

UNIVERSITE DE NANTES
FACULTE DE MEDECINE

**REGULATION DES PROCESSUS AUTOPHAGIQUES
INDUITS PAR LA CARENCE NUTRITIVE :
ROLE DES PROTEINES DE LA FAMILLE DE BCL-2
ET DU FACTEUR DE TRANSCRIPTION HIF-1 α .**

THESE DE DOCTORAT

Ecole Doctorale Chimie-Biologie
Discipline : Science de la Vie et de la Santé
Spécialité : Cancérologie

présentée et soutenue publiquement par

MARHUENDA Fanny Brigitte Olivia

née BLAIN

le 30 Janvier 2008, devant le jury ci-dessous

Président : M. Juan Lucio IOVANNA, Directeur de Recherche, INSERM UMR624

Rapporteurs : M. Patrice CODOGNO, Directeur de Recherche, INSERM U756

M. Juan Lucio IOVANNA, Directeur de Recherche, INSERM UMR624

Examineurs :

Mme Nathalie MAZURE, Docteur ès Sciences, Contrat CNRS, CNRS UMR6542

M. Bernard LARDEUX, Chargé de Recherche, INSERM U539

Directeurs de thèse : Mme Frédérique BRAUN, Maître de conférence, INSERM UMR601

M. François VALLETTE, Directeur de recherche, INSERM UMR601

SOMMAIRE

<i>INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE</i>	2
I. LA MACRO-AUTOPHAGIE	2
1.1. LE PROCESSUS AUTOPHAGIQUE	3
1.2. ROLE PHYSIOLOGIQUE DE L'AUTOPHAGIE	4
1.2.1. Rôle dans le maintien de l'homéostasie	4
1.2.2. Rôle dans le développement	5
1.3. DEREGULATION DE L'AUTOPHAGIE ET PATHOLOGIES	7
1.3.1. Autophagie et maladies neurodégénératives	7
1.3.2. Autophagie et myopathies	7
1.3.3. Autophagie et cancer	8
II. ACTIVATION ET REGULATION DE L'AUTOPHAGIE	9
2.1. LA FORMATION DE L'AUTOPHAGOSOME AU NIVEAU MOLECULAIRE	9
2.1.1. Les systèmes de conjugaison et leur rôle dans la formation de l'autophagosome	10
2.1.2. Le rôle pro-autophagique du complexe PI3-Kinase de classe III / Beclin-1	13
2.2. L'INACTIVATION DE MTOR EST UNE ETAPE CLE AU DEVELOPPEMENT DE L'AUTOPHAGIE	16
2.2.1. Structure du complexe TOR	16
2.2.2. Régulation de mTOR	18
2.2.3. Fonction de mTORC1	20
➤ <i>Rôle de mTORC1 dans la traduction</i>	20
➤ <i>Rôle de mTORC1 dans la régulation de l'autophagie</i>	21
2.3. LA VOIE DES FACTEURS DE CROISSANCE ET LA REGULATION DE L'AUTOPHAGIE PAR LES PHOSPHOINOSITIDES 3 KINASES DE CLASSE I	22
2.4. REGULATION DE L'AUTOPHAGIE PAR LES ACIDES AMINES ET LE GLUCOSE	25
2.4.1. Régulation par les acides aminés	25
2.4.2. Régulation par le glucose	26
III. AUTOPHAGIE ET MORT CELLULAIRE	29
3.1. AUTOPHAGIE OU MORT CELLULAIRE PROGRAMMEE DE TYPE II	29
3.2. INTERCONNEXIONS ENTRE L'APOPTOSE ET L'AUTOPHAGIE	33
IV. REPONSE A L'HYPOXIE INDUITE PAR HIF-1α (<i>HYPOXIA INDUCIBLE FACTOR 1α</i>)	38
4.1. ACTIVATION D'HIF-1 EN REPONSE A L'HYPOXIE	38
4.1.1. Découverte d'HIF-1	38
4.1.2. Régulation de la stabilité d'HIF-1 α par la protéine Von Hippel Lindau (VHL)	41
4.1.3. Régulation de l'expression et de l'activité transcriptionnelle d'HIF-1 α indépendante des	

hydroxylases et de VHL	45
➤ <i>Régulation de l'expression d'HIF-1α</i>	46
➤ <i>Régulation de la stabilité de HIF-1α via son interaction avec des facteurs différents des hydroxylases</i>	47
➤ <i>Régulation de la localisation de HIF-1α</i>	49
➤ <i>Régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1α</i>	50
4.2. IMPLICATION D'HIF-1 ET DE SES CIBLES DANS LA REPONSE HYPOXIQUE	52
4.3. PRESENTATION DETAILLEE DE DEUX CIBLES DE HIF-1 : LES PROTEINES VEGF ET BNIP3	55
4.3.1. Le VEGF (<i>Vascular Endothelium Growth Factor</i>)	55
4.3.2. BNIP3 (<i>Bcl-2/E1B Nineteen Interacting Protein</i>)	57
4.4. HIF-1 ET PROCESSUS DE MORT CELLULAIRE	58
4.5. LIENS ENTRE HYPOXIE ET AUTOPHAGIE	61
V. PROBLEMATIQUE	65

