast autophagosomes: de novo formation of a membrane structure *Trends Cell Biol.* 12:231–235.
- Noda, T., N. Fujita, et T. Yoshimori. 2008b. The Ubi brothers reunited *Autophagy.* 4:540–541.
- Noda, T., K. Matsunaga, et T. Yoshimori. 2011. Atg14L recruits PtdIns 3-kinase to the ER for autophagosome formation *Autophagy.* 7.
- Noda, T., et Y. Ohsumi. 1998. Tor, a phosphatidylinositol kinase homologue, controls autophagy in yeast *J Biol Chem.* 273:3963–3966.
- Norman, J.M., G.M. Cohen, et E.T.W. Bampton. 2010. The in vitro cleavage of the hAtg proteins by cell death proteases *Autophagy.* 6:1042–1056.
- Nunbhakdi-Craig, V., S. Schuechner, J. Sontag, L. Montgomery, D.C. Pallas, C. Juno, I. Mudrak, E. Ogris, et E. Sontag. 2007. Expression of protein phosphatase 2A mutants et silencing of the regulatory B alpha subunit induce a selective loss of acetylated et detyrosinated microtubules *J Neurochem.* 101:959–971.
- O'Prey, J., J. Skommer, S. Wilkinson, et K.M. Ryan. 2009. Analysis of DRAM-related proteins reveals evolutionarily conserved et divergent roles in the control of autophagy *Cell Cycle.* 8:2260–2265.
- Obara, K., T. Sekito, K. Niimi, et Y. Ohsumi. 2008. The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate et exerts an essential function *J Biol Chem.* 283:23972–23980.
- Ogata, M., S. Hino, A. Saito, K. Morikawa, S. Kondo, S. Kanemoto, T. Murakami, M. Taniguchi, I. Tanii, K. Yoshinaga, S. Shiosaka, J.A. Hammarback, F. Urano, et K. Imaizumi. 2006. Autophagy is activated for cell survival after endoplasmic reticulum stress *Mol Cell Biol.* 26:9220–9231.

Ogier-Denis, E., A. Couvineau, J.J. Maoret, J.J. Hourri, C. Bauvy, D. De Stefanis, C. Isidoro, M. Laburthe, et P. Codogno. 1995. A heterotrimeric Gi3-protein controls autophagic sequestration in the human colon cancer cell line HT-29 *J Biol Chem.* 270:13–16.

Ogier-Denis, E., S. Pattingre, J. El Benna, et P. Codogno. 2000. Erk1/2-dependent phosphorylation of Galpha-interacting protein stimulates its GTPase accelerating activity et autophagy in human colon cancer cells *J Biol Chem.* 275:39090–39095.

Ogier-Denis, E., et P. Codogno. 2003. Autophagy: a barrier or an adaptive response to cancer *Biochim Biophys Acta.* 1603:113–128.

Ogura, K., M. Shirakawa, T.M. Barnes, S. Hekimi, et Y. Ohshima. 1997. The UNC-14 protein required for axonal elongation et guidance in *Caenorhabditis elegans* interacts with the serine/threonine kinase UNC-51. *Genes Dev.* 11:1801–1811.

Ogura, K., T. Okada, S. Mitani, K. Gengyo-Ando, D.L. Baillie, Y. Kohara, et Y. Goshima. 2010. Protein phosphatase 2A cooperates with the autophagy-related kinase UNC-51 to regulate axon guidance in *Caenorhabditis elegans* *Development.* 137:1657–1667.

Ogura, K., et Y. Goshima. 2006. The autophagy-related kinase UNC-51 et its binding partner UNC-14 regulate the subcellular localization of the Netrin receptor UNC-5 in *Caenorhabditis elegans* *Development.* 133:3441–3450.

Ohsumi, Y., et N. Mizushima. 2004. Two ubiquitin-like conjugation systems essential for autophagy. *Semin Cell Dev Biol.* 15:231–236.

Ohta, K., A. Mizuno, M. Ueda, S. Li, Y. Suzuki, Y. Hida, Y. Hayakawa-Yano, M. Itoh, E. Ohta, M. Kobori, et T. Nakagawa. 2010. Autophagy impairment stimulates PS1 expression et gamma-secretase activity *Autophagy.* 6:345–352.

Okamoto, K., S. Hirai, T. Iizuka, T. Yanagisawa, et M. Watanabe. 1991. Reexamination of granulovacuolar degeneration *Acta Neuropathol.* 82:340–345.

Okazaki, N., J. Yan, S. Yuasa, T. Ueno, E. Kominami, Y. Masuho, H. Koga, et M. Muramatsu. 2000. Interaction of the Unc-51-like kinase et microtubule-associated protein light chain 3 related proteins in the brain: possible role of vesicular transport in axonal elongation *Brain Res Mol Brain Res.* 85:1–12.

Ono, K., M.M. Condrón, L. Ho, J. Wang, W. Zhao, G.M. Pasinetti, et D.B. Teplow. 2008. Effects of grape seed-derived polyphenols on amyloid beta-protein self-assembly et cytotoxicity *J Biol Chem.* 283:32176–32187.

Overly, C.C., K.D. Lee, E. Berthiaume, et P.J. Hollenbeck. 1995. Quantitative measurement of intraorganelle pH in the endosomal-lysosomal pathway in neurons by using ratiometric imaging with pyranine *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:3156–3160.

Overly, C.C., et P.J. Hollenbeck. 1996. Dynamic organization of endocytic pathways in axons of cultured sympathetic neurons *J Neurosci.* 16:6056–6064.

Pacheco, C.D., R. Kunkel, et A.P. Lieberman. 2007. Autophagy in Niemann-Pick C disease is dependent upon Beclin-1 et responsive to lipid trafficking defects *Hum Mol Genet.* 16:1495–1503.

Pacheco, C.D., et A.P. Lieberman. 2007. Lipid trafficking defects increase Beclin-1 et activate autophagy in Niemann-Pick type C disease *Autophagy.* 3:487–489.

Pacheco, C.D., et A.P. Lieberman. 2008. The pathogenesis of Niemann-Pick type C disease: a role for autophagy *Expert Rev Mol Med.* 10:e26.

Panaretou, C., J. Domin, S. Cockcroft, et M.D. Waterfield. 1997. Characterization of p150, an adaptor protein for the human phosphatidylinositol (PtdIns) 3-kinase. Substrate presentation by phosphatidylinositol transfer protein to the p150.Ptdins 3-kinase complex *J Biol Chem.* 272:2477–2485.

Pandey, U.B., Y. Batlevi, E.H. Baehrecke, et J.P. Taylor. 2007a. HDAC6 at the intersection of autophagy, the ubiquitin-proteasome system et neurodegeneration. *Autophagy.* 3:643–645.

Pandey, U.B., Z. Nie, Y. Batlevi, B.A. McCray, G.P. Ritson, N.B. Nedelsky, S.L. Schwartz, N.A. DiProspero, M.A. Knight, O. Schuldiner, R. Padmanabhan, M. Hild, D.L. Berry, D. Garza, C.C. Hubbert, T. Yao, E.H. Baehrecke, et J.P. Taylor. 2007b. HDAC6 rescues neurodegeneration et provides an essential link between autophagy et the UPS. *Nature.* 447:859–863.

Pankiv, S., T.H. Clausen, T. Lamark, A. Brech, J. Bruun, H. Outzen, A. Overvatn, G. Bjørkøy, et T. Johansen. 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy *J Biol Chem.* 282:24131–24145.

Pankiv, S., E.A. Alemu, A. Brech, J. Bruun, T. Lamark, A. Overvatn, G. Bjørkøy, et T. Johansen. 2010a. FYCO1 is a Rab7 effector that binds to LC3 et PI3P to mediate microtubule plus end-directed vesicle transport *J Cell Biol.* 188:253–269.

Pankiv, S., T. Lamark, J. Bruun, A. Overvatn, G. Bjørkøy, et T. Johansen. 2010b. Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 et its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies *J Biol Chem.* 285:5941–5953.

Pankiv, S., et T. Johansen. 2010. FYCO1: Linking autophagosomes to microtubule plus end-directing molecular motors *Autophagy.* 6.

Pappolla, M.A., T.K. Bryant-Thomas, D. Herbert, J. Pacheco, M. Fabra Garcia, M. Manjon, X. Girones, T.L. Henry, E. Matsubara, D. Zambon, B. Wolozin, M. Sano, F.F. Cruz-Sanchez, L.J. Thal, S.S. Petanceska, et L.M. Refolo. 2003. Mild hypercholesterolemia is an early risk factor for the development of Alzheimer amyloid pathology *Neurology*. 61:199–205.

Park, I., J. Chung, C.T. Walsh, Y. Yun, J.L. Strominger, et J. Shin. 1995. Phosphotyrosine-independent binding of a 62-kDa protein to the src homology 2 (SH2) domain of p56lck et its regulation by phosphorylation of Ser-59 in the lck unique N-terminal region *Proc Natl Acad Sci USA*. 92:12338–12342.

Park, I., C.E. Yeum, G.T. Chae, et S. Lee. 2008. Effect of Rifampicin to Inhibit Rapamycin-Induced Autophagy via the Suppression of Protein Phosphatase 2A Activity. *Immunopharmacol Immunotoxicol*. 30:837–849.

Parton, R.G., K. Simons, et C.G. Dotti. 1992. Axonal et dendritic endocytic pathways in cultured neurons *J Cell Biol*. 119:123–137.

Pattingre, S., C. Bauvy, et P. Codogno. 2003. Amino acids interfere with the ERK1/2-dependent control of macroautophagy by controlling the activation of Raf-1 in human colon cancer HT-29 cells *J Biol Chem*. 278:16667–16674.

Pattingre, S., A. Tassa, X. Qu, R. Garuti, X.H. Liang, N. Mizushima, M. Packer, M.D. Schneider, et B. Levine. 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy *Cell*. 122:927–939.

Pattingre, S., L. Espert, M. Biard-Piechaczyk, et P. Codogno. 2008. Regulation of macroautophagy by mTOR et Beclin 1 complexes *Biochimie*. 90:313–323.

a. Role of JNK1-dependent Bcl-2 phosphorylation in ceramide-induced macroautophagy *J Biol Chem*. 284:2719–2728.

Pattingre, S., C. Bauvy, T. Levade, B. Levine, et P. Codogno. 2009b. Ceramide-induced autophagy: to junk or to protect cells *Autophagy*. 5:558–560.

Peralta, E.R., et A.L. Edinger. 2009. Ceramide-induced starvation triggers homeostatic autophagy *Autophagy*. 5:407–409.

Perez, M., I. Santa-Maria, E. Gomez de Barreda, X. Zhu, R. Cuadros, J.R. Cabrero, F. Sanchez-Madrid, H.N. Dawson, M.P. Vitek, G. Perry, M.A. Smith, et J. Avila. 2009. Tau—an inhibitor of deacetylase HDAC6 function *J Neurochem*. 109:1756–1766.

Perrotti, D., et P. Neviani. 2008. Protein phosphatase 2A (PP2A), a drugable tumor suppressor in Ph1(+) leukemias *Cancer Metastasis Rev* 27:159–168.

Petersen, A., K. Larsen, G. Behr, N. Romero, S. Przedborski, P. Brundin, et D. Sulzer. 2001. Expanded CAG repeats in exon 1 of the Huntington's disease gene stimulate dopamine-mediated striatal neuron autophagy et degeneration. *Hum Mol Genet*. 10:1243–1254.

Peterson, R.T., B.N. Desai, J.S. Hardwick, et S.L. Schreiber. 1999. Protein phosphatase 2A interacts with the 70-kDa S6 kinase et is activated by inhibition of FKBP12-rapamycin-associated protein *Proc Natl Acad Sci USA*. 96:4438–4442.

Peterson, T.R., M. Laplante, C.C. Thoreen, Y. Sancak, S.A. Kang, W.M. Kuehl, N.S. Gray, et D.M. Sabatini. 2009. DEPTOR is an mTOR inhibitor frequently overexpressed in multiple myeloma cells et required for their survival *Cell*. 137:873–886.

Pickford, F., E. Masliah, M. Britschgi, K. Lucin, R. Narasimhan, P.A. Jaeger, S. Small, B. Spencer, E. Rockenstein, B. Levine, et T. Wyss-Coray. 2008. The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease et regulates amyloid beta accumulation in mice *J Clin Invest*. 118:2190–2199.

Pierce, A., R. Wei, D. Halade, S. Yoo, Q. Ran, et A. Richardson. 2010. A Novel mouse model of enhanced proteostasis: Full-length human heat shock factor 1 transgenic mice. *Biochem Biophys Res Commun*. 402:59–65.

Pohl, C. 2009. Dual control of cytokinesis by the ubiquitin et autophagy pathways *Autophagy*. 5:561–562.

Polson, H.E.J., J. de Lartigue, D.J. Rigden, M. Reedijk, S. Urbé, M.J. Clague, et S.A. Tooze. 2010. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores et positively regulates LC3 lipidation *Autophagy*. 6.

Ponpuak, M., A.S. Davis, E.A. Roberts, M.A. Delgado, C. Dinkins, Z. Zhao, H.W. Virgin, G.B. Kyei, T. Johansen, I. Vergne, et V. Deretic. 2010. Delivery of cytosolic components by autophagic adaptor protein p62 endows autophagosomes with unique antimicrobial properties *Immunity*. 32:329–341.

Ponpuak, M., et V. Deretic. 2011. Autophagy et p62/sequestosome 1 generate neo-antimicrobial peptides (cryptides) from cytosolic proteins *Autophagy*. 7:336–337.

Poole, A.C., R.E. Thomas, S. Yu, E.S. Vincow, et L. Pallanck. 2010. The mitochondrial fusion-promoting factor mitofusin is a substrate of the PINK1/parkin pathway *PLoS ONE*. 5:e10054.

Prick, T., M. Thumm, K. Köhrer, D. Häussinger, et S. Vom Dahl. 2006. In yeast, loss of Hog1 leads to osmosensitivity of autophagy *Biochem J*. 394:153–161.

Prickett, T.D., et D.L. Brautigan. 2006. The alpha4 regulatory subunit exerts opposing allosteric effects on protein phosphatases PP6 et PP2A. *J Biol Chem*. 281:30503–30511.

Proikas-Cezanne, T., S. Waddell, A. Gaugel, T. Frickey, A. Lupas, et A. Nordheim. 2004. WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer et is linked to starvation-induced autophagy *Oncogene*. 23:9314–9325.

Proikas-Cezanne, T., S. Ruckerbauer, Y-D. Stierhof, C. Berg et A. Nordheim. 2007. Human WIPI-1 puncta-formation: a novel assay to assess mammalian autophagy. *FEBS Lett*. 581:3396–3404.

Pua, H.H., I. Dzhagalov, M. Chuck, N. Mizushima, et Y. He. 2007. A critical role for the autophagy gene Atg5 in T cell survival et proliferation *J. Exp. Med* 204:25–31.

Pua, H.H., et Y. He. 2007. Maintaining T lymphocyte homeostasis: another duty of autophagy *Autophagy*. 3:266–267.

Puissant, A., G. Robert, N. Fenouille, F. Luciano, J. Cassuto, S. Raynaud, et P. Auberger. 2010. Resveratrol promotes autophagic cell death in chronic myelogenous leukemia cells via JNK-mediated p62/SQSTM1 expression et AMPK activation *Cancer Res*. 70:1042–1052.

Puls, A., S. Schmidt, F. Grawe, et S. Stabel. 1997. Interaction of protein kinase C zeta with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein *Proc Natl Acad Sci USA*. 94:6191–6196.

Pyo, J., M. Jang, Y. Kwon, H. Lee, J. Jun, H. Woo, D. Cho, B. Choi, H. Lee, J. Kim, N. Mizushima, Y. Oshumi, et Y. Jung. 2005. Essential roles of Atg5 et FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation et cell death. *J Biol Chem*. 280:20722–20729.

Qin, L., Z. Wang, L. Tao, et Y. Wang. 2010. ER stress negatively regulates AKT/TSC/mTOR pathway to enhance autophagy *Autophagy*. 6:239–247.

Qiu, C., W. Xu, et L. Fratiglioni. 2010. Vascular et psychosocial factors in Alzheimer's disease: epidemiological evidence toward intervention *J Alzheimers Dis*. 20:689–697.

Qu, X., J. Yu, G. Bhagat, N. Furuya, H. Hibshoosh, A. Troxel, J. Rosen, E. Eskelinen, N. Mizushima, Y. Ohsumi, G. Cattoretti, et B. Levine. 2003. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene *J Clin Invest*. 112:1809–1820.

Qu, X., Z. Zou, Q. Sun, K. Luby-Phelps, P. Cheng, R.N. Hogan, C. Gilpin, et B. Levine. 2007. Autophagy gene-dependent clearance of apoptotic cells during embryonic development *Cell*. 128:931–946.

Raatikainen, O., R.A. Kauppinen, H. Komulainen, H. Taipale, T. Pirttilä, et J. Tuomisto. 1991. Polyene antibiotics increase the ionic permeability of synaptosomal plasma membranes *Biochem Pharmacol*. 41:1345–1350.

Radoshevich, L., L. Murrow, N. Chen, E. Fernandez, S. Roy, C. Fung, et J. Debnath. 2010. ATG12 conjugation to ATG3 regulates mitochondrial homeostasis et cell death *Cell*. 142:590–600.

Radoshevich, L., et J. Debnath. 2011. ATG12-ATG3 et mitochondria *Autophagy*. 7:109–111.

Rajan, R.S., M.E. Illing, N.F. Bence, et R.R. Kopito. 2001. Specificity in intracellular protein aggregation et inclusion body formation *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:13060–13065.

Ramesh Babu, J., M. Lamar Seibenhener, J. Peng, A. Strom, R. Kempainen, N. Cox, H. Zhu, M.C. Wooten, M.T. Diaz-Meco, J. Moscat, et M.W. Wooten. 2008. Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau et neurodegeneration *J Neurochem*. 106:107–120.

Ramesh, B.N., T.S.S. Rao, A. Prakasam, K. Sambamurti, et K.S.J. Rao. 2010. Neuronutrition et Alzheimer's disease *J Alzheimers Dis*. 19:1123–1139.

Rametti, A., F. Esclaire, C. Yardin, et F. Terro. 2004. Linking alterations in tau phosphorylation et cleavage during neuronal apoptosis *J Biol Chem*. 279:54518–54528.

Rametti, A., F. Esclaire, C. Yardin, N. Cogné, et F. Terro. 2008. Lithium down-regulates tau in cultured cortical neurons: a possible mechanism of neuroprotection *Neurosci Lett*. 434:93–98.

Rami, A. 2009. Review: autophagy in neurodegeneration: firefighter et/or incendiary *Neuropathology et applied neurobiology*. 35:449–461.

Ramos, P.C., et R.J. Dohmen. 2008. PACemakers of proteasome core particle assembly. *Structure*. 16:1296–1304.

Ramsden, M., L. Kotilinek, C. Forster, J. Paulson, E. McGowan, K. SantaCruz, A. Guimaraes, M. Yue, J. Lewis, G. Carlson, M. Hutton, et K.H. Ashe. 2005. Age-dependent neurofibrillary tangle formation, neuron loss, et memory impairment in a mouse model of human tauopathy (P301L). *J Neurosci*. 25:10637–10647.

Rao, R.V., K.S. Poksay, S. Castro-Obregon, B. Schilling, R.H. Row, G. del Rio, B.W. Gibson, H.M. Ellerby, et D.E. Bredesen. 2004. Molecular components of a cell death pathway activated by endoplasmic reticulum stress *J Biol Chem*. 279:177–187.

Raveh, T., et A. Kimchi. 2001. DAP kinase-a proapoptotic gene that functions as a tumor suppressor *Exp Cell Res*. 264:185–192.

Ravikumar, B., R. Duden, et D. Rubinsztein. 2002. Aggregate-prone proteins with polyglutamine et polyalanine expansions are degraded by autophagy. *Hum Mol Genet*. 11:1107–1117.

Ravikumar, B., C. Vacher, Z. Berger, J.E. Davies, S. Luo, L.G. Oroz, F. Scaravilli, D.F. Easton, R. Duden, C.J. O'Kane, et D.C. Rubinsztein. 2004. Inhibition of mTOR induces autophagy et reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly et mouse models of Huntington disease *Nat Genet*. 36:585–595.

