



17 novembre 2014

## Après la fin

La semaine dernière, je commentais un article qui attribuait à une migration aberrante non coordonnée, plutôt qu'à la taille, les pertes de mitochondries dans les régions terminales des axones dopaminergiques. Et je finissais en disant que les choses étaient peut-être moins tranchées. C'est en tout cas ce qui est suggéré par un autre article, récent lui aussi, de Rappold *et al.* (*Nature Comm.* 5 : 5244, 2014). Les auteurs s'intéressent aussi à la maladie de Parkinson et à la dégénérescence des neurones mDA qui en est un des symptômes principaux. Ils rappellent que le lien entre Parkinson et mitochondrie a été proposé depuis longtemps du fait que les mutations dans PINK1 (*PTEN-Induced Putative Kinase*), alpha-Synucléine, LRRK2, Parkin et DJ-1, identifiées dans des formes familiales de la maladie, interfèrent avec la physiologie des mitochondries. Les mitochondries, je le rappelle, sont des organelles dynamiques qui changent continûment de forme, de taille, de nombre et de localisation. La **DIA VII.2** vous remet en mémoire les rôles de DRP1, la fission et de Mfn1/2 et Opa1 dans la fusion des mitochondries, deux événements qui doivent être finement régulés sur le plan physiologique. On comprendra aisément que le transfert des mitochondries vers le compartiment présynaptique (post-synaptique tout autant) et leur activité locale sont de grande importance physiopathologique.

Or il se trouve que les différents gènes dont nous avons parlé plus haut (Parkin, DJ-1, etc.) semblent jouer un rôle important dans les fonctions présynaptiques sans que le mécanisme de leur action soit clairement compris mais avec une probabilité importante que la mitochondrie y participe, quand ce ne serait que pour la libération de calcium nécessaire à la fusion de vésicules et la libération des médiateurs. Mais on ne peut non plus éliminer d'autres fonctions plus complexes dans le trafic vésiculaire ainsi que je l'exposerai dans un instant. On peut donc se demander si jouer au niveau mitochondrial, y compris celui de la morphologie mito-

chondriale, ne pourrait avoir des effets thérapeutiques dans certaines maladies neurodégénératives, dont – mais pas seulement – le Parkinson. C'est ce que Rappold et ses collègues ont exploré dans l'article que nous allons survoler. Ils ont utilisé un AAV2 pour introduire une forme dominante négative Drp1 (Drp1-K38A) afin de bloquer la fission ou pour introduire Fis1 qui augmente la fission en recrutant Drp1 du cytosol à la surface de la mitochondrie. Ces infections ont été faites dans des souris wt ou PINK<sup>-/-</sup> (modèle génétique de la maladie de Parkinson). La **DIA VII.3** illustre l'efficacité du procédé et l'expression des différents gènes, y compris la GFP comme contrôle, dans la Substance Noire et ses terminaisons. La **DIA VII.4** donne les résultats des expressions de Drp1-K38A et Fis1 chez wt et Pink<sup>-/-</sup> sur la morphologie des mitochondries. Il n'y a aucune différence entre wt et Pink<sup>-/-</sup> (quelles que soient les conditions) mais néanmoins un fort effet sur la morphologie avec Fis1 qui augmente la proportion de petites mitochondries et K38A celle des grosses, ce qui n'est pas surprenant.

Les souris mutantes ont une déficience dans la libération de DA. La **DIA VII.5** démontre que chez la souris sauvage seul Fis1, qui augmente la fission (en « dockant » Drp1 à la surface), diminue la libération de DA. Mais chez le mutant PINK1, qui présente une forte baisse de la libération de DA (la sérotonine n'est pas affectée non plus que le contenu total en DA), le mutant K38A (fission réduite) réduit le phénotype pathologique quand Fis1 (fission accrue) l'augmente. Ce qui suggère que la fission des mitochondries, même si elle permet leur transport comme le suggère l'article précédent, n'est pas excellente pour la physiologie des axones. Tout est, c'est l'usage, affaire d'équilibre. L'article continue sur d'autres modèles de Parkinson, mais le message reste le même et il est temps de revenir à notre article de revue de Nunnari et Suomalainen.