MATERIELS ET METHODES **68**

I. CULTURE CELLULAIRE	68
1.1. ENTRETIEN	68
1.2. TRANSFECTION TRANSITOIRE	68
1.3. PRODUCTION ET UTILISATION DE PARTICULES LENTIVIRALES	69
1.3.1. Construction de shARNs	69
1.3.2. Production des particules lentivirales	70
1.3.3. Titration des particules virales	71
1.3.4. Infection des HCT116	71
1.3.5. Séquences de shARNs utilisés	72
1.4. STRESS NUTRITIF ET HYPOXIQUE	73
1.4.1. Induction	73
1.4.2. Mesure de la prolifération et de la viabilité cellulaire	74
➤ <i>Mesure de la prolifération cellulaire</i>	74
➤ <i>Etude morphologique de la mort cellulaire par vidéomicroscopie</i>	74
➤ <i>Mesure de la viabilité cellulaire par mesure de la perméabilité membranaire à l'iodure de propidium</i>	74
1.4.3. Mesure de la capacité autophagique	75
➤ <i>Visualisation des vacuoles autophagiques par microscopie électronique à transmission</i>	75
➤ <i>Marquage des vacuoles autophagiques par le MDH</i>	76
➤ <i>Mesure de la dégradation des protéines à longue durée de vie par protéolyse</i>	76
1.5. IMMUNO-CYTOCHIMIE	77
II. BIOLOGIE MOLECULAIRE	78

2.1. EXTRACTION D'ARN	78
2.2. PUCES A ADN	79
2.2.1 Réalisation des puces à ADN	79
2.2.2. Techniques d'analyse des puces	80
2.3. PCR QUANTITATIVE EN TEMPS REEL	81
2.4. CONSTRUCTIONS BNIP3/BNIP3 Δ TM	83
III. IMMUNO-EMPREINTE (WESTERN BLOT)	83

RESULTATS **86**

I. REGULATION DE L'AUTOPHAGIE DE SURVIE PAR LES MEMBRES ANTI-APOPTOTIQUES DE LA FAMILLE DE BCL-2	86
1.1. LA CARENCE NUTRITIVE INDUIT UNE REPOSE DE TYPE AUTOPHAGIQUE DANS LES CELLULES HCT116 BAX-/-	86
1.1.1. Effet de la carence nutritive sur la viabilité cellulaire	86
1.1.2. La carence nutritive induit une réponse de type autophagique	88
1.2. LA CARENCE NUTRITIVE INDUIT UNE AUTOPHAGIE DE SURVIE DANS LES HCT116 BAX-/-	89
1.3. REGULATION DE L'AUTOPHAGIE DE SURVIE PAR BCL-2 ET BCL-XL DANS LES HCT116 BAX-/-	91

ARTICLE 1 : DIFFERENTIAL REGULATION OF PRO-SURVIVAL AUTOPHAGY BY BCL-2 AND BCL-XL **93**

II. REGULATION DE L'AUTOPHAGIE INDUITE PAR UNE CARENCE NUTRITIVE PAR LE FACTEUR DE TRANSCRIPTION HIF-1α ET SA CIBLE BNIP3	94
2.1. ETUDE TRANSCRIPTIONNELLE DE LA REPOSE A UNE CARENCE NUTRITIVE	94
2.1.1. La carence nutritive semble induire une réponse de type hypoxique en plus de la réponse autophagique	94
➤ <i>Etude des gènes impliqués dans l'autophagie</i>	98
➤ <i>Etude des gènes impliqués dans l'apoptose</i>	100
➤ <i>Etude des gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie</i>	102
2.1.2. Etude comparative de l'effet d'une carence nutritive et d'une carence en oxygène sur certains gènes impliqués dans ces réponses	103
➤ <i>Etude de Atg8/LC3 dans des conditions de carence nutritive ou d'hypoxie sévère</i>	104
➤ <i>Etude de Hif-1α dans des conditions de carence nutritive ou d'hypoxie</i>	105
➤ <i>Etude de gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie dans des conditions de carence nutritive ou d'hypoxie sévère</i>	106
➤ <i>Etude de l'expression de membres de la famille de Bcl-2 (Bnip3, Noxa et Mcl-1) dans des conditions de carence nutritive ou d'hypoxie sévère</i>	108

2.1.3. HIF-1 α est effectivement responsable de la sur-expression de ses cibles	110
2.2. COMPARAISON DE LA REPONSE AUTOPHAGIQUE INDUITE PAR LA CARENCE NUTRITIVE ET PAR L'HYPOXIE SEVERE	113
2.2.1. Comparaison de l'autophagie induite par une carence nutritive et par l'hypoxie dans les HCT116 Bax-/-	113
2.2.2. Comparaison de l'expression et de la localisation d'HIF-1 α lors d'une carence nutritive et dans des conditions hypoxiques	116
2.2.3. La sous-expression d'HIF-1 α semble diminuer la capacité autophagique des HCT116 Bax-/- lors d'une carence nutritive uniquement	118
2.2.4. La diminution de la capacité autophagique dans les cellules déficientes en HIF-1 α n'est pas due à une ré-activation de mTOR	124
2.3. ETUDE DE DEUX CIBLES DE HIF-1 α DANS LA REPONSE AUTOPHAGIQUE INDUITE PAR UNE CARENCE NUTRITIVE : VEGF ET BNIP3	125
2.3.1. VEGF ne semble pas impliqué dans la régulation de l'autophagie	125
2.3.2. BNIP3 semble impliquée dans la régulation de l'autophagie	127
2.3.3. La réintroduction de BNIP3 restaurerait la capacité autophagique des cellules déficientes en HIF-1 α	129