- Ravikumar, B., A. Acevedo-Arozena, S. Imarisio, Z. Berger, C. Vacher, C.J. O'Kane, S.D.M. Brown, et D.C. Rubinsztein. 2005. Dynein mutations impair autophagic clearance of aggregate-prone proteins *Nat Genet.* 37:771–776.
- Ravikumar, B., Z. Berger, C. Vacher, C.J. O'Kane, et D.C. Rubinsztein. 2006. Rapamycin pre-treatment protects against apoptosis *Hum Mol Genet.* 15:1209–1216.
- Ravikumar, B., K. Moreau, L. Jahreiss, C. Puri, et D.C. Rubinsztein. 2010a. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures *Nat Cell Biol.* 12:747–757.
- Ravikumar, B., K. Moreau, et D.C. Rubinsztein. 2010b. Plasma membrane helps autophagosomes grow. *Autophagy.* 6:1184–1186.
- Razi, M., E.Y.W. Chan, et S.A. Tooze. 2009. Early endosomes et endosomal coatomer are required for autophagy *J Cell Biol.* 185:305–321.
- Rechsteiner, M., et C.P. Hill. 2005. Mobilizing the proteolytic machine: cell biological roles of proteasome activators et inhibitors *Trends Cell Biol.* 15:27–33.
- Reggiori, F. 2006. 1. Membrane origin for autophagy *Curr. Top. Dev. Biol* 74:1–30.
- Reggiori, F., K.A. Tucker, P.E. Stromhaug, et D.J. Klionsky. 2004. The Atg1-Atg13 complex regulates Atg9 et Atg23 retrieval transport from the pre-autophagosomal structure *Dev Cell.* 6:79–90.
- Reggiori, F., T. Shintani, U. Nair, et D.J. Klionsky. 2005a. Atg9 cycles between mitochondria et the pre-autophagosomal structure in yeasts *Autophagy.* 1:101–109.
- Reggiori, F., I. Monastyrska, T. Shintani, et D.J. Klionsky. 2005b. The actin cytoskeleton is required for selective types of autophagy, but not nonspecific autophagy, in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* *Mol Biol Cell.* 16:5843–5856.
- Reggiori, F., et D.J. Klionsky. 2005. Autophagosomes: biogenesis from scratch *Curr Opin Cell Biol.* 17:415–422.
- Reiling, J.H., et E. Hafen. 2004. The hypoxia-induced paralogs Scylla et Charybdis inhibit growth by down-regulating S6K activity upstream of TSC in *Drosophila* *Genes Dev.* 18:2879–2892.
- Reitz, C., S. Tokuyoshi, L.N. Clark, C. Conrad, J. Vonsattel, L. Hazrati, A. Palotás, R. Lantigua, M. Medrano, I. Z Jiménez-Velázquez, B. Vardarajan, I. Simkin, J.L. Haines, M.A. Pericak-Vance, L.A. Farrer, J.H. Lee, E. Rogaeva, P.S. George-Hyslop, et R. Mayeux. 2011. SORCS1 alters amyloid precursor protein processing et variants may increase Alzheimer's disease risk *Ann Neurol.* 69:47–64.
- Renaud, S., and M. de Lorgeril. 1992. Wine, alcohol, platelets, and the French paradox for coronary heart disease *Lancet.* 339:1523–1526.
- Renna, M., C. Schaffner, A.R. Winslow, F.M. Menzies, A.A. Peden, R.A. Floto, et D.C. Rubinsztein. 2011. Autophagic substrate clearance requires activity of the syntaxin-5 SNARE complex *J Cell Sci.* 124:469–482.
- Rideout, H., I. Lang-Rollin, et L. Stefanis. 2004. Involvement of macroautophagy in the dissolution of neuronal inclusions. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:2551–2562.
- Riley, B.E., S.E. Kaiser, T.A. Shaler, A.C.Y. Ng, T. Hara, M.S. Hipp, K. Lage, R.J. Xavier, K. Ryu, K. Taguchi, M. Yamamoto, K. Tanaka, N. Mizushima, M. Komatsu, et R.R. Kopito. 2010. Ubiquitin accumulation in autophagy-deficient mice is dependent on the Nrf2-mediated stress response pathway: a potential role for protein aggregation in autophagic substrate selection. *J Cell Biol.* 191:537–552.
- Roach, P.J. 2011. AMPK -> ULK1 -> Autophagy *Mol Cell Biol.* 31:3082–3084.
- Rodriguez, A., A. Duran, M. Selloum, M. Champy, F.J. Diez-Guerra, J.M. Flores, M. Serrano, J. Auwerx, M.T. Diaz-Meco, et J. Moscat. 2006. Mature-onset obesity et insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62 *Cell Metab.* 3:211–222.
- Rodriguez-Enriquez, S., I. Kim, R.T. Currin, et J.J. Lemasters. 2006. Tracker dyes to probe mitochondrial autophagy (mitophagy) in rat hepatocytes *Autophagy.* 2:39–46.
- Rogaeva, E., Y. Meng, J.H. Lee, Y. Gu, T. Kawarai, F. Zou, T. Katayama, C.T. Baldwin, R. Cheng, H. Hasegawa, F. Chen, N. Shibata, K.L. Lunetta, R. Pardossi-Piquard, C. Bohm, Y. Wakutani, L.A. Cupples, K.T. Cuenco, R.C. Green, L. Pinessi, I. Rainero, S. Sorbi, A. Bruni, R. Duara, R.P. Friedland, R. Inzelberg, W. Hampe, H. Bujo, Y. Song, O.M. Andersen, T.E. Willnow, N. Graff-Radford, R.C. Petersen, D. Dickson, S.D. Der, P.E. Fraser, G. Schmitt-Ulms, S. Younkin, R. Mayeux, L.A. Farrer, et P. St George-Hyslop. 2007. The neuronal sortilin-related receptor SORL1 is genetically associated with Alzheimer disease *Nat Genet.* 39:168–177.
- Rogers, P.D., R.E. Kramer, S.W. Chapman, et J.D. Cleary. 1999. Amphotericin B-induced interleukin-1beta expression in human monocytic cells is calcium et calmodulin dependent *J. Infect. Dis* 180:1259–1266.
- Rogina, B., et S.L. Helfand. 2004. Sir2 mediates longevity in the fly through a pathway related to calorie restriction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101:15998–16003.
- Rohde, J.R., R. Bastidas, R. Puria, et M.E. Cardenas. 2008. Nutritional control via Tor signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol.* 11:153–160.
- Rondeau, V., H. Jacqmin-Gadda, D. Commenges, et J.F. Dartigues. 2001. Re: aluminum in drinking water et cognitive decline in elderly subjects: the Paquid cohort *Am. J. Epidemiol* 154:288–290.
- Rondeau, V., A. Iron, L. Letenneur, D. Commenges, et J.F. Dartigues. 2006. Analysis of the effect of aluminum in drinking water et transferrin C2 allele on Alzheimer's disease *Eur. J. Neurol* 13:1022–1025.

- Rondeau, V., H. Jacqmin-Gadda, D. Commenges, C. Helmer, et J.F. Dartigues. 2009. Aluminum et silica in drinking water et the risk of Alzheimer's disease or cognitive decline: findings from 15-year follow-up of the PAQUID cohort *Am. J. Epidemiol* 169:489–496.
- Rosenbluth, J.M., D.J. Mays, M.F. Pino, L.J. Tang, et J.A. Pietsenpol. 2008. A gene signature-based approach identifies mTOR as a regulator of p73 *Mol Cell Biol*. 28:5951–5964.
- Rosenbluth, J.M., et J.A. Pietsenpol. 2009. mTOR regulates autophagy-associated genes downstream of p73 *Autophagy*. 5:114–116.
- Ross, C.A., et M.A. Poirier. 2004. Protein aggregation et neurodegenerative disease. *Nat Med*. 10 Suppl:S10–7.
- Rubinsztein, D.C. 2007. Autophagy induction rescues toxicity mediated by proteasome inhibition. *Neuron*. 54:854–856.
- Rubinsztein, D.C. 2010. Cdks regulate autophagy via Vps34. *Mol Cell*. 38:483–484.
- Rubinsztein, D.C., M. Difiglia, N. Heintz, R.A. Nixon, Z. Qin, B. Ravikumar, L. Stefanis, et A. Tolksy. 2005a. Autophagy et its possible roles in nervous system diseases, damage et repair *Autophagy*. 1:11–22.
- Rubinsztein, D.C., B. Ravikumar, A. Acevedo-Arozena, S. Imarisio, C.J. O'Kane, et S.D.M. Brown. 2005b. Dyneins, autophagy, aggregation et neurodegeneration *Autophagy*. 1:177–178.
- Rubinsztein, D.C., et R.A. Nixon. 2010. Rapamycin induces autophagic flux in neurons *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:E181; author reply E182.
- Ruediger, R., D. Roeckel, J. Fait, A. Bergqvist, G. Magnusson, et G. Walter. 1992. Identification of binding sites on the regulatory A subunit of protein phosphatase 2A for the catalytic C subunit et for tumor antigens of simian virus 40 et polyomavirus *Mol Cell Biol*. 12:4872–4882.
- Ruediger, R., K. Fields, et G., Walter. 1999. Binding specificity of protein phosphatase 2A core enzyme for regulatory B subunits et T antigens *J Virol*. 73:839–842.
- Rusten, T.E., K. Lindmo, G. Juhász, M. Sass, P.O. Seglen, A. Brech, et H. Stenmark. 2004. Programmed autophagy in the Drosophila fat body is induced by ecdysone through regulation of the PI3K pathway *Dev Cell*. 7:179–192.
- Rusten, T.E., M. Filimonenko, L.M. Rodahl, H. Stenmark, et A. Simonsen. 2007. ESCRTing autophagic clearance of aggregating proteins *Autophagy*. 4.
- Rusten, T.E., et A. Simonsen. 2008. ESCRT functions in autophagy et associated disease *Cell Cycle*. 7:1166–1172.
- Ryoo, S., H.K. Jeong, C. Radnaabazar, J. Yoo, H. Cho, H. Lee, I. Kim, Y. Cheon, Y.S. Ahn, S. Chung, et W. Song. 2007. DYRK1A-mediated hyperphosphorylation of Tau. A functional link between Down syndrome et Alzheimer disease *J Biol Chem*. 282:34850–34857.
- Saftig, P., Y. Tanaka, R. Lüllmann-Rauch, et K. von Figura. 2001. Disease model: LAMP-2 enlightens Danon disease *Trends Mol Med*. 7:37–39.
- Saftig, P., W. Beertsen, et E. Eskelinen. 2008. LAMP-2: a control step for phagosome et autophagosome maturation *Autophagy*. 4:510–512.
- Saftig, P., et J. Klumperman. 2009. Lysosome biogenesis et lysosomal membrane proteins: trafficking meets function *Nat Rev Mol Cell Biol*. 10:623–635.
- Sagiv, Y., A. Legesse-Miller, A. Porat, et Z. Elazar. 2000. GATE-16, a membrane transport modulator, interacts with NSF et the Golgi v-SNARE GOS-28 *EMBO J*. 19:1494–1504.
- Sahu, R., S. Kaushik, C.C. Clement, E.S. Cannizzo, B. Scharf, A. Follenzi, I. Potolicchio, E. Nieves, A.M. Cuervo, et L. Santambrogio. 2011. Microautophagy of cytosolic proteins by late endosomes *Dev Cell*. 20:131–139.
- Saitoh, T., N. Fujita, M.H. Jang, S. Uematsu, B. Yang, T. Satoh, H. Omori, T. Noda, N. Yamamoto, M. Komatsu, K. Tanaka, T. Kawai, T. Tsujimura, O. Takeuchi, T. Yoshimori, et S. Akira. 2008a. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production. *Nature*. 456:264–268.
- Saitoh, T., N. Fujita, M.H. Jang, S. Uematsu, B. Yang, T. Satoh, H. Omori, T. Noda, N. Yamamoto, M. Komatsu, K. Tanaka, T. Kawai, T. Tsujimura, O. Takeuchi, T. Yoshimori, et S. Akira. 2008b. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1 β production *Nature*. 456:264–268.
- Salminen, A., J. Ojala, T. Suuronen, K. Kaarniranta, et A. Kauppinen. 2008. Amyloid-beta oligomers set fire to inflammasomes et induce Alzheimer's pathology *J Cell Mol Med*. 12:2255–2262.
- Salminen, A., et K. Kaarniranta. 2009. SIRT1: regulation of longevity via autophagy *Cell Signal*. 21:1356–1360.
- Salmon, A.B., A. Richardson, et V.I. Pérez. 2010. Update on the oxidative stress theory of aging: does oxidative stress play a role in aging or healthy aging *Free Radic Biol Med*. 48:642–655.
- Samari, H.R., M.T.N. Møller, L. Holden, T. Asmyhr, et P.O. Seglen. 2005. Stimulation of hepatocytic AMP-activated protein kinase by okadaic acid et other autophagy-suppressive toxins *Biochem J*. 386:237–244.
- Samari, H.R., et P.O. Seglen. 1998. Inhibition of hepatocytic autophagy by adenosine, aminoimidazole-4-carboxamide riboside, et N6-mercaptopurine riboside. Evidence for involvement of amp-activated protein kinase *J Biol Chem*. 273:23758–23763.
- Sancak, Y., C.C. Thoreen, T.R. Peterson, R.A. Lindquist, S.A. Kang, E. Spooner, S.A. Carr, et D.M. Sabatini. 2007. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase *Mol Cell*. 25:903–915.

- Sancak, Y., T.R. Peterson, Y.D. Shaul, R.A. Lindquist, C.C. Thoreen, L. Bar-Peled, et D.M. Sabatini. 2008. The Rag GTPases bind raptor et mediate amino acid signaling to mTORC1 *Science*. 320:1496–1501.
- Sancak, Y., L. Bar-Peled, R. Zoncu, A.L. Markhard, S. Nada, et D.M. Sabatini. 2010. Ragulator-Rag complex targets mTORC1 to the lysosomal surface et is necessary for its activation by amino acids *Cell*. 141:290–303.
- Sancak, Y., et D.M. Sabatini. 2009. Rag proteins regulate amino-acid-induced mTORC1 signalling *Biochem. Soc. Trans* 37:289–290.
- Santambrogio, L., et A.M. Cuervo. 2011. Chasing the elusive mammalian microautophagy *Autophagy*. 7.
- Sarbassov, D.D., D.A. Guertin, S.M. Ali, et D.M. Sabatini. 2005a. Phosphorylation et regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex *Science*. 307:1098–1101.
- Sarbassov, D.D., S.M. Ali, et D.M. Sabatini. 2005b. Growing roles for the mTOR pathway *Curr Opin Cell Biol*. 17:596–603.
- Sarbassov, D.D., S.M. Ali, S. Sengupta, J. Sheen, P.P. Hsu, A.F. Bagley, A.L. Markhard, et D.M. Sabatini. 2006. Prolonged rapamycin treatment inhibits mTORC2 assembly et Akt/PKB *Mol Cell*. 22:159–168.
- Sarkar, S., R.A. Floto, Z. Berger, S. Imarisio, A. Cordenier, M. Pasco, L.J. Cook, et D.C. Rubinsztein. 2005. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase *J Cell Biol*. 170:1101–1111.
- Sarkar, S., E.O. Perlstein, S. Imarisio, S. Pineau, A. Cordenier, R.L. Maglathlin, J.A. Webster, T.A. Lewis, C.J. O'Kane, S.L. Schreiber, et D.C. Rubinsztein. 2007. Small molecules enhance autophagy et reduce toxicity in Huntington's disease models *Nat Chem Biol*. 3:331–338.
- Sarkar, S., G. Krishna, S. Imarisio, S. Saiki, C.J. O'Kane, et D.C. Rubinsztein. 2008. A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium et rapamycin *Hum Mol Genet*. 17:170–178.
- Sarkar, S., et D.C. Rubinsztein. 2006. Inositol et IP3 levels regulate autophagy: biology et therapeutic speculations *Autophagy*. 2:132–134.
- Sarkar, S., et D.C. Rubinsztein. 2008. Huntington's disease: degradation of mutant huntingtin by autophagy *FEBS J*. 275:4263–4270.
- Satoo, K., N.N. Noda, H. Kumeta, Y. Fujioka, N. Mizushima, Y. Ohsumi, et F. Inagaki. 2009. The structure of Atg4B-LC3 complex reveals the mechanism of LC3 processing et delipidation during autophagy *EMBO J*. 28:1341–1350.
- Scarlatti, F., C. Bauvy, A. Ventruti, G. Sala, F. Cluzaud, A. Vandewalle, R. Ghidoni, et P. Codogno. 2004. Ceramide-mediated macroautophagy involves inhibition of protein kinase B et up-regulation of beclin 1 *J Biol Chem*. 279:18384–18391.
- Scarmeas, N., J.A. Luchsinger, R. Mayeux, et Y. Stern. 2007. Mediterranean diet et Alzheimer disease mortality. *Neurology*. 69:1084–1093.
- Scarmeas, N., J.A. Luchsinger, N. Schupf, A.M. Brickman, S. Cosentino, M.X. Tang, et Y. Stern. 2009. Physical activity, diet, et risk of Alzheimer disease *JAMA*. 302:627–637.
- Scheff, S., et D. Price. 2003. Synaptic pathology in Alzheimer's disease: a review of ultrastructural studies. *Neurobiol Aging*. 24:1029–1046.
- Scheper, W., D.A.T. Nijholt, et J.J.M. Hoozemans. 2011. The unfolded protein response et proteostasis in Alzheimer disease: Preferential activation of autophagy by endoplasmic reticulum stress *Autophagy*. 7.
- Scherz-Shouval, R., Y. Sagiv, H. Shorer, et Z. Elazar. 2003. The COOH terminus of GATE-16, an intra-Golgi transport modulator, is cleaved by the human cysteine protease HsApg4A *J Biol Chem*. 278:14053–14058.
- Scherz-Shouval, R., E. Shvets, E. Fass, H. Shorer, L. Gil, et Z. Elazar. 2007a. Reactive oxygen species are essential for autophagy et specifically regulate the activity of Atg4 *EMBO J*. 26:1749–1760.
- Scherz-Shouval, R., E. Shvets, et Z. Elazar. 2007b. Oxidation as a post-translational modification that regulates autophagy *Autophagy*. 3:371–373.
- Scherz-Shouval, R., et Z. Elazar. 2011. Regulation of autophagy by ROS: physiology et pathology *Trends Biochem Sci*. 36:30–38.
- Scheuner, D., C. Eckman, M. Jensen, X. Song, M. Citron, N. Suzuki, T.D. Bird, J. Hardy, M. Hutton, W. Kukull, E. Larson, E. Levy-Lahad, M. Viitanen, E. Peskind, P. Poorkaj, G. Schellenberg, R. Tanzi, W. Wasco, L. Lannfelt, D. Selkoe, et S. Younkin. 1996. Secreted amyloid beta-protein similar to that in the senile plaques of Alzheimer's disease is increased in vivo by the presenilin 1 et 2 et APP mutations linked to familial Alzheimer's disease *Nat Med*. 2:864–870.
- Schliess, F., R. Reissmann, R. Reinehr, S. Vom Dahl, et D. Häussinger. 2004. Involvement of integrins et Src in insulin signaling toward autophagic proteolysis in rat liver *J Biol Chem*. 279:21294–21301.
- Schmelzle, T., T. Beck, D.E. Martin, et M.N. Hall. 2004. Activation of the RAS/cyclic AMP pathway suppresses a TOR deficiency in yeast *Mol Cell Biol*. 24:338–351.
- Schneider, A., J. Biernat, M. von Bergen, E. Mandelkow, et E.M. Mandelkow. 1999. Phosphorylation that detaches tau protein from microtubules (Ser262, Ser214) also protects it against aggregation into Alzheimer paired helical filaments *Biochemistry*. 38:3549–3558.

Schröder, B.A., C. Wrocklage, A. Hasilik, et P. Saftig. 2010. The proteome of lysosomes *Proteomics*. 10:4053–4076.

Schwartz, D.C., et M. Hochstrasser. 2003. A superfamily of protein tags: ubiquitin, SUMO et related modifiers. *Trends Biochem Sci*. 28:321–328.

Scott, R.C., G. Juhász, et T.P. Neufeld. 2007. Direct induction of autophagy by Atg1 inhibits cell growth et induces apoptotic cell death *Curr Biol*. 17:1–11.

Scott, S.V., A. Hefner-Gravink, K.A. Morano, T. Noda, Y. Ohsumi, et D.J. Klionsky. 1996. Cytoplasm-to-vacuole targeting et autophagy employ the same machinery to deliver proteins to the yeast vacuole *Proc Natl Acad Sci USA*. 93:12304–12308.

Scott, S.V., M. Baba, Y. Ohsumi, et D.J. Klionsky. 1997. Aminopeptidase I is targeted to the vacuole by a nonclassical vesicular mechanism *J Cell Biol*. 138:37–44.