Je passerai rapidement sur le lien entre la dynamique mitochondriale et l'apoptose. Ce lien est pourtant particulièrement intéressant car l'apoptose s'accompagne d'une fragmentation des mito-



chondries avec perméabilisation (induite par Bax/Bak-) de la membrane externe et libération de cytochrome c. À l'inverse, la fusion mitochondriale protège contre l'apoptose et BCL-2, un facteur anti-apoptotique (Ced-9 chez les nématodes où le gène fut identifié), favorise la fusion. On le sait, BCL2 provoque des syndromes lymphoprolifératifs, non pas en induisant la prolifération cellulaire mais en bloquant la mort des lymphocytes. Cette action anti-apoptotique, utile dans certains cas (système nerveux), est délétère dans les lymphocytes. Ici, les auteurs font le lien avec la mitophagie, mécanisme important du *turnover* des mitochondries et de l'élimination des mitochondries déficientes. Deux protéines encodées par des gènes mutés dans des formes familiales de la maladie de Parkinson, PARK1 (une Ser/Thr Kinase de l'IMS) et Parkin (une E3 ubiquitine-ligase cytoplasmique), collaborent pour repérer les mitochondries et éliminer les mitochondries « malades ». La perte de potentiel de membrane, qui est un signe de mauvaise santé, inhibe la dégradation de PINK1, qui passe à la surface de la mitochondrie où elle « recrute » Parkin (j'y reviendrai). Parkin peut alors ajouter des résidus ubiquitine à des molécules de la membrane externe et les envoyer vers le protéasome pour dégradation. Je rappelle (**DIA VII.6**) que l'ubiquitine est une petite séquence de 76 acides aminés et que l'addition de plusieurs ubiquitines (poly-un-biquitination) constitue un signal d'adressage vers le protéasome, structure qui dégrade les protéines. Une autre voie de dégradation identifiée dans les érythrocytes, repose sur Nix1, une protéine de la famille de BCL-2, qui sert comme un récepteur à l'autophagosome une vésicule à double membrane qui envoie les composants cellulaires vers les lysosomes, organelles de la dégradation protéique comme on ne va pas tarder à le voir (**DIA VII. 6**). Cette même **DIA VII.6** le suggère aussi, la fusion des mitochondries (au contraire de leur division) est contraire à un processus d'autophagie, probablement pour des raisons de taille. Par exemple, en période de restriction calorique, la fusion des mitochondries bloque leur élimination.

Un autre point important introduit par ces auteurs est la relation entre les mitochondries et les autres organelles cellulaires. La fonction et la morphologie mitochondriales sont influencées par les interactions, parfois très intimes, avec le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique, les autophagosomes ou les lysosomes. Les communications entre mitochondries et autres organelles impliquent des vésicules qui sont générées par la mitochondrie et sont envoyées vers différents compartiments. Un point particulier est celui du réticulum endoplasmique. Comme cela est schématisé sur la **DIA VII.6**, le RE intervient directement dans la division de la mitochondrie, en même temps que ce contact très étroit se révèle être un site de libération de calcium (par le ER et/ou la mitochondrie) qui pourrait sensibiliser la mitochondrie à des agents pro-apoptotiques. On notera que Bax, une protéine impliquée dans l'apoptose et qui crée un canal dans la membrane mitochondriale, est localisée avec DRP1 au niveau du site de constriction. Les auteurs proposent que des troubles du contact entre ER et mitochondries pourraient être à l'origine de maladies humaines.

Je vais m'attarder un peu sur les vésicules dérivées des mitochondries ou MDV (**DIA VII.6**). Je le ferai en m'appuyant sur l'excellente revue de Sugjura et ses collègues (*EMBO J.*, 33 : 2142-2156, 2014). Dans cette revue, les auteurs se penchent sur les interactions entre la mitochondrie et les autres organelles. Le RE est le mieux étudié pour cette propriété comme nous venons de le discuter très brièvement. Mais maintenant, il ne s'agira pas seulement des contacts étroits entre la mitochondrie et les organelles (comme le RE) mais de transport vésiculaire reliant la mitochondrie aux autres organelles, voire à l'extérieur de la cellule (pas forcément directement), voie inattendue de sécrétion. La **DIA VII.7** illustre les différentes formes de ce bourgeonnement mitochondrial qui peut inclure la seule membrane externe ou les deux membranes externe et interne, donnant naissance à des *Mitochondrial-Derived-Vesicles* (MDV) de 70 à 150 nm qui sont « envoyées » vers les endosomes tardifs