ARTICLE 2 : HIF-1A AND BNIP3 ARE INVOLVED IN AUTOPHAGY PROCESS IN RESPONSE TO SERUM-NUTRIENT STARVATION **133**

III. ÉTUDE DE LA REGULATION DE L'AUTOPHAGIE ET DE HIF-1 α **134**

3.1. P53 N'EST PAS IMPLIQUEE DANS LA REGULATION DE L'AUTOPHAGIE INDUITE PAR UNE CARENCE NUTRITIVE DANS LES HCT116 BAX-/-	134
3.2. ETUDE DES VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES DANS LA REGULATION DE L'ACTIVITE D'HIF-1 α DANS LA REPONSE AUTOPHAGIQUE INDUITE PAR UNE CARENCE NUTRITIVE	137

DISCUSSION **141**

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES **152**

ANNEXE 1 : SIMILARITY AND DIVERGENCE BETWEEN THE RNA POLYMERASE ALPHA SUBUNITS FROM HYPERTHERMOPHILIC *THERMOTOGA MARITIMA* AND MESOPHILIC *ESCHERICHIA COLI* BACTERIA. **166**

ANNEXE 2 : APOPTOSIS, HYPOXIA AND NEURAL TOXICITY **167**

Liste des figures

<i>Figure 1</i> : Déroulement de l'autophagie (Rubinsztein <i>et al.</i> , 2007).....	4
<i>Figure 2</i> : Les mutants pour les gènes <i>atg</i> présentent une différenciation induite par un stress ou un développement anormaux (Mizushima, 2005).....	6
<i>Figure 3</i> : Les mécanismes de conjugaison impliqués dans la formation de l'autophagosome (Hamacher-Brady <i>et al.</i> , 2006).....	11
<i>Figure 4</i> : Interconnexions entre les systèmes de conjugaison (d'après (Tanida <i>et al.</i> , 2004)).	13
<i>Figure 5</i> : Complexe PI3-Kinases de classe III/Beclin-1 (Levine & Yuan, 2005).....	14
<i>Figure 6</i> : Régulation de l'autophagie par le complexe PI3-Kinase de classe III.....	15
<i>Figure 7</i> : Structure et principales fonctions des complexes mTOR (Wullschleger <i>et al.</i> , 2006).	17
<i>Figure 8</i> : Régulation par TOR du complexe d'initiation de l'autophagie chez la Levure.....	21
<i>Figure 9</i> : Régulation de l'autophagie par les facteurs de croissance <i>via</i> les PI3-Kinases de classe I (d'après (Nobukuni <i>et al.</i> , 2007)).	22
<i>Figure 10</i> : Une carence en glucose induit l'activation de l'AMPK et l'inactivation de mTOR (d'après (Richardson <i>et al.</i> , 2004)).	27
<i>Figure 11</i> : Récapitulatif des différentes voies majeures impliquées dans la régulation de l'autophagie (Meley <i>et al.</i> , 2006).	28
<i>Figure 12</i> : Exemples de mort autophagique et apoptotique en MET. A. Cellules Jurkat traitées avec FasL en apoptose : condensation de la chromatine, condensation du cytoplasme. B. MCF7 traitées avec du tamoxifène : absence de condensation de la chromatine, présence de nombreux autophagosomes (Levine & Yuan, 2005). C. Schéma simplifié de l'apoptose.	30
<i>Figure 13</i> : ATG5 et ses rôles autophagique et apoptotique (Codogno & Meijer, 2006).....	36
<i>Figure 14</i> : Structure de HIF-1 α et HIF-1 β (Gothie & Pouyssegur, 2002).	40
<i>Figure 15</i> : Mode d'action d'HIF-1 α (Gothie & Pouyssegur, 2002).....	41
<i>Figure 16</i> : Régulation de la stabilité d'HIF-1 α par des hydroxylations.	43
<i>Figure 17</i> : L'hydroxylation de HIF-1 α par FIH semble faire intervenir au préalable des interactions entre FIH et VHL (Lee <i>et al.</i> , 2003).	44
<i>Figure 18</i> : Structure des différentes isoformes de <i>vegf</i> (d'après (Woolard <i>et al.</i> , 2004)).	56
<i>Figure 19</i> : L'hypoxie induit également l'inhibition de mTOR (Mamane <i>et al.</i> , 2006).....	62
<i>Figure 20</i> : Comparaison de l'effet d'une carence nutritive de 48 h sur la survie des cellules HCT116 Bax ^{-/-} et des HeLa par vidéo-microscopie (Priault <i>et al.</i> , Figure 2A).	86
<i>Figure 21</i> : Mesure de l'activité des caspases de deux lignées cancéreuses en réponse à différents traitements.	87