Scott, S.V., J. Guan, M.U. Hutchins, J. Kim, et D.J. Klionsky. 2001. Cvt19 is a receptor for the cytoplasm-to-vacuole targeting pathway *Mol Cell*. 7:1131–1141.

Seglen, P.O., et P.B. Gordon. 1982. 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes *Proc Natl Acad Sci USA*. 79:1889–1892.

Sehgal, S.N., H. Baker, et C. Vézina. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation et characterization *J. Antibiot* 28:727–732.

Seidenbecher, C.I., M. Landwehr, K.-H. Smalla, M. Kreutz, D.C. Dieterich, W. Zuschratter, C. Reissner, J.A. Hammarback, T.M. Böckers, E.D. Gundelfinger, and M.R. Kreutz. 2004. Caldendrin but not calmodulin binds to light chain 3 of MAP1A/B: an association with the microtubule cytoskeleton highlighting exclusive binding partners for neuronal Ca(2+)-sensor proteins *J Mol Biol*. 336:957–970.

Seibenhener, M.L., J.R. Babu, T. Geetha, H.C. Wong, N.R. Krishna, et M.W. Wooten. 2004. Sequestosome 1/p62 is a polyubiquitin chain binding protein involved in ubiquitin proteasome degradation *Mol Cell Biol*. 24:8055–8068.

Seidel, K., W.F.A. den Dunnen, C. Schultz, H. Paulson, S. Frank, R.A. de Vos, E.R. Brunt, T. Deller, H.H. Kampinga, et U. Rüb. 2010. Axonal inclusions in spinocerebellar ataxia type 3 *Acta Neuropathol*. 120:449–460.

Sekito, T., T. Kawamata, R. Ichikawa, K. Suzuki, et Y. Ohsumi. 2009. Atg17 recruits Atg9 to organize the pre-autophagosomal structure *Genes Cells*. 14:525–538.

Selkoe, D.J. 2000. The origins of Alzheimer disease: a is for amyloid *JAMA*. 283:1615–1617.

Selvaraj, A., et G. Thomas. 2010. Phosphatase 2A puts the brakes on mTORC1 nutrient signaling *Cell Metab*. 11:245–247.

Sergeant, N., A. Delacourte, et L. Buée. 2005. Tau protein as a differential biomarker of tauopathies *Biochim Biophys Acta*. 1739:179–197.

Sergeant, N., A. Bretteville, M. Hamdane, M. Caillet-Boudin, P. Grognet, S. Bombois, D. Blum, A. Delacourte, F. Pasquier, E. Vanmechelen, S. Schraen-Maschke, et L. Buée. 2008. Biochemistry of Tau in Alzheimer's disease et related neurological disorders *Expert Rev Proteomics*. 5:207–224.

Seshadri, S., A.L. Fitzpatrick, M.A. Ikram, A.L. DeStefano, V. Gudnason, M. Boada, J.C. Bis, A.V. Smith, M.M. Carassquillo, J.C. Lambert, D. Harold, E.M.C. Schrijvers, R. Ramirez-Lorca, S. Debette, W.T. Longstreth, A.C.J.W. Janssens, V.S. Pankratz, J.F. Dartigues, P. Hollingworth, T. Aspelund, I. Hernandez, A. Beiser, L.H. Kuller, P.J. Koudstaal, D.W. Dickson, C. Tzourio, R. Abraham, C. Antunez, Y. Du, J.I. Rotter, Y.S. Aulchenko, T.B. Harris, R.C. Petersen, C. Berr, M.J. Owen, J. Lopez-Arrieta, B.N. Varadarajan, J.T. Becker, F. Rivadeneira, M.A. Nalls, N.R. Graff-Radford, D. Champion, S. Auerbach, K. Rice, A. Hofman, P.V. Jonsson, H. Schmidt, M. Lathrop, T.H. Mosley, R. Au, B.M. Psaty, A.G. Uitterlinden, L.A. Farrer, T. Lumley, A. Ruiz, J. Williams, P. Amouyel, S.G. Younkin, P.A. Wolf, L.J. Launer, O.L. Lopez, C.M. van Duijn, M.M.B. Breteler, CHARGE Consortium, GERAD1 Consortium, EADI1 Consortium. 2010. Genome-wide analysis of genetic loci associated with Alzheimer disease *JAMA*. 303:1832–1840.

Settembre, C., A. Fraldi, L. Jahreiss, C. Spampinato, C. Venturi, D. Medina, R. de Pablo, C. Tacchetti, D.C. Rubinsztein, et A. Ballabio. 2008. A block of autophagy in lysosomal storage disorders *Hum Mol Genet*. 17:119–129.

Shabek, N., Y. Herman-Bachinsky, et A. Ciechanover. 2009. Ubiquitin degradation with its substrate, or as a monomer in a ubiquitination-independent mode, provides clues to proteasome regulation *Proc Natl Acad Sci USA*. 106:11907–11912.

Shang, L., S. Chen, F. Du, S. Li, L. Zhao, et X. Wang. 2011. Nutrient starvation elicits an acute autophagic response mediated by Ulk1 dephosphorylation et its subsequent dissociation from AMPK *Proc Natl Acad Sci USA*. 108:4788–4793.

Shang, L., et X. Wang. 2011. AMPK et mTOR coordinate the regulation of Ulk1 et mammalian autophagy initiation *Autophagy*. 7.

Shaw, R.J. 2009. LKB1 et AMP-activated protein kinase control of mTOR signalling et growth *Acta Physiol (Oxf)*. 196:65–80.

Shaw, R.J., M. Kosmatka, N. Bardeesy, R.L. Hurley, L.A. Witters, R.A. DePinho, et L.C. Cantley. 2004. The tumor suppressor LKB1 kinase directly activates AMP-activated kinase et regulates apoptosis in response to energy stress *Proc Natl Acad Sci USA*. 101:3329–3335.

- Shen, H., et P. Codogno. 2011. Autophagic cell death: Loch Ness monster or endangered species *Autophagy*. 7.
- Shen, J., et R.J. Kelleher. 2007. The presenilin hypothesis of Alzheimer's disease: evidence for a loss-of-function pathogenic mechanism *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:403–409.
- Shen, W., et B. Ganetzky. 2009. Autophagy promotes synapse development in *Drosophila* *J Cell Biol*. 187:71–79.
- Shen, W. et B. Ganetzky. 2010. Nibbling away at synaptic development *Autophagy*. 6:168–169.
- Shin, C., S.Y. Kim, et W. Huh. 2009. TORC1 controls degradation of the transcription factor Stp1, a key effector of the SPS amino-acid-sensing pathway in *Saccharomyces cerevisiae* *J Cell Sci*. 122:2089–2099.
- Shintani, T., W. Huang, P.E. Stromhaug, et D.J. Klionsky. 2002. Mechanism of cargo selection in the cytoplasm to vacuole targeting pathway *Dev Cell*. 3:825–837.
- Shintani, T., et D.J. Klionsky. 2004a. Cargo proteins facilitate the formation of transport vesicles in the cytoplasm to vacuole targeting pathway *J Biol Chem*. 279:29889–29894.
- Shintani, T., et D.J. Klionsky. 2004b. Autophagy in health et disease: a double-edged sword *Science*. 306:990–995.
- Shirahama, K., T. Noda, et Y. Ohsumi. 1997. Mutational analysis of Csc1/Vps4p: involvement of endosome in regulation of autophagy in yeast *Cell Struct Funct*. 22:501–509.
- Shore, G.C., F.R. Papa, et S.A. Oakes. 2011. Signaling cell death from the endoplasmic reticulum stress response *Current opinion in cell biology*. 23:143–149.
- Shpilka, T., et Z. Elazar. 2011. Shedding light on mammalian microautophagy *Dev Cell*. 20:1–2.
- Sikorska, B., P.P. Liberski, P. Giraud, N. Kopp, et P. Brown. 2004. Autophagy is a part of ultrastructural synaptic pathology in Creutzfeldt-Jakob disease: a brain biopsy study *Int J Biochem Cell Biol*. 36:2563–2573.
- Simonsen, A., H.C.G. Birkeland, D.J. Gillooly, N. Mizushima, A. Kuma, T. Yoshimori, T. Slagsvold, A. Brech, et H. Stenmark. 2004. Alfy, a novel FYVE-domain-containing protein associated with protein granules et autophagic membranes *J Cell Sci*. 117:4239–4251.
- Simonsen, A., R.C. Cumming, K. Lindmo, V. Galaviz, S. Cheng, T.E. Rusten, et R.D. Finley. 2007. Genetic modifiers of the *Drosophila* blue cheese gene link defects in lysosomal transport with decreased life span et altered ubiquitinated-protein profiles *Genetics*. 176:1283–1297.
- Simonsen, A., et H. Stenmark. 2008. Self-eating from an ER-associated cup. *J Cell Biol*. 182:621–622.
- Simonsen, A., et S.A. Tooze. 2009. Coordination of membrane events during autophagy by multiple class III PI3-kinase complexes. *J Cell Biol*. 186:773–782.
- Smetana, J.H.C., et N.I.T. Zanchin. 2007. Interaction analysis of the heterotrimer formed by the phosphatase 2A catalytic subunit, alpha4 et the mammalian ortholog of yeast Tip41 (TIPRL) *FEBS J*. 274:5891–5904.
- Smith, G.P. 2008. Unacknowledged contributions of Pavlov et Barcroft to Cannon's theory of homeostasis. *Appetite*. 51:428–432.
- Snell, G.D. 1929. Dwarf, a new mendelian recessive character of the house mouse *Proc Natl Acad Sci USA*. 15:733–734.
- Song, M.S., G.B. Baker, K.G. Todd, et S. Kar. 2011. Inhibition of β -amyloid1-42 internalization attenuates neuronal death by stabilizing the endosomal-lysosomal system in rat cortical cultured neurons *Neuroscience*. 178:181–188.
- Sontag, E., V. Nunbhakdi-Craig, G. Lee, G.S. Bloom, et M.C. Mumby. 1996. Regulation of the phosphorylation state et microtubule-binding activity of Tau by protein phosphatase 2A *Neuron*. 17:1201–1207.
- Sontag, E., V. Nunbhakdi-Craig, G. Lee, A. Brandt, C. Kamibayashi, J. Kuret, C.L. White 3rd, M.C. Mumby, et G.S. Bloom. 1999. Molecular interactions among protein phosphatase 2A, tau, et microtubules. Implications for the regulation of tau phosphorylation et the development of tauopathies *J Biol Chem*. 274:25490–25498.
- Sontag, E., V. Nunbhakdi-Craig, J. Sontag, R. Diaz-Arrastia, E. Ogris, S. Dayal, S.R. Lentz, E. Arning, et T. Bottiglieri. 2007. Protein phosphatase 2A methyltransferase links homocysteine metabolism with tau et amyloid precursor protein regulation *J Neurosci*. 27:2751–2759.
- Sparks, D.L., R. Friedland, S. Petanceska, B.G. Schreurs, J. Shi, G. Perry, M.A. Smith, A. Sharma, S. Derosa, C. Ziolkowski, et G. Stankovic. 2006. Trace copper levels in the drinking water, but not zinc or aluminum influence CNS Alzheimer-like pathology *J Nutr Health Aging*. 10:247–254.
- Sperber, B.R., S. Leight, M. Goedert, et V.M. Lee. 1995. Glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylates tau protein at multiple sites in intact cells *Neurosci Lett*. 197:149–153.
- Spires-Jones, T.L., W.H. Stoothoff, A. de Calignon, P.B. Jones, et B.T. Hyman. 2009. Tau pathophysiology in neurodegeneration: a tangled issue. *Trends Neurosci*. 32:150–159.
- Spudich, J.A. 2011. Biochemistry. Molecular motors, beauty in complexity *Science*. 331:1143–1144.
- Stamer, K., R. Vogel, E. Thies, E. Mandelkow, et E.M. Mandelkow. 2002. Tau blocks traffic of organelles, neurofilaments, et APP vesicles in neurons et enhances oxidative stress *J Cell Biol*. 156:1051–1063.
- Stappenbeck, T.S., J.D. Rioux, A. Mizoguchi, T. Saitoh, A. Huett, A. Darfeuille-Michaud, T. Wileman, N. Mizushima, S. Carding, S. Akira, M. Parkes, et R.J. Xavier. 2010. Crohn disease: A current perspective on genetics, autophagy et immunity. *Autophagy*. 7.

Strack, S., R. Ruediger, G. Walter, R.K. Dagda, C.A. Barwacz, et J.T. Cribbs. 2002. Protein phosphatase 2A holoenzyme assembly: identification of contacts between B-family regulatory et scaffolding A subunits *J Biol Chem*. 277:20750–20755.

Strappazon, F., M. Vietri-Rudan, S. Campello, F. Nazio, F. Florenzano, G.M. Fimia, M. Piacentini, B. Levine, et F. Cecconi. 2011. Mitochondrial BCL-2 inhibits AMBRA1-induced autophagy *EMBO J*. 30:1195–1208.

Strozyk, D., L.J. Launer, P.A. Adlard, R.A. Cherny, A. Tsatsanis, I. Volitakis, K. Blennow, H. Petrovitch, L.R. White, et A.I. Bush. 2009. Zinc et copper modulate Alzheimer Abeta levels in human cerebrospinal fluid *Neurobiol Aging*. 30:1069–1077.

Subramani, S., et J. Farré. 2007. A ubiquitin-like protein involved in membrane fusion *Cell*. 130:18–20.

Sultan, A., F. Nessler, M. Violet, S. Bégard, A. Loyens, S. Talahari, Z. Mansuroglu, D. Marzin, N. Sergeant, S. Humez, M. Colin, E. Bonnefoy, L. Buée, et M. Galas. 2011. Nuclear tau, a key player in neuronal DNA protection *J Biol Chem*. 286:4566–4575.

Sun, Q., W. Fan, et Q. Zhong. 2009. Regulation of Beclin 1 in autophagy *Autophagy*. 5:713–716.

Sun, Q., W. Westphal, K.N. Wong, I. Tan, et Q. Zhong. 2010. Rubicon controls endosome maturation as a Rab7 effector *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:19338–19343.

Surpin, M., H. Zheng, M.T. Morita, C. Saito, E. Avila, J.J. Blakeslee, A. Bandyopadhyay, V. Kovaleva, D. Carter, A. Murphy, M. Tasaka, et N. Raikhel. 2003. The VTI family of SNARE proteins is necessary for plant viability et mediates different protein transport pathways *Plant Cell*. 15:2885–2899.

Sutherland, C., I.A. Leighton, et P. Cohen. 1993. Inactivation of glycogen synthase kinase-3 beta by phosphorylation: new kinase connections in insulin et growth-factor signalling *Biochem J*. 296 (Pt 1):15–19.

Suzuki, K., C. Kondo, M. Morimoto, et Y. Ohsumi. 2010. Selective transport of alpha-mannosidase by autophagic pathways: identification of a novel receptor, Atg34p *J Biol Chem*. 285:30019–30025.

Suzuki, K., et Y. Ohsumi. 2007. Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*. 581:2156–2161.

Taguchi-Atarashi, N., M. Hamasaki, K. Matsunaga, H. Omori, N.T. Ktistakis, T. Yoshimori, et T. Noda. 2010. Modulation of local PtdIns3P levels by the PI phosphatase MTMR3 regulates constitutive autophagy. *Traffic*. 11:468–478.

Takahashi, R.H., E.E. Nam, M. Edgar, et G.K. Gouras. 2002. Alzheimer beta-amyloid peptides: normal et abnormal localization *Histol Histopathol*. 17:239–246.

Takahashi, R.H., E. Capetillo-Zarate, M.T. Lin, T.A. Milner, et G.K. Gouras. 2010. Co-occurrence of Alzheimer's disease β -amyloid et τ pathologies at synapses. *Neurobiol Aging*. 31:1145–1152.

Takahashi, Y., D. Coppola, N. Matsushita, H.D. Culling, M. Sun, Y. Sato, C. Liang, J.U. Jung, J.Q. Cheng, J.J. Mulé, W.J. Pledger, et H. Wang. 2007. Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG et regulates autophagy et tumorigenesis *Nat Cell Biol*. 9:1142–1151.

Takahashi, Y., C.L. Meyer cord, et H. Wang. 2009. Bif-1/endophilin B1: a candidate for crescent driving force in autophagy *Cell Death Differ*. 16:947–955.

Takahashi, Y., C.L. Meyer cord, T. Hori, K. Runkle, T.E. Fox, M. Kester, T.P. Loughran, et H. Wang. 2011. Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy *Autophagy*. 7:61–73.

Takeshige, K., M. Baba, S. Tsuboi, T. Noda, et Y. Ohsumi. 1992. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants et conditions for its induction *J Cell Biol*. 119:301–311.

Tamai, K., M. Toyoshima, N. Tanaka, N. Yamamoto, Y. Owada, H. Kiyonari, K. Murata, Y. Ueno, M. Ono, T. Shimosegawa, N. Yaegashi, M. Watanabe, et K. Sugamura. 2008. Loss of hrs in the central nervous system causes accumulation of ubiquitinated proteins et neurodegeneration *Am J Pathol*. 173:1806–1817.

Tamboli, I.Y., N.T. Tien, et J. Walter. 2011. Sphingolipid storage impairs autophagic clearance of Alzheimer-associated proteins *Autophagy*. 7.

Tan, E.K., J. Lee, C.P. Chen, Y.Y. Teo, Y. Zhao, et W.L. Lee. 2009. SORL1 haplotypes modulate risk of Alzheimer's disease in Chinese *Neurobiol Aging*. 30:1048–1051.

Tan, J.M.M., E.S.P. Wong, V.L. Dawson, T.M. Dawson, et K. Lim. 2007. Lysine 63-linked polyubiquitin potentially partners with p62 to promote the clearance of protein inclusions by autophagy *Autophagy*. 4.

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

Tang, G., Z. Yue, Z. Talloczy, T. Hagemann, W. Cho, A. Messing, D.L. Sulzer, et J.E. Goldman. 2008a. Autophagy induced by Alexander disease-mutant GFAP accumulation is regulated by p38/MAPK et mTOR signaling pathways *Hum Mol Genet*. 17:1540–1555.

Tang, G., Z. Yue, Z. Talloczy, et J.E. Goldman. 2008b. Adaptive autophagy in Alexander disease-affected astrocytes *Autophagy*. 4:701–703.

Tanida, I., N. Mizushima, M. Kiyooka, M. Ohsumi, T. Ueno, Y. Ohsumi, et E. Kominami. 1999. Apg7p/Cvt2p: A novel protein-activating enzyme essential for autophagy. *Mol Biol Cell*. 10:1367–1379.