(**DIA VII.8**), les corps multivésiculaires – voie possible de dégradation (lysosomes), mais aussi de sécrétion. Les peroxisomes (une sous-classe d'entre eux en tout cas) constituent un autre compartiment d'adressage de ces vésicules. J'indique brièvement que les peroxisomes, découverts par de Duve en 1965, sont des vésicules dérivées du RE dont le contenu protéique encodé par le noyau est importé à partir du cytoplasme grâce à un signal d'adressage spécifique. Ces protéines ou *peroxins*, au nombre limité (autour de 50), sont engagées dans de nombreuses fonctions, comme la dégradation de  $H_2O_2$  par la catalase. Les peroxisomes sont aussi le site de dégradation oxydative (à travers l'utilisation de  $H_2O_2$ ) de plusieurs composés comme l'acide urique, les acides gras à longue chaîne, les acides aminés. Une autre fonction est la synthèse lipidique, dont – pour les animaux – celle du cholestérol (rôle partagé avec le RE). Enfin, les peroxisomes contiennent les enzymes nécessaires à la synthèse des plasmalogens, composants importants de la membrane de certains tissus, dont le cerveau.

Dans un premier temps, nous laisserons de côté le transport vers les corps multivésiculaires (MVB) – et une possible voie de sécrétion – et les peroxisomes. Pour ces derniers, au cas où je n'aurais pas le temps d'y revenir, j'ajouterai simplement que la mitochondrie, via ce transport vésiculaire, participe à leur biogenèse. Je me concentre donc pour l'instant sur les lysosomes dont on connaît la fonction de dégradation des protéines et qui pourraient donc participer au « contrôle qualité » de la mitochondrie. Le mécanisme de formation des vésicules dérivées des mitochondries MDV (**DIA VII.7**) a probablement été conservé des archaebactéries, les ancêtres des mitochondries, et il s'agit donc d'un mécanisme primitif de communication cellulaire, ici détourné vers l'intérieur de la cellule puisque les mitochondries sont des endosymbiotes. Un point important est que la formation des MDV destinées aux lysosomes demande PINK1 (une protéine kinase) et la Parkin une E3 ligase cytosolique, deux produits de gènes mutés dans des formes familiales de la maladie de Parkinson.

Normalement, PINK1 est importé par la mitochondrie et dégradée par les protéases mitochondriales, les fragments libérés dans le cytosol y étant dégradés par un autre mécanisme (N-rule proteolysis). Quand la mitochondrie est dépolarisée ou que l'activité des chaperons est altérée, l'import est incomplet et PINK1 est bloqué à la surface où il phosphoryle la Parkin qui, recrutée du cytoplasme à la surface de la mitochondrie, ajoute des ubiquitines aux protéines de surface, ce qui enclenche la phagocytose (**DIA VII.8**). PINK1 et Parkin sont nécessaires à la formation des MDV, d'où le modèle proposé par les auteurs dans la **DIA VII.9**. Dans ce modèle, la formation des MDV est une réponse locale, un stress plus prolongé transformant cette réponse locale en réponse de type mitophagie. C'est parce que la Hsp est recrutée par la protéine oxydée que PINK1 ne change pas de conformation (Hsp est une chaperonne) et ne peut donc plus traverser la membrane. La MDV emmène les protéines dénaturées vers les lysosomes où elles seront dégradées. Ce mécanisme hypothétique n'est impliqué que pour les MDV à deux membranes (IMS et OMS) qui sont formés au point de contact de ces membranes, les autres (simple membrane, présence de Tom20 – par exemple) ne requérant ni PINK1 ni Parkin.

On peut donc proposer qu'il s'agit là d'un mécanisme de contrôle qualité supplémentaire pour les mitochondries. Il s'ajoute, en effet, à la mitophagie, à la dégradation des protéines dans la matrice mitochondriale et à l'adressage aux protéasomes (ubiquitin-dépendent et cytosolique). La **DIA VII.10** illustre les quatre lignes de défense des mitochondries : protéases endogènes, adressage au protéasome, formation des MDV et leur adressage aux lysosomes et corps multivésiculaire, enfin l'élimination globale par le phagosome des mitochondries trop défectueuses pour être réparées. Pour ce qui est des corps multivésiculaires, leur fusion avec la membrane plasmique entraîne une libération extracellulaire des MVD et de leur contenu. La fusion avec les membranes des cellules avoisinantes permet alors l'internalisation de leur contenu. Ce phénomène recouvre celui des exosomes (**DIA VII.10**)



et suggère que nombre d'exosomes pourraient venir des mitochondries (10 % des protéines des exosomes sont mitochondriales). Si tel est le cas, l'adressage à la mitochondrie pourrait constituer la première étape d'une signalisation par exosomes.