<i>Figure 22</i> : Présence de vacuoles autophagiques dans les HCT116 Bax ^{-/-} soumises à une carence nutritive par rapport au milieu complet.....	89
<i>Figure 23</i> : L'autophagie induite par la carence nutritive chez les HCT116 Bax ^{-/-} est un processus de survie cellulaire (Priault <i>et al.</i> , Figure 2C).....	90
<i>Figure 24</i> : Répartition des différents gènes représentés sur les cancéropuces de l'IFR 26....	95
<i>Figure 25</i> : Représentation schématique des résultats des puces à ADN.	97
<i>Figure 26</i> : Quantification relative de l'expression d' <i>Atg8/LC3</i> par Q-PCR.....	104
<i>Figure 27</i> : Quantification relative de l'expression d' <i>Hif-1α</i> par Q-PCR.	105
<i>Figure 28</i> : Quantification relative de l'expression du <i>Vegf</i> , de l' <i>Egfr</i> , de l' <i>Enolase</i> et de <i>Glut-1</i> par Q-PCR (E, pour EBSS ; H, pour Hypoxie).	106
<i>Figure 29</i> : Quantification relative de l'expression de <i>Bnip3</i> , de <i>Noxa</i> et de <i>Mcl-1</i> par Q-PCR. (E, pour EBSS ; H, pour Hypoxie).....	109
<i>Figure 30</i> : Mesure de la prolifération des HCT116 Bax ^{-/-} shHIF-1α.....	111
<i>Figure 31</i> : Effet de la sous-expression d' <i>Hif-1α</i> sur la régulation de l'expression de <i>Vegf</i> , <i>Bnip3</i> et <i>Egfr</i> par Q-PCR. (E, pour EBSS ; H, Hypoxie, shHIF-1a, shARN contre HIF-1α).....	112
<i>Figure 32</i> : MET de cellules HCT116 Bax ^{-/-} soumises à des conditions de carence nutritive ou d'hypoxie sévère.	114
<i>Figure 33</i> : Marquage par le MDH des cellules HCT116 Bax ^{-/-} en conditions de carence nutritive (EBSS) ou en conditions hypoxiques. A et B. Photos des cellules dans les conditions de carence nutritive ou hypoxique. C. Quantification du marquage par le MDH (n=8 en milieu complet (MC) et EBSS; n=3 en hypoxie).	115
<i>Figure 34</i> : Immuno-empreinte dirigée contre HIF-1α dans des HCT116 Bax ^{-/-} en milieu complet (MC), soumises à une carence nutritive (E) et soumises à des conditions d'hypoxie (H) pendant 9, 16 et 24 h.....	116
<i>Figure 35</i> : Immuno-cytologie contre HIF-1α dans les cellules HCT116 Bax ^{-/-}	117
<i>Figure 36</i> : Immuno-empreinte dirigée contre Beclin-1 dans les cellules HCT116 Bax ^{-/-} shLuciférase et shBeclin-1.	118
<i>Figure 37</i> : Marquage par le MDH des cellules HCT116 Bax ^{-/-} en conditions de carence nutritive (A/C) ou en conditions hypoxiques (B/D). E. Quantification du marquage par le MDH (n=4).....	120
<i>Figure 38</i> : MET de cellules HCT116 Bax ^{-/-} shHIF-1α en conditions de carence nutritive ou d'hypoxie.....	121
<i>Figure 39</i> : Analyse des images de MET des HCT116 Bax ^{-/-} soumises à une carence nutritive. A. Bilan des données concernant le nombre et la taille des vacuoles autophagiques. Répartition du nombre (B) et de la surface (C) des vacuoles par cellule.	123
<i>Figure 40</i> : Phosphorylation de 4EBP1, cible de mTOR par immuno-empreinte	124
<i>Figure 41</i> : Validation par Q-PCR de l'extinction de VEGF par les shARNs.....	125

<i>Figure 42</i> : Mesure de l'activité autophagique des cellules HCT116 shVEGF. A. et B. Photos des cellules shLuciférase et shVEGF lors d'une carence nutritive. C. Quantification du nombre de cellules possédant des autophagosomes (n=3).	126
<i>Figure 43</i> : Validation par Q-PCR de l'extinction de BNIP3 par les shARNs.....	127
<i>Figure 44</i> : Mesure de l'activité autophagique des cellules HCT116 Bax ^{-/-} shBNIP3. A. et B. Photos des cellules shLuciférase et shBNIP3 lors d'une carence nutritive. C. Quantification du nombre de cellules possédant des autophagosomes (n=4).	128
<i>Figure 45</i> : Mesure de l'activité autophagique des cellules HCT116 shLuciférase et shHIF-1 α transfectées par un vecteur vide, un plasmide codant pour BNIP3 et pour BNIP3 Δ TM. A. Validation de la sur-expression de BNIP3 et de BNIP3 Δ TM par immuno-empreinte anti-V5. B. Quantification du nombre de cellules possédant des autophagosomes dans des conditions contrôle (MC) ou en milieu carencé (EBSS) (n=3).	130
<i>Figure 46</i> : Validation par Q-PCR de l'extinction de HIF-1 α et BNIP3 par les shARNs.....	131
<i>Figure 47</i> : Effet de la sous-expression de BNIP3 et d'HIF-1 α sur la capacité autophagique des HCT116 Bax ^{-/-} analysé par marquage par le MDH	132
<i>Figure 48</i> : Validation de l'extinction de Bax dans la lignée HCT116 p53 ^{-/-} par immuno-empreinte (A) et par mesure de la survie cellulaire lors d'une carence nutritive (B). ...	134
<i>Figure 49</i> : Mesure de l'activité autophagique des HCT116 déficientes en p53. A. Protéolyse des HCT116 p53 ^{+/+} Bax ^{-/-} , des HCT116 p53 ^{-/-} Bax ^{+/+} (shLuciférase) et des p53 ^{-/-} shBax392. B. Mesure du marquage des autophagosomes avec le MDH dans les HCT116 p53 ^{+/+} bax ^{-/-} et p53 ^{-/-} shBax392. C. Immuno-empreinte contre 4EBP1 dans les cellules HCT116 p53 ^{-/-} shBax392 en milieu complet et lors d'une carence nutritive de 9 h.....	136
<i>Figure 50</i> : Effet de l'inhibition des MAPK et des PI3-kinases sur la capacité autophagique et sur l'activité d'HIF-1 α dans la lignée HCT116 Bax ^{-/-} . A. Protéolyse en milieu complet et en milieu carencé pendant 9 h en présence ou en absence de ces inhibiteurs. B. Quantification relative de l'expression d' <i>Hif-1α</i> , de <i>Bnip3</i> et de <i>Vegf</i> par Q-PCR (EBSS 9 h).....	138