- Tanida, I., E. Tanida-Miyake, M. Komatsu, T. Ueno, et E. Kominami. 2002. Human Apg3p/Aut1p homologue is an authentic E2 enzyme for multiple substrates, GATE-16, GABARAP, et MAP-LC3, et facilitates the conjugation of hApg12p to hApg5p *J Biol Chem.* 277:13739–13744.
- Tanida, I., Y. Sou, J. Ezaki, N. Minematsu-Ikeguchi, T. Ueno, et E. Kominami. 2004. HsAtg4B/HsApg4B/autophagin-1 cleaves the carboxyl termini of three human Atg8 homologues et delipidates microtubule-associated protein light chain 3- et GABAA receptor-associated protein-phospholipid conjugates. *J Biol Chem.* 279:36268–36276.
- Tanimukai, H., I. Grundke-Iqbal, et K. Iqbal. 2004. Inhibitors of protein phosphatase-2A: topography et subcellular localization. *Brain Res Mol Brain Res.* 126:146–156.
- Tanimukai, H., I. Grundke-Iqbal, et K. Iqbal. 2005. Up-regulation of inhibitors of protein phosphatase-2A in Alzheimer's disease. *Am J Pathol.* 166:1761–1771.
- Tanzi, R.E. 2005. The synaptic Abeta hypothesis of Alzheimer disease *Nat Neurosci.* 8:977–979.
- Tasdemir, E., M. Chiara Maiuri, L. Galuzzi, I. Vitale, M. Djavaheri-Mergny, M. D'Amelio, A. Criollo, E. Morselli, C. Zhu, F. Harper, U. Nannmark, C. Samara, P. Pinton, J.M. Vicenzio, R. Carnuccio, U.M. Moll, F. Madeo, P. Paterlini-Brechot, R. Rizzuto, G. Szabadkal, G. Pierron, K. Blomgren, N. Tavernarakis, P. Codogno, F. Cecconi, et G. Kroemer. 2008a. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53 *Nat Cell Biol.* 10:676–687.
- Tasdemir, E., M. Chiara Maiuri, E. Morselli, A. Criollo, M. D'Amelio, M. Djavaheri-Mergny, F. Cecconi, N. Tavernarakis, et G. Kroemer. 2008b. A dual role of p53 in the control of autophagy *Autophagy.* 4:810–814.
- Taylor, M.P., et K. Kirkegaard. 2007. Modification of cellular autophagy protein LC3 by poliovirus *J Virol.* 81:12543–12553.
- Tekinay, T., M.Y. Wu, G.P. Otto, O.R. Anderson, et R.H. Kessin. 2006. Function of the Dictyostelium discoideum Atg1 kinase during autophagy et development *Eukaryotic Cell.* 5:1797–1806.
- Thumm, M., R. Egner, B. Koch, M. Schlumpberger, M. Straub, M. Veenhuis, et D.H. Wolf. 1994. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae* *FEBS Lett.* 349:275–280.
- Till, A., et S. Subramani. 2010. A balancing act for autophagin *J Clin Invest.* 120:2273–2276.
- Tomiya, T., S. Matsuyama, H. Iso, T. Umeda, H. Takuma, K. Ohnishi, K. Ishibashi, R. Teraoka, N. Sakama, T. Yamashita, K. Nishitsuji, K. Ito, H. Shimada, M.P. Lambert, W.L. Klein, et H. Mori. 2010. A mouse model of amyloid beta oligomers: their contribution to synaptic alteration, abnormal tau phosphorylation, glial activation, et neuronal loss in vivo. *J Neurosci.* 30:4845–4856.
- Tomoda, T., R.S. Bhatt, H. Kuroyanagi, T. Shirasawa, et M.E. Hatten. 1999. A mouse serine/threonine kinase homologous to *C. elegans* UNC51 functions in parallel fiber formation of cerebellar granule neurons *Neuron.* 24:833–846.
- Tooze, J., M. Hollinshead, T. Ludwig, K. Howell, B. Hoflack, et H. Kern. 1990. In exocrine pancreas, the basolateral endocytic pathway converges with the autophagic pathway immediately after the early endosome *J Cell Biol.* 111:329–345.
- Tooze, S.A., et T. Yoshimori. 2010. The origin of the autophagosomal membrane *Nat Cell Biol.* 12:831–835.
- Trockenbacher, A., V. Suckow, J. Foerster, J. Winter, S. Krauss, H. Ropers, R. Schneider, et S. Schweiger. 2001. MID1, mutated in Opitz syndrome, encodes an ubiquitin ligase that targets phosphatase 2A for degradation. *Nat Genet.* 29:287–294.
- Tsuboi, D., T. Hikita, H. Qadota, M. Amano, et K. Kaibuchi. 2005. Regulatory machinery of UNC-33 Ce-CRMP localization in neurites during neuronal development in *Caenorhabditis elegans*. *J Neurochem.* 95:1629–1641.
- Tsukamoto, S., A. Kuma, M. Murakami, C. Kishi, A. Yamamoto, et N. Mizushima. 2008a. Autophagy is essential for preimplantation development of mouse embryos *Science.* 321:117–120.
- Tsukamoto, S., A. Kuma, et N. Mizushima. 2008b. The role of autophagy during the oocyte-to-embryo transition. *Autophagy.* 4:1076–1078.
- Tsvetkov, A.S., M. Siddhartha, et S. Finkbeiner. 2009. Protein turnover differences between neurons et other cells. *Autophagy.* 5.
- Tsvetkov, A.S., J. Miller, M. Arrasate, J.S. Wong, M.A. Pleiss, and S. Finkbeiner. 2010. A small-molecule scaffold induces autophagy in primary neurons and protects against toxicity in a Huntington disease model *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:16982–16987.
- Tung, Y., W. Hsu, H. Lee, W. Huang, et Y. Liao. 2010. The evolutionarily conserved interaction between LC3 et p62 selectively mediates autophagy-dependent degradation of mutant huntingtin *Cell. Mol. Neurobiol.* 30:795–806.
- Tydemers, J., A. Mogk, et B. Bukau. 2010. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 11:777–788.
- Ugarte, N., I. Petropoulos, et B. Friguet. 2010. Oxidized mitochondrial protein degradation et repair in aging et oxidative stress *Antioxid Redox Signal.* 13:539–549.
- Underwood, B.R., S. Imarisio, A. Fleming, C. Rose, G. Krishna, P. Heard, M. Quick, V.I. Korolchuk, M. Renna, S. Sarkar, M. Garcia-Arencibia, C.J. O'Kane, M.P. Murphy, et D.C. Rubinsztein. 2010. Antioxidants can inhibit basal autophagy et enhance neurodegeneration in models of polyglutamine disease *Hum Mol Genet.* 19:3413–3429.

Vadlamudi, R.K., I. Joungh, J.L. Strominger, et J. Shin. 1996. p62, a phosphotyrosine-independent ligand of the SH2 domain of p56lck, belongs to a new class of ubiquitin-binding proteins *J Biol Chem.* 271:20235–20237.

Vergne, I., E. Roberts, R.A. Elmaoued, V. Tosch, M.A. Delgado, T. Proikas-Cezanne, J. Laporte, et V. Deretic. 2009. Control of autophagy initiation by phosphoinositide 3-phosphatase Jumpy. *EMBO J.* 28:2244–2258.

Vergne, I., et V. Deretic. 2010. The role of PI3P phosphatases in the regulation of autophagy *FEBS Lett.* 584:1313–1318.

Vernace, V.A., T. Schmidt-Glenewinkel, et M.E. Figueiredo-Pereira. 2007. Aging et regulated protein degradation: who has the UPPer hand *Aging Cell.* 6:599–606.

Vertut-Doi, A., P. Hannaert, et J. Bolard. 1988. The polyene antibiotic amphotericin B inhibits the Na⁺/K⁺ pump of human erythrocytes *Biochem Biophys Res Commun.* 157:692–697.

Vézina, C., A. Kudelski, et S.N. Sehgal. 1975. Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete et isolation of the active principle *J. Antibiot* 28:721–726.

Viana, R., C. Aguado, I. Esteban, D. Moreno, B. Viollet, E. Knecht, et P. Sanz. 2008. Role of AMP-activated protein kinase in autophagy et proteasome function *Biochem Biophys Res Commun.* 369:964–968.

Vicencio, J.M., C. Ortiz, A. Criollo, A.W.E. Jones, O. Kepp, L. Galluzzi, N. Joza, I. Vitale, E. Morselli, M. Tailler, M. Castedo, M.C. Maiuri, J. Molgó, G. Szabadkai, S. Lavandro, et G. Kroemer. 2009. The inositol 1,4,5-trisphosphate receptor regulates autophagy through its interaction with Beclin 1 *Cell Death Differ.* 16:1006–1017.

Vingtdeux, V., L. Giliberto, H. Zhao, P. Chandakkar, Q. Wu, J.E. Simon, E.M. Janle, J. Lobo, M.G. Ferruzzi, P. Davies, et P. Marambaud. 2010. AMP-activated protein kinase signaling activation by resveratrol modulates amyloid-beta peptide metabolism *J Biol Chem.* 285:9100–9113.

Virshup, D.M., et S. Shenolikar. 2009. From promiscuity to precision: protein phosphatases get a makeover *Mol Cell.* 33:537–545.

Vives-Bauza, C., C. Zhou, Y. Huang, M. Cui, R.L.A. de Vries, J. Kim, J. May, M.A. Tocilescu, W. Liu, H.S. Ko, J. Magrané, D.J. Moore, V.L. Dawson, R. Grailhe, T.M. Dawson, C. Li, K. Tieu, et S. Przedborski. 2010. PINK1-dependent recruitment of Parkin to mitochondria in mitophagy *Proc Natl Acad Sci USA.* 107:378–383.

Vogelsberg-Ragaglia, V., T. Schuck, J.Q. Trojanowski, et V.M. Lee. 2001. PP2A mRNA expression is quantitatively decreased in Alzheimer's disease hippocampus. *Exp Neurol.* 168:402–412.

Vogiatzi, T., M. Xilouri, K. Vekrellis, et L. Stefanis. 2008. Wild type alpha-synuclein is degraded by chaperone-mediated autophagy et macroautophagy in neuronal cells *J Biol Chem.* 283:23542–23556.

Vucicevic, L., M. Misirkic, K. Janjetovic, U. Vilimanovich, E. Sudar, E. Isenovic, M. Prica, L. Harhaji-Trajkovic, T. Kravic-Stevovic, V. Bumbasirevic, et V. Trajkovic. 2011. Compound C induces protective autophagy in cancer cells through AMPK inhibition-independent blockade of Akt/mTOR pathway *Autophagy.* 7:40–50.

Walker S., P. Chandra, M. Manifava, E. Axe et N.T. Ktistakis. 2008. Making autophagosomes: localized synthesis of phosphatidylinositol 3-phosphate holds the clue. *Autophagy.* 4:1093–1096.

Wang, B., S. Ling, et W. Lin. 2010a. 14-3-3Tau regulates Beclin 1 et is required for autophagy *PLoS ONE.* 5:e10409.

Wang, H., F.K. Bedford, N.J. Brandon, S.J. Moss, et R.W. Olsen. 1999. GABA(A)-receptor-associated protein links GABA(A) receptors et the cytoskeleton *Nature.* 397:69–72.

Wang, J., L. Ho, Z. Zhao, I. Seror, N. Humala, D.L. Dickstein, M. Thiyagarajan, S.S. Percival, S.T. Talcott, et G.M. Pasinetti. 2006a. Moderate consumption of Cabernet Sauvignon attenuates Abeta neuropathology in a mouse model of Alzheimer's disease *FASEB J.* 20:2313–2320.

Wang, Q.J., Y. Ding, D.S. Kohtz, S. Kohtz, N. Mizushima, I.M. Cristea, M.P. Rout, B.T. Chait, Y. Zhong, N. Heintz, et Z. Yue. 2006b. Induction of autophagy in axonal dystrophy et degeneration *J Neurosci.* 26:8057–8068.

Wang, T., Z. Ming, W. Xiaochun, et W. Hong. 2011. Rab7: role of its protein interaction cascades in endo-lysosomal traffic *Cell Signal.* 23:516–521.

Wang, Y., M. Martinez-Vicente, U. Krüger, S. Kaushik, E. Wong, E. Mandelkow, A.M. Cuervo, et E. Mandelkow. 2009. Tau fragmentation, aggregation et clearance: the dual role of lysosomal processing *Hum Mol Genet.* 18:4153–4170.

Wang, Y., U. Krüger, E. Mandelkow, et E. Mandelkow. 2010b. Generation of tau aggregates et clearance by autophagy in an inducible cell model of tauopathy *Neurodegener Dis.* 7:103–107.

Wang, Y., M. Martinez-Vicente, U. Krüger, S. Kaushik, E. Wong, E. Mandelkow, A.M. Cuervo, et E. Mandelkow. 2010c. Synergy et antagonism of macroautophagy et chaperone-mediated autophagy in a cell model of pathological tau aggregation *Autophagy.* 6:182–183.

Watanabe, Y., N.N. Noda, H. Kumeta, K. Suzuki, Y. Ohsumi, et F. Inagaki. 2010. Selective transport of alpha-mannosidase by autophagic pathways: structural basis for cargo recognition by Atg19 et Atg34 *J Biol Chem.* 285:30026–30033.

Waters, S., K. Marchbank, E. Solomon, C. Whitehouse, et M. Gautel. 2009. Interactions with LC3 et polyubiquitin chains link nbr1 to autophagic protein turnover *FEBS Lett.* 583:1846–1852.

Waters, S., K. Marchbank, E. Solomon, et C.A. Whitehouse. 2010. Autophagic receptors Nbr1 et p62 coregulate skeletal remodeling *Autophagy*. 6:981–983.

Webb, J.L., B. Ravikumar, et D.C. Rubinsztein. 2004. Microtubule disruption inhibits autophagosome-lysosome fusion: implications for studying the roles of aggresomes in polyglutamine diseases *Int J Biochem Cell Biol*. 36:2541–2550.

Webber, J.L., et S.A. Tooze. 2010. Coordinated regulation of autophagy by p38alpha MAPK through mAtg9 et p38IP *EMBO J*. 29:27–40.

Wei, Y., S. Pattingre, S. Sinha, M. Bassik, et B. Levine. 2008. JNK1-mediated phosphorylation of Bcl-2 regulates starvation-induced autophagy *Mol Cell*. 30:678–688.

Weidberg, H., T. Shpilka, E. Shvets, et Z. Elazar. 2010. Mammalian Atg8s: one is simply not enough *Autophagy*. 6:808–809.

Weingarten, M.D., A.H. Lockwood, S.Y. Hwo, et M.W. Kirschner. 1975. A protein factor essential for microtubule assembly *Proc Natl Acad Sci USA*. 72:1858–1862.

Westerheide, S.D., J. Ancker, S.M. Stevens, L. Sistonen, et R.I. Morimoto. 2009. Stress-inducible regulation of heat shock factor 1 by the deacetylase SIRT1. *Science*. 323:1063–1066.

Westermarck, J., et W.C. Hahn. 2008. Multiple pathways regulated by the tumor suppressor PP2A in transformation. *Trends Mol Med*. 14:152–160.

Whitehouse, C.A., S. Waters, K. Marchbank, A. Horner, N.W.A. McGowan, J.V. Jovanovic, G.M. Xavier, T.G. Kashima, M.T. Cobourne, G.O. Richards, P.T. Sharpe, T.M. Skerry, A.E. Grigoriadis, et E. Solomon. 2010. Neighbor of Brcal gene (Nbr1) functions as a negative regulator of postnatal osteoblastic bone formation et p38 MAPK activity *Proc Natl Acad Sci USA*. 107:12913–12918.

Wilkinson, K.D., M.K. Urban, et A.L. Haas. 1980. Ubiquitin is the ATP-dependent proteolysis factor I of rabbit reticulocytes *J Biol Chem*. 255:7529–7532.

Williams, A., L. Jahreiss, S. Sarkar, S. Saiki, F.M. Menzies, B. Ravikumar, et D.C. Rubinsztein. 2006. Aggregate-prone proteins are cleared from the cytosol by autophagy: therapeutic implications *Curr. Top. Dev. Biol* 76:89–101.

Williams, T., L.J. Forsberg, B. Viollet, et J.E. Brenman. 2009. Basal autophagy induction without AMP-activated protein kinase under low glucose conditions. *Autophagy*. 5:1155–1165.

Williamson, W.R., et P.R. Hiesinger. 2010. On the role of v-ATPase V0a1-dependent degradation in Alzheimer disease *Commun Integr Biol*. 3:604–607.

Wilson, C.A., R.W. Doms, et V.M. Lee. 2003. Distinct presenilin-dependent et presenilin-independent gamma-secretases are responsible for total cellular Abeta production *J Neurosci Res*. 74:361–369.

Wilson, C.A., D.D. Murphy, B.I. Giasson, B. Zhang, J.Q. Trojanowski, et V.M. Lee. 2004. Degradative organelles containing mislocalized alpha-et beta-synuclein proliferate in presenilin-1 null neurons *J Cell Biol*. 165:335–346.

Wing, S.S., H.L. Chiang, A.L. Goldberg, et J.F. Dice. 1991. Proteins containing peptide sequences related to Lys-Phe-Glu-Arg-Gln are selectively depleted in liver et heart, but not skeletal muscle, of fasted rats *Biochem J*. 275 (Pt 1): 165–169.

Wirawan, E., L. Vande Walle, K. Kersse, S. Cornelis, S. Claerhout, I. Vanoverberghe, R. Roelandt, R. De Rycke, J. Verspurten, W. Declercq, P. Agostinis, T. Vanden Berghe, S. Lippens, et P. Vandenabeele. 2010. Caspase-mediated cleavage of Beclin-1 inactivates Beclin-1-induced autophagy et enhances apoptosis by promoting the release of proapoptotic factors from mitochondria *Cell Death Dis*. 1:e18.

Wolf, D.H. 2004. From lysosome to proteasome: the power of yeast in the dissection of proteinase function in cellular regulation et waste disposal *Cell Mol Life Sci*. 61:1601–1614.

Wolozin, B. 2004. Cholesterol et the biology of Alzheimer's disease *Neuron*. 41:7–10.

Wong, E., et A.M. Cuervo. 2010. Autophagy gone awry in neurodegenerative diseases *Nat Neurosci*. 13:805–811.

Wong, E.S.P., J.M.M. Tan, W. Soong, K. Hussein, N. Nukina, V.L. Dawson, T.M. Dawson, A.M. Cuervo, et K. Lim. 2008. Autophagy-mediated clearance of aggresomes is not a universal phenomenon. *Hum Mol Genet*. 17:2570–2582.

Woodside, K.H., et G.E. Mortimore. 1972. Suppression of protein turnover by amino acids in the perfused rat liver *J Biol Chem*. 247:6474–6481.

Wooten, M.W., X. Hu, J. Ramesh Babu, M.L. Seibenhener, T. Geetha, M.G. Paine, et M.C. Wooten. 2006. Signaling, polyubiquitination, trafficking, et inclusions: sequestosome 1/p62's role in neurodegenerative disease. *J Biomed Biotechnol*. 2006:62079.

Wooten, M.W., T. Geetha, J. Ramesh Babu, M.L. Seibenhener, J. Peng, N. Cox, M. Diaz-Meco, et J. Moscat. 2008. Essential role of sequestosome 1/p62 in regulating accumulation of Lys63-ubiquitinated proteins. *J Biol Chem*. 283:6783–6789.

Xie, R., S. Nguyen, W.L. McKeehan, et L. Liu. 2010. Acetylated microtubules are required for fusion of autophagosomes with lysosomes *BMC Cell Biol* 11:89.

Xie, R., S. Nguyen, K. McKeehan, F. Wang, W.L. McKeehan, et L. Liu. 2011. Microtubule-associated Protein 1S (MAP1S) Bridges Autophagic Components with Microtubules et Mitochondria to Affect Autophagosomal Biogenesis et Degradation *J Biol Chem.* 286:10367–10377.

Xie, Z., U. Nair, et D.J. Klionsky. 2008a. Atg8 controls phagophore expansion during autophagosome formation *Mol Biol Cell.* 19:3290–3298.

Xie, Z., U. Nair, et D.J. Klionsky. 2008b. Dissecting autophagosome formation: the missing pieces *Autophagy.* 4:920–922.

Xilouri, M., T. Vogiatzi, K. Vekrellis, D. Park, et L. Stefanis. 2009. Abberant alpha-synuclein confers toxicity to neurons in part through inhibition of chaperone-mediated autophagy *PLoS ONE.* 4:e5515.

Xiong, H., D. Wang, L. Chen, Y.S. Choo, H. Ma, C. Tang, K. Xia, W. Jiang, Z. Ronai, X. Zhuang, et Z. Zhang. 2009. Parkin, PINK1, et DJ-1 form a ubiquitin E3 ligase complex promoting unfolded protein degradation. *J Clin Invest.* 119:650–660.

Xu, Y., Y. Chen, P. Zhang, P.D. Jeffrey, et Y. Shi. 2008. Structure of a protein phosphatase 2A holoenzyme: insights into B55-mediated Tau dephosphorylation *Mol Cell.* 31:873–885.

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

Yamamoto, A., et A. Simonsen. 2011a. Alfy-dependent elimination of aggregated proteins by macroautophagy: Can there be too much of a good thing *Autophagy.* 7:346–350.

Yamamoto, A., et A. Simonsen. 2011b. The elimination of accumulated et aggregated proteins: A role for autophagy in neurodegeneration *Neurobiol Dis.* 43:17–28.

Yamashima, T., et S. Oikawa. 2009. The role of lysosomal rupture in neuronal death *Prog Neurobiol.* 89:343–358.

Yan, G., X. Shen, et Y. Jiang. 2006. Rapamycin activates Tap42-associated phosphatases by abrogating their association with Tor complex 1. *EMBO J.* 25:3546–3555.

Yan, L., V. Mieulet, D. Burgess, G.M. Findlay, K. Sully, J. Procter, J. Goris, V. Janssens, N.A. Morrice, et R.F. Lamb. 2010. PP2A T61 epsilon is an inhibitor of MAP4K3 in nutrient signaling to mTOR *Mol Cell.* 37:633–642.

Yan, R., M.J. Bienkowski, M.E. Shuck, H. Miao, M.C. Tory, A.M. Pauley, J.R. Brashier, N.C. Stratman, W.R. Mathews, A.E. Buhl, D.B. Carter, A.G. Tomasselli, L.A. Parodi, R.L. Heinrikson, et M.E. Gurney. 1999. Membrane-anchored aspartyl protease with Alzheimer's disease beta-secretase activity *Nature.* 402:533–537.