Avant d'embrayer sur la mitophagie, et plus généralement l'autophagie sur laquelle je conclurai le cours, il me faut revenir sur les lysosomes qui, comme vous le savez, ont été découverts en 1955 par de Duve et jouent un rôle essentiel dans le nettoyage cellulaire. Les lysosomes sont des vésicules à bicouche lipidique simple et contenant des protéines permettant l'import/export moléculaire, l'acidification du milieu vésiculaire et la fusion avec d'autres compartiments membranaires. Lieu de la dégradation des protéines, acides nucléiques, sucres complexes et lipides, les lysosomes reçoivent leurs cargos de l'extérieur, après endocytose, mais aussi de l'intérieur par les phagosomes sur lesquels je reviendrai. Je voudrais simplement souligner que cette dégradation est très importante physiologiquement, puisqu'en son absence les composés « non conformes » s'accumuleraient dans la cellule. Cela est encore plus important pour les neurones qui ne peuvent diluer ces composés par la division cellulaire. Nous revenons là au thème bien connu du renouvellement permanent des structures vivantes et on comprendra facilement que des atteintes à la dégradation des composés « non conformes » est à l'origine de pathologies.

Les lysosomes matures ont une « lumière » acide et une membrane pauvre en cholestérol protégée contre la dégradation par un « glycocalix » qui borde la face intérieure de la membrane (**DIA VII.11**). Cette même **DIA VII.11** décrit d'autres éléments sur lesquels je ne vais pas m'étendre sauf pour LYNUs, un complexe multiprotéique qui est un senseur des nutriments du lysosome, information relayée au noyau (j'y viens) et qui contient une ATPase vacuolaire nécessaire à l'import de protons et donc au maintien d'un pH acide. Les lysosomes se fusionnent avec les autophagosomes, avec d'autres lysosomes, avec les endosomes tardifs, et

aussi la membrane plasmique. Les lysosomes ont trois fonctions principales : dégradation, sécrétion et signalisation. La **DIA VI.12** vous illustre ces trois fonctions et, pour ce qui est de la dégradation, rappelle que les éléments à dégrader peuvent venir de l'extérieur (endosomes) et de l'intérieur via les autophagosomes. Dans l'autophagie, on distingue la microautophagie, la mitophagie dépendante des protéines chaperones (CMA) et la macroautophagie (en fait l'autophagie au sens commun). La microautophagie est liée à la capture par invagination des éléments du cytosol, la CMA requiert un transport à travers la membrane et donc des chaperons, quant à l'autophagie, elle nécessite la fusion des lysosomes avec les autophagosomes, ceux par exemple qui contiennent des mitochondries selon le schéma de la **DIA VII.10**.

La fonction sécrétion est intéressante et peut être détectée par l'apparition de protéines du lysosome comme LAMP1 à la surface de la cellule. La fusion lysosomes surface est dépendante du calcium et est retrouvée dans tous les types cellulaires, contrairement à ce qu'on a longtemps pensé. Elle joue des rôles physiologiques divers qui ont à voir – pour beaucoup mais pas tous – avec la dégradation. Par exemple, les spermatozoïdes libèrent des hydrolases au cours de la fertilisation. Comme pour toutes les fusions vésiculaires, v-SNARE, t-SNARE, synaptotagmine et syntaxin sont impliquées, mais je n'ai pas le temps d'entrer dans ce genre de détails qui tournent rapidement au Talmud moléculaire. Notons que cette fusion joue aussi un rôle dans la réparation membranaire. En effet après une rupture de la membrane (par exemple dans un effort musculaire), les lysosomes sont recrutés au niveau de la région lésée.

Pour ce qui est de la signalisation, les lysosomes jouent un rôle important dans le *nutrient sensing*. Il doit être noté que mTORC1 (inhibé, on s'en souvient par la rapamycine), qui contrôle la croissance cellulaire, mais aussi celle de l'organisme (**DIA VII.13**) est localisé à la surface des lysosomes et que son activité requiert cette localisation. Cette localisation