Liste des tableaux

<i>Tableau 1</i> : Récapitulatif des orthologues humains des gènes <i>atg</i> identifiés et de leur fonction.	10
<i>Tableau 2</i> : Liste des principaux gènes dont l'expression est activée par HIF-1	54
<i>Tableau 3</i> : Liste des gènes et des séquences ciblées par les shARNs utilisés. En gras, apparaissent les shARNs permettant une bonne extinction de la cible dans les HCT116 Bax-/-.....	72
<i>Tableau 4</i> : Liste des anticorps utilisés en immuno-cytologie	78
<i>Tableau 5</i> : Amorces et températures utilisées pour la Q-PCR.....	82
<i>Tableau 6</i> : Liste des anticorps utilisés avec leur isotype, leur dilution et leur fournisseur.....	84
<i>Tableau 7</i> : Pourcentage de gènes validés, de gènes sur- et sous-exprimés dans les cancéropuces selon la lignée et le traitement (seuils fixés arbitrairement).	95
<i>Tableau 8</i> : Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la régulation ou le déroulement de l'autophagie. En rouge, sont indiquées les sur-expressions ; en grisé, absence de valeur statistiquement significative par manque de données analysables (NaN ou V) ou à cause d'un coefficient de variation trop fort (>20).	99
<i>Tableau 9</i> : Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la régulation ou le déroulement de l'apoptose. En rouge, sont indiquées les sur-expressions ; en grisé, absence de valeurs statistiquement significatives par manque de données analysables (NaN ou V) ou à cause d'un coefficient de variation trop fort (>20).	101
<i>Tableau 10</i> : Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la régulation ou le déroulement de l'autophagie. En rouge, sont indiquées les sur-expressions ; en grisé, absence de valeurs statistiquement significatives par manque de données analysables (NaN ou V) ou à cause d'un coefficient de variation trop fort (>20).....	103

INTRODUCTION
BIBLIOGRAPHIQUE

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

I. La macro-autophagie

Le terme «autophagie» provient du grec *autos* pour soi-même et *phagein* pour manger. Il signifie donc se manger soi-même. A l'état basal, l'autophagie est un processus catabolique essentiel impliqué dans la dégradation des protéines à longue durée et le renouvellement des organelles inutiles ou endommagées. L'autophagie peut être activée lors d'une carence nutritive. Il existe trois types d'autophagie : l'autophagie influencée par des chaperonnes, la micro-autophagie et la macro-autophagie. La première est responsable de la dégradation de protéines cytosoliques contenant un motif peptidique particulier (KFERQ) par les lysosomes. A la différence de la micro- et de la macro-autophagie, elle ne nécessite pas l'intervention de processus de transport vésiculaire (Majeski & Dice, 2004). La micro-autophagie est un processus moins bien connu. Elle se caractérise par l'invagination de parties de cytoplasme à la surface même des lysosomes et permet ainsi l'internalisation de protéines, d'agrégats protéiques voire même de certaines organelles (peroxysomes) ou de portions de noyau. A la différence de la micro-autophagie, la macro-autophagie, appelée simplement autophagie, est un processus catabolique lysosomal qui implique la formation de structures particulières à double membrane appelées autophagosomes qui fusionneront par la suite avec des lysosomes. Seule la macro-autophagie sera développée dans la suite de ce mémoire (pour revue, (Yorimitsu & Klionsky, 2005).