Yang, D., P. Stavrides, P.S. Mohan, S. Kaushik, A. Kumar, M. Ohno, S.D. Schmidt, D. Wesson, U. Bandyopadhyay, Y. Jiang, M. Pawlik, C.M. Peterhoff, A.J. Yang, D.A. Wilson, P. St George-Hyslop, D. Westaway, P.M. Mathews, E. Levy, A.M. Cuervo, et R.A. Nixon. 2011. Reversal of autophagy dysfunction in the TgCRND8 mouse model of Alzheimer's disease ameliorates amyloid pathologies et memory deficits *Brain.* 134:258–277.

Yang, Z., et D.J. Klionsky. 2010. Eaten alive: a history of macroautophagy. *Nat Cell Biol.* 12:814–822.

Yen, W., J.E. Legakis, U. Nair, et D.J. Klionsky. 2007. Atg27 is required for autophagy-dependent cycling of Atg9 *Mol Biol Cell.* 18:581–593.

Yen, W., et D.J. Klionsky. 2007. Atg27 is a second transmembrane cycling protein *Autophagy.* 3:254–256.

Ylä-Anttila, P., H. Vihinen, E. Jokitalo, et E. Eskelinen. 2009. 3D tomography reveals connections between the phagophore et endoplasmic reticulum *Autophagy.* 5:1180–1185.

Yoon, S., J. Choi, H. Kweon, H. Choe, S.W. Kim, O. Hwang, H. Lee, J. Lee, et D. Kim. 2008. Okadaic acid increases autophagosomes in rat neurons: implications for Alzheimer's disease *J Neurosci Res.* 86:3230–3239.

Yoon, S., Y. Ha, J. Choi, J. Ahn, H. Lee, et D. Kim. 2009. Autophagy in coxsackievirus-infected neurons *Autophagy.* 5:388–389.

Yorimitsu, T., U. Nair, Z. Yang, et D.J. Klionsky. 2006. Endoplasmic reticulum stress triggers autophagy *J Biol Chem.* 281:30299–30304.

Yorimitsu, T., C. He, K. Wang, et D.J. Klionsky. 2009. Tap42-associated protein phosphatase type 2A negatively regulates induction of autophagy *Autophagy.* 5:616–624.

Yorimitsu, T., et D.J. Klionsky. 2005a. Atg11 links cargo to the vesicle-forming machinery in the cytoplasm to vacuole targeting pathway *Mol Biol Cell.* 16:1593–1605.

Yorimitsu, T., et D.J. Klionsky. 2005b. Autophagy: molecular machinery for self-eating *Cell Death Differ.* 12 Suppl 2:1542–1552.

Yorimitsu, T., et D.J. Klionsky. 2007. Endoplasmic reticulum stress: a new pathway to induce autophagy *Autophagy.* 3:160–162.

Yoshimori, T. 2002. Toward et beyond lysosomes *Cell Struct Funct.* 27:401–402.

Yoshimori, T. 2004. Autophagy: a regulated bulk degradation process inside cells *Biochem Biophys Res Commun.* 313:453–458.

Yoshimori, T. 2007. Autophagy: paying Charon's toll *Cell.* 128:833–836.

Young, A.R.J., E.Y.W. Chan, X.W. Hu, R. Köchl, S.G. Crawshaw, S. High, D.W. Hailey, J. Lippincott-Schwartz, et S.A. Tooze. 2006. Starvation et ULK1-dependent cycling of mammalian Atg9 between the TGN et endosomes *J Cell Sci.* 119:3888–3900.

Young, J.E., R.A. Martinez, et A.R. La Spada. 2009. Nutrient deprivation induces neuronal autophagy et implicates reduced insulin signaling in neuroprotective autophagy activation *J Biol Chem.* 284:2363–2373.

Young, J.E., et A.R. La Spada. 2009. Development of selective nutrient deprivation as a system to study autophagy induction et regulation in neurons *Autophagy.* 5:555–557.

Yousefi, S., R. Perozzo, I. Schmid, A. Ziemiecki, T. Schaffner, L. Scapozza, T. Brunner, et H. Simon. 2006. Calpain-mediated cleavage of Atg5 switches autophagy to apoptosis *Nat Cell Biol.* 8:1124–1132.

Yu, L., A. Alva, H. Su, P. Dutt, E. Freundt, S. Welsh, E.H. Baehrecke, et M.J. Lenardo. 2004a. Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8 *Science.* 304:1500–1502.

Yu, L., F. Wan, S. Dutta, S. Welsh, Z. Liu, E. Freundt, E.H. Baehrecke, et M. Lenardo. 2006. Autophagic programmed cell death by selective catalase degradation *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:4952–4957.

Yu, W.H., A. Kumar, C. Peterhoff, L. Shapiro Kulnane, Y. Uchiyama, B.T. Lamb, A.M. Cuervo, et R.A. Nixon. 2004b. Autophagic vacuoles are enriched in amyloid precursor protein-secretase activities: implications for beta-amyloid peptide over-production et localization in Alzheimer's disease *Int J Biochem Cell Biol.* 36:2531–2540.

Yu, W.H., A.M. Cuervo, A. Kumar, C.M. Peterhoff, S.D. Schmidt, J. Lee, P.S. Mohan, M. Mercken, M.R. Farmery, L.O. Tjernberg, Y. Jiang, K. Duff, Y. Uchiyama, J. Näslund, P.M. Mathews, A.M. Cataldo, et R.A. Nixon. 2005. Macroautophagy--a novel Beta-amyloid peptide-generating pathway activated in Alzheimer's disease *J Cell Biol.* 171:87–98.

Yue, Z., S. Jin, C. Yang, A.J. Levine, et N. Heintz. 2003. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:15077–15082.

Yue, Z., Q. Wang, et M. Komatsu. 2008. Neuronal autophagy: going the distance to the axon. *Autophagy.* 4:94–96.

Yuga, M., K. Gomi, D.J. Klionsky, et T. Shintani. 2011. Aspartyl aminopeptidase is imported from the cytoplasm to the vacuole by selective autophagy in *Saccharomyces cerevisiae* *J Biol Chem.*

Yumoto, S., S. Kakimi, A. Ohsaki, et A. Ishikawa. 2009. Demonstration of aluminum in amyloid fibers in the cores of senile plaques in the brains of patients with Alzheimer's disease *J. Inorg. Biochem* 103:1579–1584.

Yuzaki, M. 2010. Snapin snaps into the dynein complex for late endosome-lysosome trafficking et autophagy *Neuron.* 68:4–6.

Zalckvar, E., H. Berissi, L. Mizrachy, Y. Idelchuk, I. Koren, M. Eisenstein, H. Sabanay, R. Pinkas-Kramarski, et A. Kimchi. 2009a. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL et induction of autophagy *EMBO Rep.* 10:285–292.

Zalckvar, E., H. Berissi, M. Eisenstein, et A. Kimchi 2009b. Phosphorylation of Beclin 1 by DAP-kinase promotes autophagy by weakening its interactions with Bcl-2 et Bcl-XL *Autophagy.* 5:720–722.

Zaragoza, D., A. Ghavidel, J. Heitman, et M.C. Schultz. 1998. Rapamycin induces the G0 program of transcriptional repression in yeast by interfering with the TOR signaling pathway. *Mol Cell Biol.* 18:4463–4470.

Zatloukal, K., C. Stumptner, A. Fuchsichler, H. Heid, M. Schnoelzer, L. Kenner, R. Kleinert, M. Prinz, A. Aguzzi, et H. Denk. 2002. p62 Is a common component of cytoplasmic inclusions in protein aggregation diseases *Am J Pathol.* 160:255–263.

Zeng, Z., D.D. Sarbassov, I.J. Samudio, K.W.L. Yee, M.F. Munsell, C. Ellen Jackson, F.J. Giles, D.M. Sabatini, M. Andreeff, et M. Konopleva. 2007. Rapamycin derivatives reduce mTORC2 signaling et inhibit AKT activation in AML *Blood.* 109:3509–3512.

Zhang, C., et A.M. Cuervo. 2008. Restoration of chaperone-mediated autophagy in aging liver improves cellular maintenance et hepatic function. *Nat Med.* 14:959–965.

Zhang, H., C. Zhong, L. Shi, Y. Guo, et Z. Fan. 2009a. Granulysin induces cathepsin B release from lysosomes of target tumor cells to attack mitochondria through processing of bid leading to Necroptosis *J. Immunol* 182:6993–7000.

Zhang, J., C. Peng, H. Shi, S. Wang, Q. Wang, et J. Wang. 2009b. Inhibition of autophagy causes tau proteolysis by activating calpain in rat brain *J Alzheimers Dis.* 16:39–47.

Zhang, X., L. Li, S. Chen, D. Yang, Y. Wang, X. Zhang, Z. Wang, et W. Le. 2011. Rapamycin treatment augments motor neuron degeneration in SOD1 (G93A) mouse model of amyotrophic lateral sclerosis *Autophagy.* 7.

Zhao, M., et D.J. Klionsky. 2011. AMPK-dependent phosphorylation of ULK1 induces autophagy *Cell Metab.* 13:119–120.

Zheng, Y.T., S. Shahnazari, A. Brech, T. Lamark, T. Johansen, et J.H. Brummel. 2009. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway *J. Immunol* 183:5909–5916.

Zhou, B., Y. Zhu, L. Lin, Q. Cai, et Z. Sheng. 2011. Snapin deficiency is associated with developmental defects of the central nervous system *Biosci. Rep* 31:151–158.

Zhou, J., H.T. Pham, et G. Walter. 2003. The formation et activity of PP2A holoenzymes do not depend on the isoform of the catalytic subunit *J Biol Chem.* 278:8617–8622.

Zhu, X., H. Lee, A.K. Raina, G. Perry, et M.A. Smith. 2002. The role of mitogen-activated protein kinase pathways in Alzheimer's disease *Neurosignals*. 11:270–281.

Zhu, Y., L. Zhao, L. Liu, P. Gao, W. Tian, X. Wang, H. Jin, H. Xu, et Q. Chen. 2010. Beclin 1 cleavage by caspase-3 inactivates autophagy et promotes apoptosis *Protein Cell*. 1:468–477.

GLOSSAIRE

- Adaptateur autophagique* : Protéine qui permet le recrutement spécifique d'un substrat en vue de sa séquestration dans l'autophagosome en cours de formation. Ce type de protéine possède obligatoirement un domaine de liaison à LC3 (LIR) et souvent un autre domaine permettant la reconnaissance du substrat comme par exemple le domaine UBA dans le cas de p62/SQSTM1. Parfois, ce terme désigne un autre type protéique chargé du recrutement du complexe formé par le récepteur autophagique couplé au substrat vers le site de formation de l'autophagosome (voir récepteur autophagique).
- Agrégopathies* : Pathologies dégénératives caractérisées par l'agrégation de protéines anormales.
- Agréphagie* : Dégradation spécifique d'agrégats protéiques par autophagie. La formation des agrégats semble être régulée.
- Agrésome* : Les agrésomes sont des inclusions protéiques périnucléaires en principe transitoires (et péricentriolaires) ubiquitinylées. Leur formation, probablement cytoprotectrice, est régulée par des protéines dont la fonction se situe à l'interface entre autophagie et SUP et conduit à la dégradation des protéines contenues dans ces agrégats. Les agrésomes s'accumulent en cas de stress cellulaire tels qu'une inhibition de l'une ou l'autre des voies cataboliques majeures, ou par exemple suite à un stress protéotoxique, oxydatif ou nutritionnel.
- ALIS / corps p62* : Agrégats protéiques positifs pour l'ubiquitine et p62 qui sont formés suite à des stress cellulaires tels qu'une privation en acides aminés, un stress oxydatif, ou encore suite à l'inhibition de l'autophagie. Voir aussi «Séquestosome»
- Amphisome* : Du grec *amphi* les deux et *soma le corps*. Organite vacuolaire non-lysosomal qui contient du matériel issu de la séquestration autophagique et de la séquestration endosomale.
- Autolysosome* : Vésicule lysosomale résultant de la fusion terminale entre des autophagosomes ou des amphisomes avec des lysosomes.
- Autophagie* : Voie de dégradation eucaryote où le substrat, d'origine généralement intracellulaire, est dégradé dans la vacuole (levures) ou dans les lysosomes.
- Autophagolysosome* : Synonyme d'autolysosome. Autophagosome ayant subi l'étape de maturation et dont la lumière contient les enzymes lysosomales et où la dégradation du matériel séquestré a d'ores et déjà débuté.
- Autophagosome* : Nom donné à la vésicule autophagique
- Cargo (= charge)* : Matériel cytoplasmique séquestré par l'autophagosome en formation - contenu autophagosomal

<i>Clastosome</i> :	Egalement appelés PML-NBs pour <i>ProMyelocytic Leukemia Nuclear Bodies</i> , ce sont des régions du nucléoplasme dédiées à la protéolyse par le protéasome ; ils semblent avoir une nature transitoire. Leur assemblage est modulé par l'apport de substrats protéasomiaux et leur nombre augmente en cas de stress protéotoxique.
<i>Corps (endosomes) multivésiculaires (MVBs)</i> :	Endosome mature accumulant dans sa lumière d'autres vésicules contenant une protéine substrat. Classiquement, ces MVBs fusionnent avec les lysosomes en vue de la dégradation de leur contenu. Cependant, dans des cellules spécialisées comme les précurseurs des hématies, ceux-ci peuvent se comporter comme des exosomes en fusionnant avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu à l'extérieur de la cellule.
<i>Degron</i>	<i>degradative signal</i> - Motif exposé dans une protéine instable permettant sa reconnaissance par une enzyme E3 et l'ubiquitinylation subséquente de cette protéine.
<i>Démence</i>	Syndrome neurologique correspondant à une diminution des capacités mentales (déclin des fonctions cognitives) pouvant avoir une cause organique.
<i>Domaine coiled-coil (CC)</i> :	Domaine d'interaction protéine-protéine, important dans la formation de certains complexes
<i>Domaine WD40</i>	Ce sont des domaines conservés constitués par une quarantaine d'acides aminés dont les deux derniers sont le tryptophane (W) et l'acide aspartique (D). Les protéines exhibant ce motif ont une fonction de régulation de l'assemblage de complexes multi-protéiques en permettant, grâce à ce domaine, des interactions protéine-protéine simultanées et réversibles.
<i>Dysarthrie</i>	Troubles de la parole causés par une dysfonction des muscles impliqués dans ce processus
<i>Exophagie</i>	Modèle hypothétique d'un processus de sécrétion protéique non-conventionnel mettant en jeu l'autophagie (spécifique) et la fusion des autophagosomes avec des endosomes. Les amphisomes résultant (ou exosomes) ne fusionneront pas avec les lysosomes mais avec la membrane plasmique pour l'excrétion des protéines concernées.
<i>Foldopathies</i>	De l'anglais <i>to fold</i> , replier, synonyme d'agrégopathie et de protéinopathie.
<i>Gènes Atg</i>	Gènes possédant une fonction nécessaire au bon fonctionnement de l'autophagie et possédant un homologue appartenant à la nomenclature « Atg » chez les eucaryotes unicellulaires. ex : Beclin-1 (Atg6 pour la levure).
<i>GRAM</i>	Domaine d'interaction avec le PI(3,5)P ₂
<i>Inclusions protéiques</i>	zones intracellulaires à l'intérieur desquelles des oligomères de protéines anormalement repliés sont séquestrés.

<i>Membrane d'isolement</i>	Membrane à l'origine de l'autophagosome. L'origine de cette membrane est très mal connue et est toujours matière à controverse bien que des hypothèses aient été émises à ce sujet.
<i>Mitophagie</i>	Dégradation spécifique de mitochondrie par autophagie.
<i>N-glycosylation</i>	La N-glycosylation consiste au transfert d'un groupement glucidique composé de 14 sucres liés à un dolichol phosphate, enchâssé dans la membrane du RE, au groupement NH ₂ d'un résidu asparagine appartenant à une séquence consensus particulière (Asn-X-Ser/Thr) de la protéine cible. Ce groupement est composé de deux N-acétylglucosamines, neuf mannoses et de trois glucoses. Deux résidus glucoses sont retirés permettant ainsi la reconnaissance de la protéine par un système basé sur des chaperons protéiques dépendants du calcium de type lectine : la calnexine et la calréticuline qui permettent à la protéine de se replier correctement. A ce stade, le troisième résidu glucose est retiré et la protéine pourra alors être adressée à l'appareil de Golgi. Si la protéine est repliée de manière incorrecte, une enzyme, la UGGT (UDP-glucose Glycosyl GlucoTransférase) va greffer un résidu glucose pour que la protéine défectueuse soit de nouveau prise en charge par la calnexine et la calréticuline. Si après deux passages dans ce cycle, la protéine a toujours une conformation anormale, elle est ubiquitinylée et dégradée par le protéasome grâce à l'intervention du complexe ERAD (<i>ER Associated Degradation</i> , dégradation associée au RE).
<i>Omégasome</i>	Structures membranaires particulières en continuité avec le réticulum endoplasmique contenant du phosphatidylinositol-3-phosphate, et permettant le recrutement des protéines nécessaires à la formation autophagosomale et la formation de l'autophagosome.
<i>SPA (PAS)</i>	<i>Pre-autophagosomal structure</i> ; structure pré-autophagosomale. Site d'assemblage de l'autophagosome chez la levure où sont recrutés tous les acteurs moléculaires nécessaires à l'accomplissement de ce processus. Egalement appelé <i>Phagophore Assembly Structure</i> chez les mammifères où le site de nucléation de la membrane d'isolement, ou phagophore, est structurellement différent de celui des eucaryotes inférieurs.
<i>Pexophagie</i>	Dégradation spécifique des péroxisomes par autophagie. Chez la levure, ce mécanisme fait appel à des protéines et des mécanismes spécifiques qui diffèrent de la macroautophagie induite par une privation nutritionnelle.
<i>Phagophore</i>	Il est spécifique aux eucaryotes supérieurs et correspond à la membrane d'isolement. Aujourd'hui cette notion a été affinée avec la découverte de l'existence des omégasomes en 2008.
<i>PND</i>	Pathologies neurodégénératives, ce sont des affections du SNC caractérisées par une perte neuronale (causant des déficits cognitifs et/ou fonctionnels) et par l'accumulation d'espèces protéiques anormales au sein d'inclusions intra- ou extra-cellulaires, d'où l'utilisation des termes de protéinopathies, de foldopathies ou encore d'agrégopathies.

<i>Protéines Rab</i>	Petites GTPases sous forme monomérique responsables de la régulation spatiale et temporelle du trafic vésiculaire de la cellule. Elles lient le GDP ou le GTP avec la même affinité mais leur domaine catalytique présente une activité trop lente pour permettre une hydrolyse efficace du GTP en GDP. Alors, les Rabs nécessitent l'intervention de deux familles de protéines : les GEFs (<i>Guanosine Exchange Factor</i>) permettant le pAβage d'une forme liée au GDP à une forme liée au GTP et les GAPs (<i>GTPases Activating proteins</i>) hydrolysent le GTP en GDP. L'interaction des Rab avec les GAPs est régulé de manière spatio-temporelle. Les Rab peuvent être modifiées par la greffes de groupes géranyl-géranyl impliqués dans leur association avec des structures membranaires. Chaque membre de la famille Rab est spécifique d'un type de vésicule et de transport. Par exemple Rab5 est un marqueur des endosomes précoces et sera échangé avec Rab7 auxquels elle est associé. Rab7 est également retrouvée au niveau des lysosomes.
<i>Protéinopathie</i>	Pathologies liées à la présence de protéines anormales ayant propension à s'agrèger.
<i>Protéostasie</i>	Contraction de « protéine » et de « homéostasie », ce néologisme définit le concept de maintien de l'intégrité du protéome. Ce terme, créé à la fin des années 2000, permet d'apporter un nouvel éclairage sur la physiologie cellulaire et dont les dysfonctionnements conduisent à un certain nombre de pathologies ayant en commun la présence de protéines anormales qui, dans la majorité des cas, s'agrègent et causent le déclin des cellules atteintes.
<i>Récepteur autophagique</i>	Ce terme est souvent utilisé pour désigner un adaptateur autophagique mais certains auteurs font une distinction entre récepteur et adaptateur, où, dans ce cas le récepteur est l'adaptateur et le terme adaptateur désigne la protéine qui permet le recrutement du complexe récepteur-substrat au niveau du site de formation de l'autophagosomes.
<i>Réticulophagie</i>	Dégradation spécifique de portions du réticulum endoplasmique par autophagie.
<i>Ribophagie</i>	Dégradation spécifique des ribosomes par autophagie.
<i>Séquestosome</i>	Nom donné à la protéine p62 du fait de sa capacité à former des agrégats. C'est également le nom donné à des structures appelées corps p62 (p62 bodies) qui correspondent à des agrégats protéiques contenant p62 s'accumulant suite à des anomalies du processus autophagique.
<i>Spasticité</i>	Raideur musculaire causée par la dégénérescence des neurones moteurs supérieurs
<i>Xénophagie</i>	Dégradation autophagique spécifique de pathogènes intracellulaires.