suggère l'existence d'une co-régulation entre la croissance et le catabolisme dans laquelle les nutriments, l'oxygène, le glucose, les hormones et les facteurs de croissance jouent un rôle essentiel. Pour aller au plus court, le niveau d'autophagie est inversement corrélé à l'activité de mTORC1 et l'inhibition de mTORC1 – par la rapamycine par exemple – augmente considérablement l'autophagie. Le complexe *lysosome nutrient sensing* (LYNUS) est libéré pendant la diète ce qui induit les différentes réactions présentées dans la **DIA VII.14**, y compris la fusion des lysosomes avec les vacuoles d'autophagie ainsi que la dégradation et libération de leurs contenu. Plus, une action au niveau transcriptionnel, qui augmente le niveau d'expression des gènes impliqués dans la construction et la physiologie des lysosomes et des phagosomes, plus la biosynthèse de la mitochondrie (PGC1-alpha). On constate donc que cette structure, que l'on considérait jusqu'à récemment comme une poubelle cellulaire, est en fait au cœur de la régulation du système *nutrient sensor*.

Et, comme de bien entendu, la physiologie et la pathologie ont partie liée, des dysfonctions du lysosome sont associées à de nombreuses maladies ainsi qu'au processus de vieillissement. Nous allons illustrer ce point à travers les maladies neurodégénératives. La **DIA VII.15** met l'accent sur certaines maladies dont l'AD et le PD, le vieillissement, qui n'est pas une maladie, y figure aussi puisque, pour Ballabio et collaborateurs, les dysfonctions de l'autophagie et des lysosomes seraient à l'origine de très nombreuses maladies dégénératives. En effet, les protéines agrégées sont éliminées par les lysosomes et auraient aussi la propriété de malmener les fonctions lysosomes/phagosomes comme la **DIA VII.15** le suggère. Des mutations de l'ATPase13A2, composant de la machinerie d'acidification des lysosomes, ont été retrouvées dans certaines formes de maladie de Parkinson. Pour PINK, et Parkin, j'ai déjà indiqué que ces protéines interviennent dans le passage de domaines endommagés de la mitochondrie, voire de la mitochondrie entière, vers les organelles « mitophages » (**DIA VII.15**). D'où la spéculation des

auteurs de cette revue de développer l'activation de TFEB comme thérapie potentielle telle qu'elle est présentée dans la **DIA VII.16**. En conclusion de ce pas de côté vers les lysosomes, on dira que leur fonction commence à être mieux comprise, en particulier pour ce qui est de la sensibilité aux nutriments mais qu'il est probable qu'il ne s'agisse là que du tout début. Sur ce, nous allons revenir à la question centrale de l'autophagie.

Pour quitter momentanément les processus morbides, nous allons nous pencher sur la fonction de l'autophagie dans le développement et la différenciation en nous appuyant sur une revue un peu ancienne de Mizushima et Levine. L'autophagie est un terme général qui désigne le phénomène de dégradation par les lysosomes de constituants du cytoplasmes (protéines, glycogène, lipides, nucléotides,...) et d'organelles (mitochondries, peroxyosomes réticulum endoplasmique). On distingue, je viens de l'indiquer, trois types d'autophagie : la macroautophagie, la microautophagie et la CMA autophagie (assistée par des protéines chaperonnes). La microautophagie et la CMA autophagie envoient les constituants directement dans les lysosomes, soit par invagination du lysosome, soit par une protéine chaperonne, et la macroautophagie passe par un autophagosome qui fusionne avec les lysosomes. La **DIA VII.17** illustre (microscopie électronique) un autophagosome qui contient des fragments de mitochondrie et de réticulum endoplasmique.

Les études chez la levure ont identifié un nombre important de gènes liés à l'autophagie (gènes ATG) qui sont nécessaires à la macroautophagie. Ces gènes sont très conservés parmi les eucaryotes. La **DIA VII.18** donne une idée des fonctions de l'autophagie dans le développement et la différenciation à travers les espèces, et les phénotypes associés à différentes mutations des gènes ATG ou *ATG-related*. La DIA suivante (**DIA VII.19**) donne les résultats de délétions spécifiques de certains tissus avec, on le voit, des dégénérescences dès qu'on touche le tissu nerveux, ce qui n'ôte rien à l'intérêt des



mutations dans d'autres tissus, ce qui met l'accent sur l'universalité de l'importance physiologique de l'autophagie. Mais par-delà la physiologie, il est de plus en plus clair que l'autophagie est fondamentale pour le développement et la différenciation. Il s'agit, on l'aura compris de ce qui vient d'être exposé, que l'autophagie est un processus qui touche au catabolisme de façon inductible et dynamique. Il répond à des signaux hormonaux et environnementaux et peut induire des changements cellulaires très rapides, donc adaptés aux phénomènes développementaux. Chez les mammifères, l'autophagie est nécessaire à la préimplantation, à la survie néonatale en cas de disette et à de nombreux autres phénomènes développementaux (**DIA VII. 20**).