1.1. Le processus autophagique

Après la découverte des lysosomes par de Duwe et Wattiaux dans les années 1960, l'autophagie a tout d'abord été étudiée pour son rôle physiologique dans le maintien de l'homéostasie tissulaire et dans la réponse à une carence nutritive dans certains organes comme le foie dans les années 1970 par les équipes de G.E. Mortimore et de P.O. Seglen (Meijer & Codogno, 2004). L'autophagie débute par la séquestration aspécifique d'une portion de cytoplasme par une double membrane appelée membrane pré-autophagosomale ou phagophore (cf. *Figure 1*). L'origine de cette membrane n'est pas encore totalement déterminée. En effet, sa composition particulière, très riche en lipides et pauvre en protéines, indique qu'elle ne provient pas de structures telles que le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi. Cette double membrane va s'allonger jusqu'à ce que ses extrémités fusionnent et de ce fait, elle permet l'isolement d'une partie du cytoplasme qui peut contenir des protéines, des ribosomes, des portions de réticulum endoplasmique ainsi que des mitochondries. La vésicule ainsi formée s'appelle un autophagosome et son diamètre peut varier de 300 nm et 900 nm, compatible avec la présence d'organelles. Les autophagosomes ne contiennent pas les enzymes nécessaires à la dégradation de leur contenu. Pour cela, ils doivent fusionner avec des lysosomes qui leur apportent les hydrolases acides nécessaires à leur fonction. La vésicule résultante s'appelle un autophagolysosome. La dégradation du contenu de l'autophagolysosome permet la production d'acides aminés, d'acides gras et de nucléotides qui peuvent alors être réutilisés pour de nouvelles biosynthèses ou pour produire de l'énergie (Levine & Yuan, 2005; Yorimitsu & Klionsky, 2005).

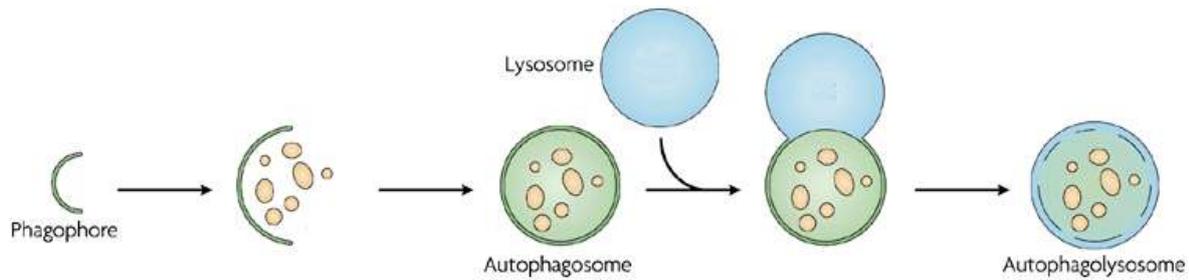


Figure 1 : Déroulement de l'autophagie (Rubinsztein *et al.*, 2007)

1.2. Rôle physiologique de l'autophagie

L'autophagie est un processus physiologique constitutif qui est impliqué chez les Mammifères dans de nombreux mécanismes comme la réponse à une carence nutritive, le contrôle de la croissance cellulaire, le développement, les mécanismes « anti-vieillessement » cellulaires et l'immunité (infection bactérienne et virale, toxine).

1.2.1. Rôle dans le maintien de l'homéostasie

L'autophagie joue un rôle important dans le maintien de l'homéostasie cellulaire en permettant la dégradation des protéines à longue durée de vie ainsi que la dégradation des organelles non nécessaires ou endommagées. Dans les années 2000, l'autophagie est apparue comme pouvant être un mécanisme agissant contre le vieillissement cellulaire. En effet, il a été observé que des mutations dans la voie de signalisation de l'insuline chez *Caenorhabditis elegans* ainsi qu'une restriction calorique permettent d'allonger sa durée de vie, or ces deux modifications régulent positivement l'autophagie. En outre, des signaux qui inhibent l'autophagie diminuent la durée de vie de *C. elegans* (Levine & Klionsky, 2004). Il a par ailleurs été démontré que ces mutants de *C. elegans* qui ont une durée de vie prolongée ou des

vers soumis à une restriction calorique sont résistants au stress oxydatif. L'autophagie activée dans ces conditions assure la dégradation des mitochondries endommagées ce qui tend à diminuer le niveau d'espèces activées de l'oxygène (ROS) et à protéger les cellules contre le stress oxydatif. Tout ceci contribue à l'allongement de la durée de vie de différentes espèces animales (Levine & Klionsky, 2004).

1.2.2. Rôle dans le développement

Une carence nutritive, une augmentation de température ou une densité cellulaire trop importante sont de puissants inducteurs de l'autophagie. Ces stress sont également capables dans certaines espèces d'Eucaryotes inférieurs d'induire une différenciation et/ou un développement pour procurer un avantage sélectif face à ces conditions défavorables. Il est donc apparu intéressant de déterminer si le processus autophagique pouvait être impliqué dans ces mécanismes.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyoselium discoideum* et *C. elegans*, il a été démontré que les gènes *atg* (*AuTophagy related gene*), gène pour lequel la protéine correspondante est impliquée dans la régulation de l'autophagie, jouaient un rôle clé dans cette différenciation induite par un stress (cf. *Figure 2*). En effet, chez *S. cerevisiae*, des mutants pour des gènes *atg* n'arrivent plus à sporuler lors d'une carence nutritive, la spore étant la forme de résistance face à différents stress. Lors d'une carence nutritive, *D. discoideum* se présente sous la forme de colonies multicellulaires. Des mutations dans les gènes *atg* diminuent la survie et déstructurent leur organisation. Chez *C. elegans*, une carence provoque le passage en larve *dauer*, qui est également une forme de résistance. Ces mutations n'empêchent pas l'initiation de cette transformation mais bloquent son développement normal et inhibent sa survie (Levine & Klionsky, 2004).