ANNEXES

Tableau 1 : Gènes nécessaires à l'accomplissement de l'autophagie

Protéines (<i>S. cerevisiae</i> ou <i>P. pastoris</i>) (Mixtes, voie autophagique, voie CVT, peyophagie)	Homologues (<i>H. sapiens</i>) paralogues, fonctionnels, homologue faible mais même fonction)	Interactions	Etape (s)	Fonction(s)	Modulation de l'expression, modèles murins, Dm : drosophile, Ce : <i>C. elegans</i>	Domaines importants	Pathologies humaines	Références
Atg1 (Apg1)	ULK1-3	FIP200 Atg13	1	S/T kinase Recrutement des protéines nécessaires à l'assemblage de la SPA et régulation de la cinétique du mouvement des protéines Atg dans et hors de la SPA Croissance axonale	Maturation réticulocytaire retardée Dm Atg1(KO) : Faillite de la dégradation des glandes salivaires, si surexpression : induction de la mort cellulaire indépendante des caspases Ce : Unc-51 (KO) : défaut des axones, altération de la fonction motrice neuronale Souris : anomalies de la croissance axonale et de la différenciation neuronale, légère splénomégalie	Domaine kinase	-	Kamada et al., 2000, Matsunura et al., 1997, Chan et Neufeld 2009 ; Sekito et al., 2009 ; Mizushima, 2010 ; Di Bartolomeo et al., 2010b, Kundu et al., 2008
Atg2	Atg 2A et B	Atg18 Atg9	2	Adressage d'Atg18 à la SPA Recrutement des protéines nécessaires à l'assemblage de la PAS, trafic d'Atg9 Pas de fonction connue chez l'humain	Dm Atg2 (KO) : absence de dégradation des glandes salivaires, élimination des cellules apoptotiques dans l'intestin moyen	-	-	Calvo-Garrido et al., 2010
Atg3	Atg3	Atg12-Atg5 et LC3	2 et 3	E2-like	Accumulation de phagophores de longueur anormale Dm Atg3 : faillite de la dégradation des glandes salivaires lors de la morphogénèse Souris : KO léthal (période périnatale)	LIR	-	Sou et al., 2008 ; Noda et al., 2010

Tableau 1 : Gènes nécessaires à l'accomplissement de l'autophagie

Protéines (<i>S. cerevisiae</i> ou <i>S. pombe</i> ou <i>P. pastoris</i>) (Mixtes, voie autophagique, voie CVT, peyophagie)	Homologues (<i>H. sapiens</i>) paralogues, fonctionnels, homologie faible mais même fonction)	Interactions	Etape (s)	Fonction(s)	Modulation de l'expression, modèles murins, Dm : drosophile, Ce : <i>C. elegans</i>	Domaines importants	Pathologies humaines	Références
Atg4	Atg4 (A,B,C,D)	Atg8 res mammalie	2,3 et 5	Protéase à cystéine Clivage activateur des homologues d'Atg8 Délipidation	Atg4 cataboliquement inactif : accumulation de phagophores KO Atg4C : anomalies diaphragmatiques, susceptibilité accrue au développement de fibrosarcomes induits par des substances chimiques. KO Atg4B : anomalies de l'oreille interne (absence de la formation des otolithes) Souris : KO létal (période périnatale) KO conditionnel dans le foie et le cerveau : dégénérescence cellulaire associée à la présence d'inclusions intracellulaires de protéines polyubiquitinylées KO conditionnel dans le cœur : déficience cardiaque associée à une hypertrophie du myocarde DmAtg6 (KO) : létal au stade larvaire Ce : Bec-1 (KO) : létal au stade larvaire	LIR	-	Fujiita et al., 2008, Noda et al., 2009, Mariño et al., 2010
Atg5	Atg5	Atg12 Atg16	2 et 3	Recrutement de Atg8/LC3, spécification du site de lipidation, E3-like			-	Mizushima et al., 1998, Hara et al., 2006, Nakai et al., 2007
Atg6 (Vps30)	Bec1n1	534, Vps15, Ambra	2 à 5?	Complexe PI3K		CC, BH3	Cancers du sein et de la prostate	Aita et al., 1999 ; Liang et al., 2001 Yue et al., 2003

Tableau 1 : Gènes nécessaires à l'accomplissement de l'autophagie

Protéines (S. cerevisiae ou P. pastoris) (Mixtes, voie autophagique, voie CVT, peyophagie)	Homologues (H. sapiens) paralogues, fonctionnels, homologue faible mais même fonction)	Interactions	Etape (s)	Fonction(s)	Modulation de l'expression, modèles murins, Dm : drosophile, Ce : C. elegans	Domaines importants	Pathologies humaines	Références		
Atg7	Atg7		2 et 3	E1-like	<p>Souris : KO : léthal (période périnatale) KO conditionnel tissu-spécifique (foie et SNC) : développement de pathologies dégénératives associées à la formation d'agrégats de protéines polyubiquitylées.</p> <p>Effet totallement (foie) ou partiellement réversé (SNC) par la suppression de l'expression de p62</p> <p>KO conditionnel dans les cellules de Purkinje : dégénérescence axonale, ataxie progressive à début tardif, inclusions et mortalité accrue.</p> <p>KO conditionnel : muscles squeletiques : atrophie, perte de la force musculaire, accumulation d'inclusions protéiques positives pour p62 et l'ubiquitine et de mitochondries endommagées</p> <p>KO conditionnel dans les cellules β pancréatiques : perte de la tolérance au glucose, augmentation de la mort cellulaire en réponse au régime riche en lipides, inclusions</p> <p>KO conditionnel dans les cellules hématopoïétiques : défauts de la dégradation mitochondriale (réticulocytes), anémie sévère, lymphopénie et mortalité accrue</p> <p>KO conditionnel dans le tissu adipeux : corps d'inclusion dans les adipocytes, augmentation de la quantité de tissu adipeux brun et diminution du tissu adipeux blanc</p> <p>DdAtg7 (KO) : adultes hypersensibles au stress - longévité réduite - accumulation d'agrégats polyubiquitylés dans des neurones en dénérescence</p>					<p>Komatsu et al., 2006, 2007, Marinho et al., 2010</p>

Tableau 1 : Gènes nécessaires à l'accomplissement de l'autophagie

	Protéines (<i>S. cerevisiae</i> ou <i>S. pombe</i> ou <i>P. pastoris</i>) (Mixtes, voie autophagique, voie CVT, peyophagie)	Homologues (<i>H. sapiens</i>) paralogues, fonctions, homologie faible mais même fonction)	Interactions	Etape (s)	Fonction(s)	Modulation de l'expression, modèles murins, Dm : drosophile, Ce : <i>C. elegans</i>	Domaines importants	Pathologies humaines	Références
Atg8 (<i>aur7</i>)	MAP-1C3 ARAP-11 ; GAB1	protéines comportant la LIR/LRS, tubi	2 à 4	protéine <i>ubiquitin-like</i> Abordage et héli-fusion entre membranes autophagosomales	KO (mammifères) non pertinent du fait de l'existence de nombreux paralogues avec une activité compensatoire (cf Atg4) Ce : Igg-1 (KO) : létal au stade larvaire	Repl. Ub	-	Kabaya et al., 2000 ; Bavro et al., 2002 ; Sugawara et al., 2004 ; Cherra et al., 2010, Jang et al., 2010	
Atg9	Atg9A et B	Atg17, Atg11,	2 et 3	Protéine transmembranaire Recrutement de portions membranaires pour l'élongation du phagophore Protéine extrêmement dynamique (cyclante)	Souris : KO létal après la naissance	-	-	Reggiori et al., 2005, Sekito et al., 2009	
Atg10	Atg10	Atg12, Atg5, LC	2 et 3	<i>E2-like</i> protéine <i>myosin-like</i> Fonction restreinte aux formes spécifiques de l'autophagie chez la levure : voie CVT, peyophagie et mitochondrie. Recrutement du chargement vers la SPA. Peut compenser l'absence d'Atg17 au cours de l'autophagie induite	pour les souris, voir à Atg17	4 CC	-	Shintani, 1999, Nemoto et al., 2003	
Atg11 (CVT9)	FIP200 ?	Atg19 Atg11 Atg9 Atg29 Atg31 Atg1 Atg12 Atg20	2 et 3	Protéine <i>ubiquitin-like</i> recrutement de Atg8/LC3, spécification du site de lipidation et E3-like		Repl. Ub	-	Mizushima et al., 1998,	
Atg12 (Apg12)	Atg12	Atg5, Atg3, Atg7, Atg10	2 et 3						
Atg13	Atg13, 3 variants issus de l'épissage alternatif du transcrit	ULK1/2 FIP200	1	Initiation de l'autophagie				Jung et al., 2009, Hosokawa et al., 2009	

Tableau 1 : Gènes nécessaires à l'accomplissement de l'autophagie

Protéines (<i>S. cerevisiae</i> ou <i>S. pombe</i> ou <i>P. pastoris</i>) (Mixtes, voie autophagique, voie CVT, peyovphagie)	Homologues (<i>H. sapiens</i>) paralogues, fonctionnels, homologue faible mais même fonction)	Interactions	Etape (s)	Fonction(s)	Modulation de l'expression, modèles murins, Dm : drosophile, Ce : <i>C. elegans</i>	Domaines importants	Pathologies humaines	Références
Atg14	BAR KOR	complexe eclin-I/hVPS:	1	Recrute le complexe PI3kinase spécifique de l'autophagie au niveau du site de formation de l'autophagosome		3 CC, dom. d'adress. au RE	-	Matsunaga et al, 2009, Sun et al., 2009, Matsunaga et al., 2010
Atg15 (Aut5/ Cvt17)	-	-	5	Lipase, «secrétophagie»	Levures, réduction de la longévité		-	Eskeinen, 2005, Tang et al., 2008
Atg16	ATG16-L	complexe Atg12-Atg5	2 et 3	complexe Ubl, recrutement de Atg8/LC3, spécification du site de lipidation et E3-like	Souris : KO léthal (période périnatale)	CC WD40	Maladie de Crohn	Cabrera et al., 2010a
Atg17	FIP200 ? (=RB1CC1) Atg101 ?	Atg29, Atg31 ULK1/2 Atg13 Atg20	1	Chez la levure, formation de la SPA en conditions de privation nutritionnelle Atg17 uniquement nécessaire à l'autophagie non-spécifique chez la levure. FIP200 intervient dans le complexe avec ULK1 et Atg13 dans l'initiation du processus autophagique	Souris : KO conditionnel dans le SNC : dégénérescence neuronale sévère) avec accumulation de mitochondries altérées et d'inclusions protéiques positives pour p62 et l'ubiquitine KO : léthal		-	Liang et al., 2009, Hosokawa et al 2009b, Cheong et Klionsky, 2008 Wei et al., 2009, Mercer et al., 2010, Hatsumata et al., 2010
Atg18	WPI1, WPI2	Atg2	2	Liaison au PI(3)P Recrutement des protéines nécessaires pour la formation de la SPA/du phagophore Protection d'Atg8-PE vis-à-vis du clivage par Atg4	Dm Atg18 (KO) : léthal au stade larvaire ; faillite de l'élimination des cellules mourantes dans l'intestin moyen au cours de la métamorphose Ce Atg18 : léthal au stade larvaire	WD40, FYVE (levure : FTTG)	Régulé de manière aberrante dans certaines tumeurs	Obara et al., 2008 Di Bartolomeo et al., 2010b Nair et al., 2010, Proikas-Cezanne et al., 2004
Atg19 (Cvt19)	-	-	1 & 2	Récepteur autophagique, reconnaît pr Ape1		ABD CC LIR	-	Shintani et al., 2002, Nakatogawa et al., 2009

Tableau 1 : Gènes nécessaires à l'accomplissement de l'autophagie

Protéines (<i>S. cerevisiae</i> ou <i>S. pombe</i> ou <i>P. pastoris</i>) (Mixtes, voie autophagique, voie CVT, peyophagie)	Homologues (<i>H. sapiens</i>) paralogues, fonctionnels, homologue faible mais même fonction)	Interactions	Etape (s)	Fonction(s)	Modulation de l'expression, modèles murins, Dm : drosophile, Ce : <i>C. elegans</i>	Domaines importants	Pathologies humaines	Références
Atg20		Atg11 Atg24 Atg17		Nexine recrutement du chargement CVT au niveau de la SPA à travers l'interaction avec Atg11.		PX		Kraft et al., 2009, Manjithaya et al., 2010
Atg21	WIP12 ? homologue d'Atg18	Atg2	2 et 3	Compense l'absence d'Atg18, prédominant pour la voie CVT et la macropexophagie (<i>H. polymorpha</i>) Liaison au PI(3)P Recrutement des protéines nécessaires pour la formation de la SPA/du phagophore Protection d'Atg8-PE vis-à-vis du clivage par Atg4		WD40, FYVE (levure : FTTG)	Expression réduite dans certains cancers rénaux et pancréatiques	Leão-Helder et al., 2004 Nair et al., 2010, Protkas-Cezanne et al., 2004
Atg22	-		5	perméase (efflux d'aa de la vacuole vers le cytosol)			-	Yang et al., 2006, Yang et Klionsky, 2007
Atg23	-	Atg9		Essentiel pour la voie CVT ; interagit avec Atg9, participerait au recrutement de portions membranaires en participant au recrutement d'Atg9 à la SPA			-	Legakis et al., 2007, Sekito et al., 2009
Atg24	hAtg24	Atg20	4	Nexine Fonction inconnue chez les mammifères		PX	-	Ano et al., 2005 ; Manjithaya et al., 2010
Atg25	H.polymorpha			Macropexophagie, pas d'homologue mammalien			-	Sakai et al., 2006

Tableau 1 : Gènes nécessaires à l'accomplissement de l'autophagie

	Protéines (<i>S. cerevisiae</i> ou <i>P. pastoris</i>) (Mixtes, voie autophagique, voie CVT, pexophagie)	Homologues (<i>H. sapiens</i>) paralogues, fonctionnels, homologue faible mais même fonction)	Interactions	Etape (s)	Fonction(s)	Modulation de l'expression, modèles murins, Dm : drosophile, Ce : <i>C. elegans</i>	Domaines importants	Pathologies humaines	Références
Atg26 (Pp)	-	-			Sterol glucosyl transférase Est nécessaire pour la pexophagie chez <i>P. pastoris</i> mais dans aucune voie autophagique chez <i>S. cerevisiae</i> .		GRAM	-	Nazaruko et al., 2009 Cao et Klionsky, 2007
Atg27	-	-	Atg9	2 et 3	Protéine transmembranaire. Participe au trafic cyclant de Atg9		PX ou FYVE	-	Legakis et al., 2007, Sekito et al., 2009
Atg28 (Pp)	-	-	Atg35				CC	-	Stasyk et al., 2006
Atg29	WIPI2 ?	Atg17	Atg17	2	Localisée à la SPA, impliquée dans le recrutement des protéines de la machinerie autophagique		WD40, CC	cf Atg21 et Atg18	Kawamata et al., 2009, Kabeya et al., 2009
Atg30 (Pp)	-	Atg17, Pex14, Pex3			Sélectivité de la reconnaissance du peroxyosome chez <i>Pichia pastoris</i> , (adaptation à la m a c h i n e r i e micropepoxophagique).		pas de LIR	-	Farré et al., 2008
Atg31	-	Atg17	Atg17	1			LIR	-	Kabeya et al., 2009
Atg32	Nix?	Atg8 LC3A GABARAPL1		4	Récepteur autophagique Mitochondrie, sélectivité du substrat	Souris : KO : anémie, altérations de la maturation érythrocytaire	LIR		Kanki et al., 2009 ; Moreau et al., 2010, Lamark et Johansen, 2010, Narendra et al., 2008, Sandoval et al., 2008, Novak et al., 2010
Atg33									Okamoto et al., 2009
Atg34	-	Ams1 Atg34 Atg8 Atg11		1 & 2	Récepteur autophagique, recrute Ams1 pour la voie CVT		CC LIR ABD	-	Suzuki et al., 2010 Watanabe et al., 2010

Tableau 1 : Gènes nécessaires à l'accomplissement de l'autophagie

Protéines (<i>S. cerevisiae</i> ou <i>S. pombe</i> ou <i>P. pastoris</i>) (Mixtes, voie autophagique, voie CVT, peyophagie)	Homologues (<i>H. sapiens</i>) paralogues, fonctionnels, homologues faibles mais même fonction)	Interactions	Etape (s)	Fonction(s)	Modulation de l'expression, modèles murins, Dm : drosophile, Ce : <i>C. elegans</i>	Domaines importants	Pathologies humaines	Références
Atg35 (Pp)	-	Atg28		Formation de l'appareil micropexophagique			-	Nazarcko et al., 2011
Mug66 (S.p.)	Atg1101 (SynGAP)	UKL1/2 FIP200 Atg13	1 & 2				Retard mental non-syndromique 5 (retard de développement de neurones moteurs,...) Variants associés à des formes d'autisme	Hosokawa, 2009b, Mercer et al., 2009
VPS15	p150	VPS34		Ser/Thr Kinase myristoylée Fonctionne dans le complexe PI3KIII	Drosophile : KO létal à la troisième étape larvaire		-	Lindmo et al., 2008 He et Klionsky, 2009
VPS38	UVRA3	complexe Beclin-1/hVPS34 Vps15	2 et 4	Complexe initiateur de la nucléation du phagosome ? Facilite la fusion autophagosomale	siRNA : inhibition de la fusion autophagosomale lysosomale	PR, C2, CC		Liang et al., 2006 ; Liang et al., 2007 ; Liang et al., 2008 a et b
VPS34	hVPS34	Atg6 /Beclin-1 Vps15	2 à 5?	PI3KIII, catalyse la formation de PI3P		C2 N-term		Kihara et al., 2001
-	Rubicon	complexe hVPS34, Vps15, Beclin-1				CC	-	Matsunaga et al., 2009, Zhong et al., 2009

Tableau 1 : Gènes nécessaires à l'accomplissement de l'autophagie

Protéines (<i>S. cerevisiae</i> ou <i>S. pombe</i> ou <i>P. pastoris</i>) (Mixtes, voie autophagique, voie CVT, peyophagie)	Homologues (<i>H. sapiens</i>) paralogues, fonctionnels, homologie faible mais même fonction)	Interactions	Etape (s)	Fonction(s)	Modulation de l'expression, modèles murins, Dm : drosophile, Ce : <i>C. elegans</i>	Domaines importants	Pathologies humaines	Références
-	AMBRA-1	complexe Beclin-1 hVPS34 DLC1, DLC-2	1 et 2	Promeut l'interaction de Beclin-1 avec hVPS34, permettrait le recrutement du complexe hVPS34-p150-Beclin1 au niveau du site de nucléation de l'autophagosome.	létal à E16,5, défauts majeurs du SNC	WD40		Fimia et al, 2007 ; Di Bartolomeo et al, 2010 ; Fimia et al., 2011
-	DFCP-1 (TAF1)	PI3P	2	Formation de l'omégasome		2 FYVE	-	Axe et al., 2008 ;
-	Jumpy (MTMR14)	PI3P	2 et 3	Phosphorylase à lipide Régulation négative de l'autophagie en déphosphorylant le PI3P	Souris : KO : faiblesse musculaire, augmentation de la fatigabilité.	FYVE	Myopathie centronucléaire	Shen et al., 2009, Vergne et al., 2009
-	p62	Atfy LC3(-II) ...	2	Adaptation de substrats ubiquitinylés dans le phagophore en formation.	obésité, résistance à l'insuline, KO conditionnel	PB1 LIR UBA TRAF6 ZZ PEST	Maladie de Paget des os	Laurin et al., 2002 Bjørkøy et al., 2005

Tableau I : Gènes nécessaires à l'accomplissement de l'autophagie

Tableau I : Gènes nécessaires à l'accomplissement de l'autophagie

Légende : étapes de l'autophagie dans lesquels interviennent les produits de ces gènes :

- 1- Initiation de l'autophagie*
- 2- Formation du phagophore et éventuellement sélection du substrat*
- 3- Elongation de la membrane d'isolement et formation de l'autophagosome*
- 4- Etapes de maturation (Fusion avec d'autres vésicules du système lysosomal, abaissement du pH luminal et acquisition des hydrolases acides)*
- 5- Dégénération et recyclage*

Synthèse des produits de gènes Atg essentiels à l'accomplissement de l'autophagie dans les organismes eucaryotes

Tableau 2 : Caractéristiques des principales pathologies neurodégénératives liées à l'âge et pour lesquelles des anomalies de l'autophagie ont été observées.