Le premier pic d'autophagie se produit après fertilisation de l'oocyte comme le montre l'expression de LC3 (GFP-LC3, un marqueur des autophagosomes (**DIA VII.20**) et ATG5 est indispensable à ce pic. Cette activation correspond au passage d'une cellule très différenciée (l'oocyte) à une cellule indifférenciée (l'œuf). Cette reprogrammation touche le noyau et le cytoplasme et de nombreuses protéines et messagers maternels sont hydrolysés et remplacés par des produits de gènes zygotiques (en tout cas chez les mammifères). Une deuxième phase massive se produit à la transition entre embryon et nouveau-né. L'autophagie est massivement induite dans tous les tissus (sauf le cerveau) dans les 2 premiers jours de vie. Cela correspond sans doute à la fin de la nutrition par le placenta et à la nécessité de faire face à la diète que représente ce changement d'environnement. Un autre cas illustré dans la **DIA VII.20** est celui de la maturation des érythrocytes. Les érythroblastes ont un noyau et des organelles intracytoplasmiques, qui manquent chez l'érythrocyte (en tout cas pour les mammifères). Pendant la formation de l'érythrocyte, le noyau est éliminé de la cellule mais ce n'est pas le cas des mitochondries, d'où l'hypothèse de l'autophagie, confortée par le fait que les mitochondries ne sont pas éliminées chez les mutants Nix1, un gène nécessaire à la mitophagie (**DIA VII.20**). Je passe sur les autres types cellulaires et après ce

bain de jouvence, je retourne à notre longévité et au rôle de l'autophagie dans les maladies neurodégénératives.

Je pars de la revue de Ralph Nixon (*Nature Med.*, 19 : 983-997, 2013), qui dit que dans les maladies neurodégénératives, l'autophagie déraile et que selon l'endroit où ça déraile (le mécanisme est complexe), la pathologie prend des formes particulières, non sans conséquences sur les thérapies ciblées sur l'autophagie. Nous nous concentrerons sur la macroautophagie – dont nous savons qu'elle est définie par les étapes présentées en **DIA VII.21** avec un phagophore qui se transforme en autophagosome, lequel peut fusionner avec les endosomes tardifs ou les MVB – mais surtout avec les lysosomes ce qui entraîne la dégradation des éléments ingérés et la libération des métabolites dans le cytoplasme. La formation du phagophore est donc une étape essentielle et on peut voir dans la même **DIA VII.21**, que TORC1 a une action négative quand AMPK a une action positive sur l'induction du complexe. Ce qui est en lien avec le métabolisme puisque l'AMPK est induite par une augmentation du rapport AMP/ATP (cours de la semaine dernière) et que TORC1 est activé dans le cas de nutrition abondante (son inhibition par la rapamycin est synonyme de restriction calorique, on s'en souvient). L'initiation est suivie de l'élongation puis de la formation de la vacuole, avec l'intervention de différents gènes ATG, introduits plus haut. Sur ce schéma sont aussi indiquées les étapes qui sont affectées dans certaines maladies, dont HD et PD, HD pour l'initiation et PD pour l'élongation du phagophore. La maladie de Lafora est une maladie neurologique très rare (une personne sur un million) qui se caractérise par une neurodégénérescence qui se manifeste à l'adolescence et aboutit à la mort en moins de dix années.

Pour entrer un peu dans les détails, il est notable qu'en dépit de sa complexité, ou à cause d'elle, la formation de l'autophagosome n'a pas été souvent invoquée dans les maladies neurodégénératives et il est même possible que dans certaines maladies, en particulier la maladie d'Alzheimer, l'induction de



l'autophagie pourrait même être excessive. Pour ce qui est de la maladie de Parkinson, l'autophagie est déficiente et cette déficience affecte plusieurs étapes de la formation de l'autophagosome. En commençant par l'accumulation d'agrégats d'alpha-synucléine, soit du fait de mutations dans le gène, soit à la suite d'une surexpression de cette protéine à la suite d'une triplification du gène, il semble que cette protéine agrégée pourrait inhiber l'activité d'une petite GTPase (hydrolyse du GTP) appelée Rab1A ce qui aurait pour effet d'empêcher la localisation correcte de Agt9 (**DIA VII.21**). Cet effet sur l'élongation de l'autophagosome diffère de ce qui est observé avec la maladie de Huntington qui, en fait, augmente le nombre d'autophagosomes, mais des autophagosomes déficients et incapables de charger les cargos du fait de l'interaction de l'*huntingtin* mutée (le produit du gène) avec la Beclin-1 (**DIA VII.21**).