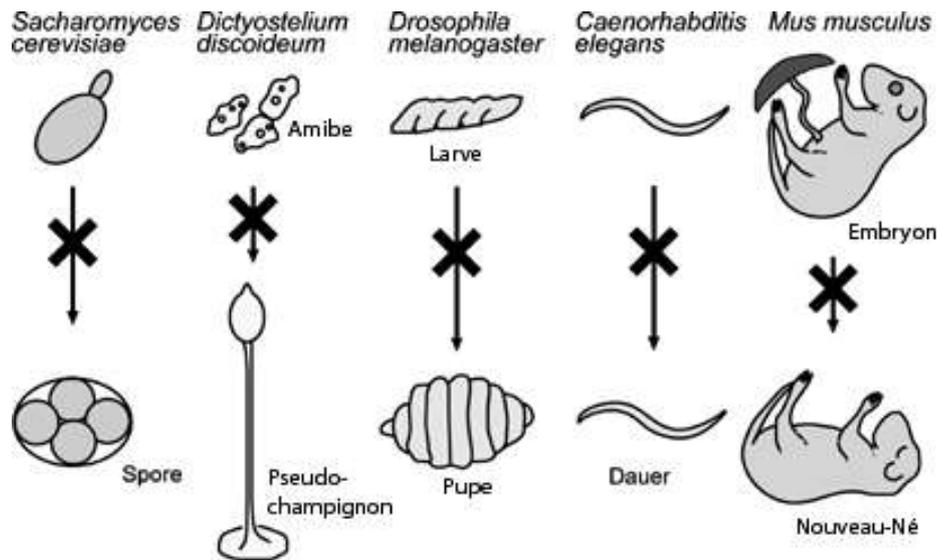


Figure 2: Les mutants pour les gènes *atg* présentent une différenciation induite par un stress ou un développement anormaux (Mizushima, 2005).

Dans ces différents cas, l'autophagie semble n'être qu'un moyen de survie en fournissant l'énergie et les constituants cellulaires nécessaires au passage à la forme de résistance.

Se posait alors la question de savoir si l'autophagie jouait un réel rôle dans le développement en étudiant son importance dans celui d'organismes Eucaryotes supérieurs. Par criblage de différents mutants *atg*, il apparaît que les gènes *atg* sont également importants dans les étapes précoces du développement chez la Drosophile et la Souris. Chez la Drosophile, des ARNs interférences contre *atg1*, *6*, *8* et *18* empêchent la métamorphose (*atg1*) ou induisent la mort avant même le premier stade larvaire. Chez la Souris, la délétion d'*atg6* ou d'*atg5* provoque respectivement une mortalité embryonnaire précoce ou à la naissance (Mizushima, 2005). L'autophagie est donc un processus cellulaire impliqué dans le développement.

1.3. Dérégulation de l'autophagie et pathologies

1.3.1. Autophagie et maladies neurodégénératives

L'accumulation de protéines toxiques ou mutantes est responsable de certaines maladies neurodégénératives (Parkinson, Huntington, Alzheimer). En effet, ces protéines mutées ont une forte tendance à s'agrèger. L'autophagie permettant la dégradation des agrégats protéiques, il s'est alors posé la question de savoir si elle était ou non active dans ces pathologies. La présence de caractéristiques morphologiques de l'autophagie a été mise en évidence dans de nombreux cas. Par ailleurs, mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*), la principale kinase régulant l'autophagie semble être piégée dans ces agrégats ce qui permet le développement de l'autophagie. Malheureusement d'autres protéines pro-autophagiques comme Atg6/Beclin-1 (*BCL-2 Interacting protein*) peuvent l'être également ce qui diminue alors fortement l'activité autophagique. En outre, des Souris déficientes pour l'autophagie au niveau neuronal présentent une forte neurodégénérescence. L'autophagie apparaît alors comme un élément protecteur essentiel de ce type cellulaire. Une meilleure compréhension des mécanismes mis en jeu dans ces pathologies ainsi que la modulation de l'autophagie pourraient permettre d'élaborer de nouvelles voies thérapeutiques (Levine & Yuan, 2005; Meijer & Codogno, 2006).

1.3.2. Autophagie et myopathies

Certaines myopathies sont caractérisées par une surcharge lysosomale. Celle-ci peut être causée par le défaut de protéines de la membrane lysosomale (maladie de Danon) ou impliquées dans le trafic vésiculaire et le transport intracellulaire (maladie de Niemann-Pick

type C). La maladie de Danon (ou glycogénose lysosomale à activité maltase acide normale) est une glycogénose lysosomale due au déficit en LAMP-2 (*Lysosomal-Associated Membrane Protein 2*). Les fonctions précises de cette protéine sont inconnues mais elle semble jouer un rôle important dans l'autophagie. Son inactivation empêche la dégradation du contenu des lysosomes et conduit à une accumulation de vacuoles autophagiques (Meijer & Codogno, 2006).

1.3.3. Autophagie et cancer

Les cellules cancéreuses possèdent une capacité autophagique diminuée par rapport à celle des cellules saines. Pourtant, l'autophagie peut procurer un avantage sélectif à la cellule cancéreuse en fournissant de l'énergie et des nutriments quand celle-ci se trouve dans un milieu carencé (Levine & Yuan, 2005). En effet, la croissance tumorale étant forte, la néovascularisation n'est pas assez rapide et ne permet pas d'apporter les ressources nécessaires à leur survie. Les cellules tumorales se trouvent donc en carence nutritive et l'autophagie est donc activée. Il semblerait donc qu'il faille diminuer l'autophagie des cellules cancéreuses pour les tuer.