Pathologies	Type	Survenue	protéines impliquées	Protéines agrégées	Inclusions	Neurones/Région touchés	Perturbations de la voie autophagique
Maladie de Huntington	Répétitions CAG	Familliale (mutation autosomale dominante)	Huntingtine	Huntingtine (répétitions CAG (Q)>30)	inclusions intracellulaires	Striatum	Induction de l'autophagie associée à des anomalies de reconnaissance du chargement lors de sa séquestration spécifique dans les autophagosomes.
Ataxie cérébelleuse	Répétitions CAG	Familliale	Ataxine	Ataxine	inclusions nucléaires	Cervelet, tronc cérébral	Accumulation de vésicules autophagiques
Maladie de Pick/Démences fronto-temporales	Tauopathie	Sporadique, Familliale	tau, TDP-43	Tau, ubiquitine, TDP-43	DNFs, corps de Pick	neurones du cortex frontal	Induction compensatoire de l'autophagie, perturbations du transport axonal
Maladie de Niemann-Pick de type C	Maladie de surcharge lysosomale de type autophagique, tauopathie	Familliale	NPC, Tau	Tau	DNFs	SNC, foie, rate	Perturbations du métabolisme lipidique, du transport axonal, inhibition de l'autophagie par tau
FTDP-17	Tauopathie	Familliale	Tau	Tau, Ubiquitine, TDP-43	corps de Pick	neurones du cortex fronto-temporal	Induction compensatoire de l'autophagie, perturbations du transport axonal
Maladie d'Alzheimer	Tauopathie Amyloïdose Maladie lysosomale ?	Sporadique (99%) ou familiale (1%)	APP, PS1/2	Tau peptide A β	plaques séniles, DNFs	Neurones hippocampiques	Perturbations directes des voies autophagiques-lysosomales par un défaut d'acidification (mutations de PS1/2), perturbation du transport axonal, par la toxicité du peptide A β , anomalies du métabolisme lipidique, induction compensatoire de la macroautophagie suite à l'inhibition du protéasome et de la CMA, stress oxydatif et du RE,
Maladie de Machado-Joseph	Répétitions CAG	Familliale (mutation autosomale dominante)	Ataxine-3	Ataxine-3	inclusions cellulaires, agrégats axonaux	Cervelet	L'ataxine 3 mutante (gain de fonction toxique) régule la dégradation autophagique de la parkine
Maladies à Prion	Prion	Infectieuse familiale	Pr-P ^s	Prion, tau (formes génétiques), TDP-43 α -synucléine	agrégats extracellulaires et intraneuronaux	Dégénérescence spongiforme, neurones thalamique	Accumulation de vésicules autophagiques, surtout au niveau synaptique

Tableau 2 : Caractéristiques des principales pathologies neurodégénératives liées à l'âge et pour lesquelles des anomalies de l'autophagie ont été observées.

Pathologies	Type	Survenue	protéines impliquées	Protéines agrégées	Inclusions	Neurones/Région touchés	Perturbations de la voie autophagique
Maladie de Parkinson	Corps de Lewy	Sporadique ou familiale	α -synucleïne, Parkine, PINK-1	α -synucleïne	Corps de Lewy	neurones dopaminergiques de la substance noire	Anomalies de la mitophagie par des pertes de fonction des protéines de la voie Pink1/Parkine, induction compensatoire de l'autophagie suite à l'inhibition de la CMA par l' α -synucleïne mutée, inhibition de la macroautophagie par cette même protéine.
Sclérose Latérale Amyotrophique	Maladie des neurones moteurs	Sporadique ou familiale	SOD1, ALS2, dynéine, CHMPB2, TDP-43	SOD, TDP-43, tau, neurofilaments phosphorylés	Corps de Bunina, structures apparentées aux corps de Lewy	neurones moteurs	Anomalies du transport rétrograde axonale entraînant un blocage de la maturation autophagosomale (mutations d'ALS2 ou de la dynéine), perturbations de la maturation autophagique par défauts des voies de formations des MVBs (mutation de CHMP2B), stress oxydatif important (mutations de la SOD1)
Complexe démence-Parkinson de l'île de Guam	Maladie des neurones moteurs, démence de type parkinson, tauopathie	Sporadique, facteurs génétiques et environnementaux		SOD, TDP-43, tau, neurofilaments phosphorylés, A β , ubiquitine	DNFs, corps de Pick, plaques séniles, corps de Lewy	neurones moteurs néocortex	?

Tableau 2 : Caractéristiques des principales pathologies neurodégénératives liées à l'âge et pour lesquelles des anomalies de l'autophagie ont été observées.

available at www.sciencedirect.comwww.elsevier.com/locate/brainres
**BRAIN
RESEARCH**
Research Report

Inhibition of glycogen synthase kinase-3 β downregulates total tau proteins in cultured neurons and its reversal by the blockade of protein phosphatase-2A

Ludovic Martin^a, Amandine Magnaudeix^a, Françoise Esclaire^{a,b},
Catherine Yardin^{a,b}, Faraj Terro^{a,b,*}

^aGroupe de Neurobiologie Cellulaire-EA3842 Homéostasie cellulaire et pathologies, Faculté de Médecine 2, rue du Dr Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX-France

^bLaboratoire d'Histologie et de Cytogénétique-Hôpital de la Mère et de l'Enfant 8, avenue D. Larrey, 87042 Limoges CEDEX-France

ARTICLE INFO
Article history:

Accepted 17 November 2008

Available online 30 November 2008

Keywords:

Lithium

Glycogen synthase kinase-3 β

Tau

Protein phosphatase-2A

Protein phosphatase-2B

Alzheimer's disease

ABSTRACT

In tauopathies such as Alzheimer's disease (AD), the molecular mechanisms of tau protein aggregation into neurofibrillary tangles (NFTs) and their contribution to neurodegeneration remain not understood. It was recently demonstrated that tau, regardless of its aggregation, might represent a key mediator of neurodegeneration. Therefore, reduction of tau levels might represent a mechanism of neuroprotection. Glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) and protein phosphatase-2A (PP2A) are key enzymes involved in the regulation of tau phosphorylation, and have been suggested to be involved in the abnormal tau phosphorylation and aggregation in AD. Connections between PP2A and GSK3 β signaling have been reported. We have previously demonstrated that exposure of cultured cortical neurons to lithium decreased tau protein expression and provided neuroprotection against A β . Since lithium is not a specific inhibitor of GSK3 β (ID50=2.0 mM), whether or not the lithium-induced tau decrease involves GSK3 β remained to be determined. For that purpose, cultured cortical neurons were exposed to 6-bromo-indirubin-3'-oxime (6-BIO), a more selective and potent GSK3 β inhibitor (ID50=1.5 μ M) or to lithium. Analysis of tau levels and phosphorylation by western-blot assays showed that lithium and 6-BIO dose-dependently decreased both tau protein levels and tau phosphorylation. Conversely, inhibition of cyclin-dependent kinase-5 (CDK5) by roscovitine decreased phosphorylated tau but failed to alter tau protein levels. These data indicate that GSK3 β might be selectively involved in the regulation of tau protein levels. Moreover, inhibition of PP2A by okadaic acid, but not that of

* Corresponding author. Unité de Neurobiologie Cellulaire, EA3842 Homéostasie cellulaire et pathologies-Faculté de Médecine-2, rue du Dr Raymond Marcland-87025 Limoges CEDEX-France. Fax: +33 5 55 43 58 93.

E-mail address: faraj.terro@unilim.fr (F. Terro).

Abbreviations: (MAP), microtubule-associated protein; (AD), Alzheimer's disease; (A β), amyloid peptide; (GSK3 β), glycogen synthase kinase-3 β ; (PP2A), protein phosphatase-2A; (S9), serine 9; (Y216), tyrosine 216; (NFTs), neurofibrillary tangles; (SAM), senescence-accelerated mouse; (Y307), tyrosine 307; (KO), knock-out; (NMDA), N-methyl-D-aspartate; (6-BIO), 6-bromo-indirubin-3'-oxime; (OKA), okadaic acid; (PP2B), protein phosphatase-2B; (CDK5), cyclin-dependent kinase-5

0006-8993/\$ – see front matter © 2008 Elsevier B.V. All rights reserved.

doi:10.1016/j.brainres.2008.11.057

The New Indirubin Derivative Inhibitors of Glycogen Synthase Kinase-3, 6-BIDECO and 6-BIMYEO, Prevent Tau Phosphorylation and Apoptosis Induced by the Inhibition of Protein Phosphatase-2A by Okadaic Acid in Cultured Neurons

Ludovic Martin,¹ Amandine Magnaudeix,¹ Cornelia Wilson,^{1,2} Catherine Yardin,^{1,2} and Faraj Terro^{1,2*}

¹Groupe de Neurobiologie Cellulaire, EA3842 Homéostasie cellulaire et pathologies, Faculté de Médecine, Limoges, France

²Laboratoire d'Histologie et de Cytogénétique, Hôpital de la Mère et de l'Enfant, Limoges, France

Alterations in glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β) and protein phosphatase-2A (PP2A) have been proposed to be involved in the abnormal tau phosphorylation and aggregation linked to Alzheimer's disease (AD). Interconnections between GSK3 β and PP2A signaling pathways are well established. Targeting tau kinases was proposed to represent a therapeutic strategy for AD. However, which tau kinases should be blocked and to what extent, keeping in mind that kinases have physiological roles? Because most kinase inhibitors are relatively specific and many of them interfere with the cell cycle, it is necessary to develop more specific tau kinase inhibitors devoid of cell toxicity. Here, we used the PP2A inhibition by okadaic acid (OKA) in primary cultured cortical neurons as an *in vitro* model of increased tau phosphorylation and apoptosis. We tested the effects of two newly characterized indirubin derivative inhibitors of GSK3, 6-BIDECO (6-bromoindirubin-3'-[O-(N,N-diethylcarbamyl)-oxime] and 6-BIMYEO (6-bromoindirubin-3'-[O-(2-morpholin-1-ylethyl)-oxime] hydrochloride) on OKA-induced tau phosphorylation and neuronal apoptosis. Both compounds, which exhibit higher selectivity toward GSK3 compared with other tau kinases (for 6-BIDECO, IC₅₀ is 0.03 μ M for GSK3, >10 μ M for CDK1, and 10 μ M for CDK5; for 6-BIMYEO, IC₅₀ is 0.11 μ M for GSK3, 1.1 μ M for CDK1, and 0.9 μ M for CDK5). We show that 6-BIDECO and 6-BIMYEO used at micromolar concentrations are not neurotoxic and potently reversed tau phosphorylation and apoptosis induced by OKA. The neuroprotection by these compounds should be further validated in animal models of AD. © 2011 Wiley-Liss, Inc.

Key words: GSK3; indirubins; PP2A; neuronal cell death; neuroprotection

Intraneuronal aggregation of abnormally phosphorylated tau proteins constitutes a major neuropathological hallmark of tauopathies such as Alzheimer's disease (AD). Tau is a microtubule-associated protein found mainly in neurons. Its primary role is to stabilize the neuronal cytoskeleton. Tau binding to microtubules is regulated predominantly by its phosphorylation degree (Lindwall and Cole, 1984). Tau protein contains 85 putative phosphorylation sites (Martin et al., 2011). Tau phosphorylation at threonine 231 (Thr231), a site that undergoes prolyl-isomerization (Zhou et al., 2000), and at serine 262 (Ser262) site, which is located in a microtubule binding domain (Dickey et al., 2007), contributes to tau dissociation from microtubules by 26% and 33%, respectively (Sengupta et al., 1998). Tau phosphorylation at Thr231 also facilitates tau aggregation (Abraha et al., 2000; Haase et al., 2004), and tau phosphorylation at Ser202 and Thr205 or at Ser262 generates a pathological tau conformation characteristic of AD (Jeganathan et al., 2008; Fischer et al., 2009). These data indicate that tau phosphorylation at these sites might be of pathological relevance in AD. It is noteworthy that these epitopes are phosphorylated by glycogen synthase kinase-3 β (GSK3 β), the major tau kinase (Hanger et al., 2009).

Contract grant sponsor: "Conseil Régional du Limousin".

*Correspondence to: Faraj Terro, Unité de Neurobiologie Cellulaire, EA3842 Homéostasie cellulaire et pathologies, Faculté de Médecine, 2 rue du Dr. Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX, France. E-mail: faraj.terro@unilim.fr

Received 14 January 2011; Revised 21 April 2011; Accepted 22 May 2011

Published online 00 Month 2011 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/jnr.22723

**DC2 AND KCP2, SUBUNITS OF THE OLIGOSACCHARYLTRANSFERASE COMPLEX
ARE REGULATORS OF THE γ -SECRETASE-DIRECTED PROCESSING OF APP.**

Cornelia M. Wilson^{a,b,*}, Amandine Magnaudeix^a, Catherine Yardin^{a,b} and Faraj Terro^{a,b}

^aUniversité de Limoges, Groupe de Neurobiologie Cellulaire–EA3842 Homéostasie cellulaire et pathologies, Faculté de Médecine 2, rue du Dr Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX–France.

^bLaboratoire d'Histologie et de Cytogénétique–Hôpital de la Mère et de l'Enfant 8, avenue D. Larrey, 87042 Limoges CEDEX–France

Running head: DC2 and KCP2 regulate the γ -secretase

Address correspondence to: Cornelia M. Wilson, Université de Limoges, Faculté de Médecine, 2, rue du Dr Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX–France, phone: +33 (0)555435831, Fax: +33 (0)555435893. E-mail: cornelia.wilson@unilim.fr

The oligosaccharyltransferase complex catalyses the transfer of oligosaccharide from a dolichol pyrophosphate donor *en bloc* onto a free asparagine residue of a newly synthesised nascent chain during the translocation in the ER lumen. The role of the less known oligosaccharyltransferase (OST) subunits, DC2 and KCP2 recently identified still remains to be determined. Here, we have studied DC2 and KCP2 and we have established that DC2 and KCP2 are substrate-specific affecting amyloid precursor protein (APP) indicating that they are not core components required for N-glycosylation and OST activity *per se*. We show for the first time that DC2 and KCP2 depletion affects APP processing leading to an accumulation of C-terminal fragments, both C99 and C83 and a reduction in full length mature APP. This reduction in mature APP levels was not due to a block in secretion since the levels of sAPP α secreted into the media were unaffected. We discover that DC2 and KCP2 depletion affects only the γ -secretase complex resulting in a reduction of the PS1 active fragment blocking A β production. Conversely, we show that the overexpression of DC2 and KCP2 causes an increase in the active γ -secretase complex particularly the N-terminal fragment of PS1 that is generated by endoproteolysis leading to a stimulation of A β production upon overexpression of DC2 and KCP2. Our findings reveal that components of the OST complex for the first time can interact with the γ -secretase and affect the APP processing pathway.

Alzheimer's disease (AD) is the primary cause of adult onset dementia, with a dramatic increase in the incidence of AD apparent in our aging population. AD is pathologically

characterized by the accumulation of tangles and senile plaques. Senile plaques are composed of the A β (amyloid- β peptides), A β 40 and A β 42 (1). The early onset familial form of AD (FAD) is linked to three genes, amyloid precursor protein (APP), presenilin (PS1 & PS2) (2,3), strongly suggesting that the production of A β is a key factor in the pathogenesis of AD. A β is generated by proteolysis of APP (β -amyloid precursor protein) driven by the secretases found in the cell. Prior to proteolysis, APP undergoes a number of post-translational modifications including N-glycosylation in the endoplasmic reticulum (ER) and O-glycosylation in the Golgi apparatus. In order to generate A β 40 and A β 42, APP is first cleaved by β -secretase and then by γ -secretase. For the cleavage of APP, β -secretase competes with α -secretase, which produces non-amyloidogenic peptides (4). γ -secretase is an aspartyl protease complex composed of four core components, including presenilins (PS1/PS2), presenilin enhancer 2 (PEN2), nicastrin, and anterior pharynx-defective 1 (APH1) (2). Presenilin is the catalytic core of the γ -secretase complex consisting of 9 transmembrane domains (5) and is cleaved by an unknown protease called 'Presenilinase' or self-cleavage stimulated by PEN2 binding of the cytosolic loop between transmembrane domains 6 and 7 releasing N- and C-terminal PS1 fragments that contributes to γ -secretase activity (6,7). Therefore, the identification of novel cellular factors that suppress the generation of A β could provide important drug targets for the treatment of AD.

N-glycosylation is the most common type of protein modification that occurs at the endoplasmic reticulum (ER) in eukaryotic cells. This process is facilitated by the oligosaccharyltransferase (OST), an enzyme complex that catalyses the attachment of a high mannose oligosaccharide *en bloc* onto suitable

1

**Direct evidences that basal macroautophagy activity
is low in cultured neurons**

Amandine Magnaudeix¹, Ludovic Martin¹, Marion Crochetet¹, Catherine Yardin^{1,2},
Philippe Levêque³, Faraj Terro^{1,2, §}

¹ Groupe de Neurobiologie Cellulaire-EA3842 Homéostasie cellulaire et pathologies
Faculté de médecine
2, rue du Dr Marcland
87025 Limoges -France

² Laboratoire d'Histologie et Cytogénétique Hôpital de la Mère et de l'Enfant
8, av D. Larrey
87042 Limoges cedex-France

³ CNRS, UMR 6172, XLIM - OSA Department, University of Limoges,
87060 Limoges- France

§Address correspondance to : Faraj TERRO, Unité de Neurobiologie Cellulaire, EA3842
Homéostasie cellulaire et pathologies - Faculté de Médecine
87025 Limoges-France
Tel. 33 5 55 43 58 31, Fax. 33 5 55 43 58 93, E-mail. faraj.terro@unilim.fr

Abstract:

Macroautophagy (commonly referred to as autophagy) is the most abundant form of autophagy which degrades long-lived proteins et organelles inside lysosomes. Recent data have demonstrated that the invalidation of autophagy in the central nervous system led to the accumulation of ubiquitinated proteins et neurodegeneration, indicating that autophagy has a neuroprotective function. The causes of the selective neuronal loss et protein aggregation in neurodegenerative diseases such as Alzheimer's et Parkinson's remain unclear. Here we conducted a comparative study of specific markers of autophagy, Beclin-1 expression et conversion of MAP-LC3-I to MAP-LC3-II (a specific marker of autophagosomes), in neuron- et astroglial cell-enriched cultures. In basal conditions, the immunofluorescence study of Beclin 1 indicated that Beclin-1 expression was restricted to astroglial cells, whereas it was nearly absent in neurons. This was confirmed by western blot analysis of Beclin-1. Immunofluorescence of MAP-LC3-I/II showed that the number of autophagosomes was higher in astroglial cells compared to neurons. Western blot analysis of MAP-LC3I/II indicated that the rate of MAP-LC3-I conversion to MAP-LC3-II was higher in astroglial cells compared to neurons. These results indicate that the level of constitutive basal autophagy is low in neurons, compared to astroglial cells. We also confirmed that rapamycin induced autophagy in neurons indicating that neurons express the molecular machinery of autophagy. We suggest that the presence of low basal autophagy levels represents an intrinsic property of neurons that might contribute to protein aggregation et enhanced vulnerability of neurons in stress conditions. In those conditions, induction of autophagy might constitute a strategy for preventing protein aggregation et neuron degeneration.

Key words: neurons, astroglial cells, autophagy, primary cultures, neurodegeneration

Associate Editor (Remarks to Author):

We have now received your paper back from the reviewers. As you can see by the reviewers' comments (pasted below), both reviewers agree that although interesting, the study is still in a very premature state et it requires considerable further characterization of the autophagic process in neurons. In light of those concerns I cannot recommend your paper for acceptance in its current format, but would be glad to reconsider a revised version if you can address the concerns raised by the reviewers. The second reviewer has included a very detailed series of experiments, controls, et quantifications that are missing in the paper. I agree with both reviewers on the need of future studies to support your conclusion, as well as the improvement of the already performed studies. In particular, it is essential that you provide information not only on the number of autophagosomes but on the autophagic flow (through measurement of autophagic flux with lysosomal inhibitors). In addition, **quantification of the immunofluorescence images is essential as well as the inclusion of higher quality immunoblots for LC3I/II with the requested controls.**

Referee #1 (Remarks to the Author):

Magnaudeix et al has examined protein levels of Beclin 1 et LC3 in cultured neurons et astrocytes et indicated that autophagic activity is low in neurons as compared to astrocytes. Overall, this study is largely premature et does not contain valid information to support the authors' claim.