Évidemment dans l'autophagie, une étape importante est la reconnaissance des substrats à dégrader. Des récepteurs présents à la surface de l'autophagosome sont nécessaires à la reconnaissance des structures (protéines et organelles) à éliminer. Parmi ces récepteurs, on notera LC3 (aussi associée aux microtubules) et le complexe Atg12-Atg5 (**DIA VII.21**). D'autres récepteurs comme P62, NBR1, Nix1, etc. (**DIA VII.22**) reconnaissent des protéines ubiquitinilées, ce qui permet leur élimination ou celle des organismes qui les portent (on se souvient de Nix1 pour la mitochondrie). Cette même **DIA VII.21** nous rappelle que l'ubiquitination de la mitochondrie et sa reconnaissance par le phagosome sont régulées par le couple PINK1/parkin, ce qui met en correspondance la maladie de Parkinson et les défauts d'autophagie. Toujours dans le cadre du Parkinson, on constate que les protéines ayant une séquence KFERQ, après fixation au récepteur LAMP2A, ont accès aux lysosomes, grâce à des molécules chaperonnes. L'expression de LAMP2A diminue avec l'âge et pourrait être responsable de l'apparition tardive des maladies liées à des protéines mal conformées ou synthétisées en excès ; là encore on pense à la maladie de Parkinson ou à

celle de Huntington.

L'étape suivante est la dégradation. Elle demande la fusion avec les lysosomes dont j'ai déjà décrit les propriétés. La **DIA VII.22** décrit les principales étapes qui conduisent à la dégradation. Grâce à LC3, qui lie les microtubules, le phagosome glisse sur ces « rails » en direction du MTOC, centre organisateur des microtubules. Comme les lysosomes, ou endosomes tardifs, ou corps multivésiculaires font de même (regarder la polarité des microtubules et le fait que le moteur est la dynein qui se déplace vers le pôle négatif des microtubules), les deux organelles se rencontrent et fusionnent pour constituer l'amphisome. La membrane interne est dégradée, la membrane externe recyclée et la digestion peut commencer, de façon régulée comme nous l'avons vu à l'occasion du développement sur les lysosomes. (**DIA VII.24**).

Je vais maintenant, grâce à l'article récent de Guo et ses collègues (*Nature Comm.* DOI : 10.1038) faire la fusion entre autophagie et stabilité du génome en passant par les rétrotransposons, entités dont je n'ai plus besoin de rappeler qu'elles constituent près de 40 % du génome chez les humains et que leur mobilisation (peu sont mobiles) et insertion dans le génome sont à l'origine de diversité, mais aussi de mutations et de cassures dans l'ADN (**DIA VII.25**). On peut donc imaginer que la digestion des rétrotransposons pourrait constituer une ligne de défense importante pour les organismes. Afin de localiser les LINE dans la cellule humaine HeLa, les auteurs ont cloné en 3' de l'ARN de LINE-1 (L1), une série de sites de fixation pour une protéine de phage bactérien (MS2) et exprimé la protéine MS2 fluorescente (MS2-GFP). Dans un tel système MS2 se fixe sur l'ARN et le rend visible dans l'UV. Ils ont alors utilisé la Bafilomycin A1, un inhibiteur de la dégradation du contenu de l'autophagosome qui agit en empêchant la fusion avec les lysosomes. La **DIA VII.26** illustre la présence de L1-MS2 en vert avec 65 % de spots verts qui co-localise avec LC3, (a,b) une protéine de la membrane des autophagosomes, nous venons de le voir. Il en est de même



pour les SINE, d'autres rétrotransposons, sur lesquels je ne reviens pas (c). L'addition de Bafilomycin induit une augmentation du nombre de ces spots (donc de l'ARN), ce qui est attendu si l'antibiotique bloque la dégradation du contenu de l'autophagosome. Le même résultat est obtenu par hybridation *in situ* contre les LINE, ce qui élimine la possibilité d'un artefact lié à la surexpression de LINE-MS2 (e-g).

L'étape suivante, biochimique, démontre l'association des LINE avec l'intérieur de l'autophagosome. Utilisant des marqueurs du réticulum endoplasmique (Calnexin) des mitochondries (Tom20) et des MVB (Alix), les auteurs caractérisent proprement leur fraction autophagosome avec LC3-II (**DIA VII.27, h**). La même DIA montre une absence d'enrichissement des messagers Glut4 et APP dans les autophagosomes. Le traitement des autophagosomes avec de la RNase (qui dégrade les ARNs) montre une forte protection des éléments transposables (LINE et Alu) dans la fraction enrichie en autophagosomes (i), ce qui suggère que ces ARN sont à l'intérieur du phagosome. Cette présence des transposons dans les autophagosomes doit se traduire par leur accumulation quand l'autophagie est inhibée à l'aide de siRNAs dirigés contre des Atg essentiels comme Atg5 (**DIA VII.27**). La **DIA VII.28** démontre que la concentration en LINE et Alu est augmentée en présence des siRNA dirigés contre ATG5 (a-c, c'est une autre technique qui démontre la même chose) et que la Bafilomycin augmente la durée de vie (traitement actinomycine) des ARNs LINE et SINE mais pas celle des ARN encodant l'actine et GAPDH (encore que leur stabilité en fasse de mauvais contrôles).

Cette modulation de la stabilité des LINE/SINE s'accompagne-t-elle d'une modulation de la rétrotransposition ? Utilisant un vecteur qui permet de mesurer la rétrotransposition en suivant l'expression de la GFP (**DIA VII.29**), il est alors démontré que le nombre de cellules n'est pas affecté par les traitements mais que la rétrotransposition est nettement augmentée par les siRNA dirigés contre Atg5.

Quid alors des protéines encodées par les LINE ? La **DIA VII.30** rappelle que ORF1p est encodé par LINE-1 (c'est une protéine qui lie l'ARN et permet son adressage au noyau), elle suggère surtout une association de GFP-ORF1 avec LC3-II et une augmentation de cette co-localisation par la Bafilomycin. Il en va de même pour la protéine endogène (c) qui colocalise en fractionnement subcellulaire avec LC3-II, un marqueur des autophagosomes. Je vais m'arrêter là pour cet article, mais d'autres expériences, dont je nous fais grâce, démontrent clairement que la concentration en LINE et SINE ainsi que le niveau de transpositions sont dépendant de l'activité des autophagosomes. Or nous savons – et je n'y reviens pas – que l'expression illégitime des LINE et SINE induit une forte instabilité génomique. À cette instabilité s'ajoute le fait que l'endonucléase ORF2p, qui est encodée par les LINE et nécessaire à leur insertion dans le génome après *reverse transcription* de l'ARN, induit des cassures double brin de l'ADN bien au-delà de ce qui est nécessaire pour cette insertion (Pépin *et al.*, *Biol. Reprod.* 88 : 142, 2013). Toutes ces considérations suggèrent fortement qu'un défaut d'autophagie peut conduire à un excès d'instabilité génétique.

Retournons pour conclure à notre camembert de départ et faisons-en le tour rapidement. Je crois que nous nous serons assez facilement convaincus que ce que j'avais suggéré il y a un plus d'un an, au début de cette série de cours sur la longévité cérébrale – mais pourquoi seulement cérébrale après tout ? – que ce camembert ne souffre pas d'être découpé en tranches. Je ne veux pas reprendre le cours ni même le résumer rapidement, mais si nous nous contentons de considérer l'instabilité génomique on voit immédiatement qu'elle n'est pas séparable des autres phénomènes illustrés par cette série de *hallmarks* et que cela est vrai indépendamment de la tranche de départ. La situation est donc beaucoup plus compliquée que ne le suggère ce nécessaire découpage qui a servi de trame à ces deux années de cours. Mais c'est normal, cela s'appelle la physiologie et c'est positif car ces différentes entrées dans la question de la longévité ou, si vous



préférez du vieillissement, cachent une très forte présence de régulation homéostatiques qui, sauf dérapage, ont pour effet de maintenir le système dans les limites de ce qui est physiologiquement acceptable. Mieux, elles ouvrent de nombreuses pistes pour les interventions thérapeutiques, qui d'année en année, pour certaines civilisations et classes sociales (restriction qu'on se doit de ne pas oublier), prolongent le vieillissement en bonne santé. Sur ces paroles optimistes, modérément, je vous vous remercie de votre patience avec des cours qui ne sont pas toujours faciles.

À l'année prochaine,... peut-être.