1. the "low autophagic activity" in neurons based on this study is only speculative; a substantial characterization of autophagy in neurons will be needed to Assess the autophagic activity in neurons.
2. The result of beclin 1 expression in cultured neurons is inconsistent with previous studies in the mouse brain tissues which demonstrate the beclin 1 is expressed mainly in neurons but not astrocytes (Arsov I, et al, BAC-mediated transgenic expression of fluorescent autophagic protein Beclin 1 reveals a role for Beclin 1 in lymphocyte development. CDD, 2008; Pickford et al, The autophagy-related protein beclin 1 shows reduced expression in early Alzheimer disease et regulates amyloid β accumulation in mice, JCI, 2008). Thus, it is highly possible that the expression levels of beclin 1 seen in cultured neurons are the result of an artifact.

Referee #2 (Remarks to the Author):

In this study, Magnaudeix et al show induction of autophagy in neurons by rapamycin, which has been extensively used to trigger autophagy in various mammalian cells et has been previously shown to protect in certain models of neurodegenerative diseases. The authors also conclude that the level of autophagy is less in neurons as compared to astroglial cells, thus making the neurons susceptible to the toxic effects of protein aggregation as seen in neurodegenerative diseases. While the data are promising, the authors have relied solely on immunofluorescence analysis without any quantification, et weak immunoblots to support the microscopy images. However, this is an important study in the field of autophagy et neurodegeneration, et should be published after proper revision in order to scientifically improve the quality of the data in this paper.

Major comments:

1. To Assess the levels of autophagy between different cell types is very complex, which may depend on the rate of protein synthesis, cell volume, rate of cell division, etc. Certainly, the experiments presented in this study do not validate the conclusions made by the authors. The most interesting part of their story is a high response of the neurons to an autophagy inducer, which directly demonstrates autophagy induction in neurons in spite of several papers showing that rapamycin is protective in various models of neurodegenerative diseases. Also, the claims regarding less autophagy in neurons contributing to neurodegenerative conditions is far-fetched with no direct experiments. Thus, the authors should play down these conclusions, et instead discuss more on the applications of a greater response of neurons to autophagy induction.
2. Fig. 1: Autophagy induction by rapamycin looks promising; however, it is difficult to interpret the result from a single image as often these are not representative of the whole slide. The authors need to quantify LC3 vesicles from triplicate experiments et show statistical analysis. The effect of rapamycin can be either Assessed through confocal microscopy by image-based software (Zhang et al., PNAS, 2007, 104:19023) **or by counting the number of cells with more than a certain number of LC3 dots (as all cells would have LC3 dots) by fluorescence microscopy (Sarkar et al., J Biol Chem, 2007, 282:5641).**
3. Fig. 2: Quantification of beclin 1 intensity by confocal microscopy must be shown. This can be done by selecting approximately 25 neuronal or astroglial cells, et then showing statistical analysis from triplicate experiment for the response of these cell types to rapamycin. These images have to be taken with identical confocal microscope settings while determining the signal intensity.
4. Fig. 3: This figure is a repetition of the previous figures et adds no further information, et thus can be omitted.
5. Fig. 4A - LC3 blot: Although the ability of rapamycin to induce autophagy in neurons looks promising, the LC3 immunoblot is not very convincing et not up to the standard of publication. The authors should provide a convincing immunoblot with well-separated LC3-I et LC3-II bands. Moreover, there appears to be no change in LC3-II levels versus actin (see comments in point 6) upon rapamycin treatment in astroglial cells. This probably fits with the images in Fig. 3 left panel where a lot of LC3 dots in both control et rapamycin samples makes interpretation difficult as to whether rapamycin has any effect. Also the gel in Fig. 4A is overexposed, et maybe a lighter exposure may aid careful analysis. Finally, the expression of proteins in various tissues or cells are different, et for any remote comparison, the authors need to show the effects of rapamycin in the two cell types in the same gel with equal loading control (actin).
6. Fig. 4B - LC3 blot analysis: Furthermore, the quantification in Fig. 4B has no error bars, suggesting that these experiments may have been done only once. All experiments must be done in triplicate et densitometric analysis (mean +/- sem from 3 experiments) of the levels of LC3-II should be shown versus actin, et not the ratio of LC3-I to LC3-II conversion. Analysis of LC3-I to LC3-II conversion is incorrect due to a number of reasons: some LC3-II can be converted back to LC3-I, LC3-II detection is more sensitive by immunoblotting than LC3-I, et the levels of LC3-I may vary between tissues et cell lines et may obscure the LC3-II band on a gel. The levels of LC3-II relative to actin correlate to autophagosome numbers, et this has been endorsed by several autophagy experts in the guidelines for autophagy Assays (Klionsky et al., Autophagy, 2008, 4:1), et various other reviews such as in Mizushima et Yoshimori, Autophagy, 2007, 3:542. Therefore, lines 3-10 on page 6 et Fig. 4B top panel must be deleted et should be replaced with new statistical information/graph on the analysis of LC3-II levels relative to actin.

7. One of the best ways of measuring the rate of autophagy is by the autophagic flux Assay with bafilomycin A1 (see Mizushima et Yoshimori, *Autophagy*, 3:542, 2007; Sarkar et al, *J Biol Chem*, 282:5641, 2007; Klionsky et al., *Autophagy*, 2008, 4:1). This will not only allow determining the actual levels of autophagy in a cell type, but can also distinguish between an autophagy inducer et an autophagosome-lysosome fusion blocker, both of which increase LC3-II levels or vesicles. It will also allow Assessing the response of different cell types to autophagy induction. The authors must perform this Assay in neurons et astroglia using bafilomycin +/- rapamycin treatments. Densitometric analysis from triplicate experiments must be shown. Determining just the LC3 dots or LC3-II levels, as in the present study, is not sufficient to draw conclusions regarding the rate of autophagy.
8. Fig. 4A, 4B - Beclin-1 blot: The response to rapamycin in neurons is massive; however, the authors could not detect much difference by immunofluorescence in Fig. 2. Again, the quantification has no error bars, et densitometry analysis of beclin-1 levels relative to actin from three independent experiments must be shown. Also, it would be nice to show the effects of rapamycin in the two cell types in the same gel with equal loading control (actin).
9. This paper should be considered as a 'brief report' rather than a regular research paper. Fig. 3 can be deleted as suggested, et the new blots as suggested in the comments on Fig. 4 can be incorporated in Figs. 1 et 2.

Minor comments:

1. The authors must reduce the comments made on the comparisons between two cell types, et focus more on the statistical analysis et response of neurons to rapamycin.
2. It would be nice to mention the fact that rapamycin protects various disease models in an autophagy-dependent fashion, as its effect is lost by knockdown of different autophagy genes in *Drosophila* (Berger et al., *Hum Mol Genet*, 2006, 15:433; Pandey et al., *Nature*, 2007, 447:859).
3. The authors can consider changing the running title to 'induction of autophagy in neurons', et should avoid mentioning about the comparison between cell types.
4. The toxicity of rapamycin in neurons should be mentioned in the main text results section, rather than in the figure legend. Quantification of cell death by Assessing nuclear morphology can be shown to confirm that rapamycin has no toxic effects in neurons.

Dear Dr. Terro,

The response above is the form letter; here is my own response: Thank you for submitting a paper for publication in *Autophagy*. I sent your paper to one of the Associate Editors et he/she forwarded it to two expert reviewers, whose comments are indicated above. The reviewers thought that the topic of the work was interesting et that the paper might ultimately be a good addition to the field; however, they raised a significant number of concerns, concluding in essence that the paper is premature. I will not attempt to repeat the entire list of comments, but will highlight a few points for emphasis. Referee #1 did not go into details, but indicates that the autophagic activity needs to be better characterized. This reviewer also raises a concern about the discrepancy between your present results regarding the expression of beclin 1 et previously published studies. Referee #2 notes the need for quantification of the data et for improved images

in various experiments. This reviewer also points out the appropriate way to monitor autophagic flux et cites various papers that describe this issue in greater detail. Given the nature of the reviews, I cannot accept the manuscript in its present form; however, I will be glad to reconsider a revised version of your manuscript that addresses the comments of the referees. If you choose to submit a revised paper please be sure to include a response to the reviewers indicating how you have addressed each of the reviewers' concerns that is SEPARATE from your cover letter. Please note that a revised manuscript will probably be returned to at least one of these referees.

I know that you will be disappointed with this decision but I hope that the comments will be helpful to you as you revise the manuscript. It seems likely that you will need more than the indicated two-months for resubmission. Thus, please note that the two-month deadline is "standard" but can definitely be extended if necessary.

Sincerely,

Dan Klionsky

Amphotericin B induces autophagy in COS-7 cell line

Amandine Magnaudeix¹, Philippe Lévêque, Philippe Roingeard², et Faraj Terro^{1,3, §}

¹ Groupe de Neurobiologie Cellulaire-EA3842 Homéostasie cellulaire et pathologies
Faculté de médecine
Limoges -France

² INSERM ERI 19 "Morphogenèse et antigénicité du VIH et des virus des hépatites-
Université François-Rabelais
Tours-France

³ Laboratoire d'Histologie et Cytogénétique Hôpital de la Mère et de l'Enfant
Limoges-France

§Address correspondance to : Faraj Terro, Unité de Neurobiologie Cellulaire, EA3842
Homéostasie cellulaire et pathologies - Faculté de Médecine
Limoges-France
Tel. 33 5 55 43 58 31, Fax. 33 5 55 43 58 93, E-mail. faraj.terro@unilim.fr

Abstract :

Autophagy is a highly conserved mechanism in eukaryotic cells. It plays a key role in long-lived protein et organelle degradation et recycling. Acute cholesterol depletion by nystatin was previously shown to induce autophagy in human fibroblasts. Like nystatin, amphotericin B (AmB) (Fungizone®) is an antifungal antibiotic. They exert their fungicide activity by creating channels across biological membrane et that by forming stable complexes with membranous sterols. Here we show that AmB dose-dependently induced autophagy (macroautophagy) in COS-7 cell lines. AmB-induced autophagy was morphologically et biochemically characterized using several criteria, including conversion of LC3 I into LC3 II, Beclin-1 induction et accumulation of multimembranous vacuoles (autophagosomes), evidenced by conventional electronic microscopy. AmB increased the conversion rate of LC3 I into LC3 II, as reflected by the increase in the number of autophagosomes (detected by immunofluorescence for LC3) et LC3 II levels (detected by western-blotting). Induction of autophagosome formation by AmB was confirmed using pEGFP-LC3 expressing COS-7 cells. Both immunofluorescence et western-blot assays for Beclin-1 showed that AmB dose-dependently increased Beclin-1 expression. Conventional electronic microscopy showed that AmB-exposed cells exhibited an accumulation of multimembranous vacuoles known as autophagosomes. Furthermore, the cell survival MTT et caspase-3 cleavage assays showed that exposure of COS-7 to AmB was not cytotoxic. These data show that AmB induces autophagy without affecting cell survival of COS-7 cells. The molecular mechanisms underlying AmB-induced autophagy remain to be determined, but we raised here several hypotheses.

Key words: Autophagy, Amphotericin B, Fungizone, COS-7, Sterol, Cholesterol

Associate Editor (Remarks to Author):

This paper reports that an anti-fungal drug, amphotericin B, induces autophagy. However, the data are not convincing et are premature. Considering that autophagy can be induced by a number of stimuli, simple demonstration of another triggering factor would not be very exciting. Nonetheless, as amphotericin B is one the most famous drugs that have been used for a long time, description of this unappreciated function may be important. The criticisms raised by the referees are quite reasonable, et they should be addressed. As they point out, the authors need to measure autophagy flux. **Accumulation of the LC3-II form et LC3 puncta does not necessarily indicate autophagy induction, but may rather indicate inhibition of a later step (e.g. autophagosome-lysosome fusion).** It is crucial to distinguish these two possibilities. Autophagy flux can be determined by treatment of cells with lysosome protease inhibitors (Tanida et al. *Autophagy* 1:84-91 (2005), Mizushima et al. *Autophagy* 3:542-5 (2007), Klionsky et al. *Autophagy* 3:181-206 (2007)). Analysis of p62 level would also be helpful.

Referee #1 (Remarks to the Author):

Like many other cellular process, autophagy could be induced by many factors, chemical, physical et cellular. This manuscript described that amphotericin B, a commonly used anti-fungal drug, could also induce autophagy in COS-7 cells, perhaps by enhancing Beclin 1 expression. However, it is not clear what the significance of this study is other than to document that this chemical can induce autophagy. In addition, this study was not conducted in a thorough way et the data do not seem to be of high quality. The chemical was tested only in one cell line. Autophagy was only based on changes in LC3 location et LC3 lipidation. These types of changes may not necessarily indicate autophagy induction. Moreover, the EM study was not very convincing et finally there is no Assessment of autophagy flux.

Referee #2 (Remarks to the Author):

This report by Magnaudeix et colleagues describes the apparent induction of macroautophagy in COS7 cells after treatment with the antifungal amphotericin B. The findings follow on a published report of autophagy induction by the structurally similar antifungal nystatin. Here, the induction of autophagy by amphotericin B is demonstrated by immunofluorescence et western blot analyses demonstrating the dose-dependent induction of LC3-II et Beclin 1. It is further supported by the appearance of multi-membranous structures in treated cells. The study is limited by a lack of data examining whether this apparent induction is accompanied by completion of autophagy. There are now several methods that could be used to Assess this - for example, measuring LC3 levels after treatment with lysosomal protease inhibitors, measuring long-lived protein degradation, following autophagosome-lysosome fusion, or monitoring p62 protein levels by western blot. The incorporation of these data would enhance the report. Additionally, several potential mechanisms of autophagy induction are proposed, though none are tested experimentally.
Other points:

The 7th sentence of the abstract is redundant with the information that follows.

There is no reference in the text to figure 1a.

The data graph in figure 1d would be more intuitive to follow if expression of Beclin 1 et LC3-II in control cells were reported as 1 (or 100%) et drug-induced changes reported as relative fold changes.

It seems unnecessary to have all the data presented in a single, multi-panel figure since two figures are allowed in the brief report format. The advantage of splitting into multiple figures includes the fact that some of the cell images et arrows are quite small.

It seems advantageous not to emphasize in the title that these findings are only in COS7 cells. Are there experimental data to support the conclusion that this is generally true in mammalian cells? Do the authors believe that autophagy induction is related to the mechanism of drug action as an antifungal?

The manuscript would benefit from editing.

Dear Dr. Terro,

The response above is the form letter; here is my own response: Thank you for submitting a paper for publication in Autophagy. I sent your paper to one of the Associate Editors et he/she forwarded it to two expert reviewers, whose comments are indicated above. I will not attempt to repeat them here, as they are self-explanatory, but they include the need for better autophagy Assays that monitor flux (please see the guidelines article by Klionsky et al., published earlier this year in Autophagy), the analysis of additional cell types et the need to test potential mechanisms of induction. The inclusion of these data may necessitate submitting the revised paper as a regular article.

Given the nature of the reviews, I am returning the paper to you for revision; however, I will be glad to reconsider a revised version of your manuscript that addresses the comments of the referees. If you choose to submit a revised paper please be sure to include a response to the reviewers indicating how you have addressed each of the reviewers' concerns that is SEPARATE from your cover letter. Please note that a revised manuscript will probably be returned to both of these referees.

I know that you will be disappointed with this decision, but I hope that the comments will be helpful to you as you revise the manuscript. Please note that the two-month deadline is "standard" but can definitely be extended if necessary.

Sincerely,
Dan Klionsky

**PP2A blockade inhibits autophagy and causes intraneuronal
accumulation of ubiquitinated proteins**

Amandine Magnaudeix^a, Cornelia-Mair Wilson ^{a,b}, Ludovic Martin ^{a,c}, Guylène Page^d, Philippe
Lévêque^c, Catherine Yardin^{a,b}, Faraj Terro^{a,b,*}

^a Groupe de Neurobiologie Cellulaire – EA3842 Homéostasie cellulaire et pathologies, Faculté de
Médecine, 2 rue du Dr Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX, France

^b Laboratoire d'Histologie et de Cytogénétique – Hôpital de la Mère et de l'Enfant, 8 avenue D.
Larrey, 87042 Limoges CEDEX, France

^c CNRS, UMR 6172, XLIM - OSA Department, University of Limoges,
87060 Limoges- France

^d Groupe de Recherche sur le Vieillissement Cérébral, GReViC – UFR Médecine-Pharmacie, 6 rue
de la Milétrie, BP 199, 86034 Poitiers

* **Corresponding author.** Groupe de Neurobiologie Cellulaire – EA3842 Homéostasie cellulaire et
pathologies – Faculté de Médecine, 2 rue du Dr Raymond Marcland, 87025 Limoges CEDEX,
France. Fax: +33 5 55 43 58 93. E-mail address: faraj.terro@unilim.fr

Abstract

Using cultured cortical neurons, we show that blockade of protein phosphatase 2A (PP2A), either pharmacologically by okadaic acid (OKA) or by shRNA-mediated silencing of PP2A catalytic subunit, inhibits basal et pharmacologically-induced autophagy at early stages before the autophagosome maturation. Autophagy inhibition was Associated with the activation of mTORC1 et AMPK (5' AMP-activated protein kinase) pathways which are known to negatively regulate autophagy. Importantly, blockade of PP2A resulted in an intraneuronal accumulation of p62-et ubiquitin-positive protein inclusions, likely as a consequence autophagy downregulation. These data are consistent with previous findings showing that specific invalidation of autophagy in the nervous system of mouse resulted in the accumulation of ubiquitin-positive et p62-positive protein inclusion bodies. Furthermore, PP2A inhibition alters the distribution of the MAP1 LC3-I (LC3-I), a key component of the autophagy molecular machinery, between detergent soluble et insoluble fractions. Whether, LC3-I maldistribution accounts for autophagy downregulation in neurons remains to be determined. These data are relevant to human neurodegenerative diseases, especially Alzheimer's disease (AD), since they provide links between three pathological features of AD : PP2A downregulation, autophagy disruption et protein aggregation.

KEY WORDS : Autophagy, neuron, PP2A, protein aggregation, Alzheimer

RÉSUMÉ

La macroautophagie est l'une des voies cataboliques majeures de la cellule eucaryote. Elle joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie protéique. Une caractéristique commune à la plupart des pathologies neurodégénératives est la présence d'agrégats protéiques dans les cerveaux de patients. Il s'agit par exemple de l'accumulation de dépôts extracellulaires de peptide β -amyloïde et d'agrégats intra-neuronaux de protéine tau hyperphosphorylée dans la maladie d'Alzheimer. A l'heure actuelle, nous ne savons pas si ces anomalies participent directement à la pathogenèse ou si elles en sont une conséquence. Au cours du vieillissement, facteur de risque majeur pour la survenue de pathologies neurodégénératives, l'activité des voies cataboliques décline. La suppression de l'autophagie dans le SNC de souris est suffisante pour causer la neurodégénérescence et la formation d'inclusions protéiques intraneurales. L'induction de l'autophagie *in vitro* et *in vivo* est protectrice contre la surexpression de protéines pathologiques. Donc l'autophagie peut être considérée comme un mécanisme neuroprotecteur.

Au cours de ce travail nous avons mis en évidence que l'activité autophagique basale était faible dans les neurones en comparaison avec les astrocytes. Ceci nous a conduit à émettre l'hypothèse selon laquelle cette faible activité autophagique constituerait une propriété intrinsèque neuronale contribuant à l'accumulation d'agrégats protéiques dans ces cellules, au cours des pathologies neurodégénératives. L'induction de l'autophagie étant considérée comme neuroprotectrice, nous avons caractérisé ensuite les propriétés pro-autophagiques d'une molécule antifongique, l'amphotéricine B dans des lignées cellulaires et dans des cultures primaires de neurones corticaux de rat dans lesquelles l'effet de cette substance est plus modéré. Cependant, les propriétés neuroprotectrices de cette substance restent à déterminer. Par ailleurs, nous avons montré que l'inactivation pharmacologique ou moléculaire de la PP2A dans nos cultures corticales primaires de neurones induisait une inhibition de l'autophagie, au niveau des phases précoces de ce processus, associée à l'accumulation intraneuronale d'inclusions positives pour p62 et l'ubiquitine. De plus, l'inhibition de la PP2A conduit à des anomalies de la distribution de la protéine MAP-LC3-I, composant clé de la machinerie autophagique, entre des fractions solubles et insolubles au détergent Triton X-100. La signification de cette mal-distribution de LC3-I ainsi que les mécanismes moléculaires de la régulation de l'autophagie par la PP2A restent à déterminer. Ces données sont importantes car elles apportent la preuve de l'existence d'un lien entre trois caractéristiques pathologiques observées au cours de la maladie d'Alzheimer : la réduction de l'activité de la PP2A, des anomalies de l'autophagie et l'agrégation protéique.

Mots clés : Autophagie, Neuroprotection, Alzheimer, Neurones, PP2A, tau