De manière surprenante, de nombreux activateurs de l'autophagie ont été identifiés comme étant des suppresseurs de tumeurs : Atg6/Beclin-1, PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), TSC1/2 (*Tuberous Sclerosis Complex*), p53, DAPk (*Death Associated Protein Kinase*), ... A l'inverse, les inhibiteurs de l'autophagie sont des oncogènes dont Akt, PhosphoInositide 3-Kinases (PI3-Kinases) de classe I, mTOR et myc (Marx, 2006). Les mécanismes impliqués dans le rôle anti-tumoral de l'autophagie ne sont pas clairement élucidés (Levine & Yuan, 2005). L'autophagie, en éliminant les mitochondries endommagées,

pourrait réduire le stress oxydatif et donc l'effet mutagène et protégerait la cellule de la transformation tumorale (Hippert *et al.*, 2006).

II. Activation et régulation de l'autophagie

2.1. La formation de l'autophagosome au niveau moléculaire

Les bases moléculaires de l'autophagie ont été caractérisées chez la Levure *Saccharomyces cerevisiae* au milieu des années 1990. 27 gènes *atg* (*AuTophagy-related genes*) impliqués dans le processus autophagique ont été identifiés. Plus récemment, de nombreux gènes orthologues ont été trouvés chez des Eucaryotes supérieurs tels que les Mammifères (Souris, 17 gènes), les Insectes (*Drosophila*) ainsi que chez les Plantes (*Arabidopsis*) ce qui souligne la grande conservation de ce mécanisme au cours de l'évolution (Yorimitsu & Klionsky, 2005)(cf. *tableau 1*).

Quatre groupes fonctionnels de gènes *Atg* peuvent être distingués (Meley *et al.*, 2006) :

- un complexe sérine-thréonine kinase régulé par la protéine kinase mTOR (*mammalian Target Of Rapamycin*) : Atg1, Atg13 et Atg17 ;
- un complexe permettant la formation de l'autophagosome : Atg6, Atg14, Vps34, Vps15 ;
- deux complexes de conjugaison assurant l'élongation de la membrane autophagosomale : Atg5/Atg12 et Atg8/phosphatidyléthanolamine et les protéines du système ubiquitine-like (Atg 3, Atg7, Atg10) ;
- un complexe de recyclage : Atg2, Atg9 et Atg18.

<i>Atg (Levure)</i>	Orthologues humains	Rôle
Atg1	ULK1(Unc-51-like kinase)	Interagit avec GATE-16 et GABARAP
Atg3	hAtg3/hApg3	Enzyme E2-like pour LC3, GABARAP, et GATE-16
Atg4	hAtg4A/HsAtg4A/HsAtgG4 /Autophagine-2	Cystéine protéase pour GATE-16
	hAtg4B/HsAtg4B/HsApg4B /Autophagine-1	Cystéine protéase pour LC3, GABARAP et GATE-16 ; enzyme de délipidation pour LC3-II et GABARAP
	hAtg4C/HsAUTL1/ Autophagine-3	Cystéine protéase
	hAtg4D/Autophagine-4	
Atg5	hAtg5/hApg5	Cible d'ATG12
Atg6	Beclin-1	Associé dans le complexe PI3- Kinases de classe III avec hVps34 et hVps15 et aussi Apg14 ou Vps38
Atg7	hAtg7/HsGSA7/hApg7	Enzyme E1-like pour Atg12 et Atg8
Atg8	LC3	Formation des autophagosomes. Conjugué au phosphatidyléthanolamine
	GABARAP	Formation des autophagosomes
	GATE-16	Formation des autophagosomes
	Atg8L/Apg8L	Fonction inconnue
Atg12	hAtg12/hApg12	Formation du conjugué Atg12-Atg5

Tableau 1 : Récapitulatif des orthologues humains des gènes *atg* identifiés et de leur fonction. (d'après (Tanida *et al.*, 2004)).

2.1.1. Les systèmes de conjugaison et leur rôle dans la formation de l'autophagosome

Les protéines Atg participant à la formation de l'autophagosome sont recrutées hiérarchiquement et de façon transitoire sur sa membrane. Sa formation repose essentiellement sur deux systèmes de conjugaison, similaires à l'ubiquitination et la sumoylation des protéines (cf. *Figure 3*).

Le premier concerne les protéines Atg12 et Atg5. Atg12, une protéine ubiquitine-like, est liée de façon covalente à la protéine Atg5. Cette réaction nécessite l'intervention de deux autres protéines Atg7 et Atg10 qui fonctionnent respectivement comme l'enzyme d'activation E1 et comme l'enzyme de conjugaison E2 du système d'ubiquitination des protéines. En effet, Atg12 va être activée par sa liaison à Atg7 (enzyme E1 like) *via* un pont thioester. La deuxième étape consiste au transfert transitoire vers Atg10 (enzyme E2 like). Pour finir, un résidu glycine dans la partie carboxyterminale d'Atg12 est fixé de façon covalente à un résidu lysine au centre d'Atg5. Le conjugué Atg5-Atg12 peut alors interagir avec la région carboxyterminale d'Atg16 et forme ainsi des homo-oligomères (Yorimitsu & Klionsky, 2005).

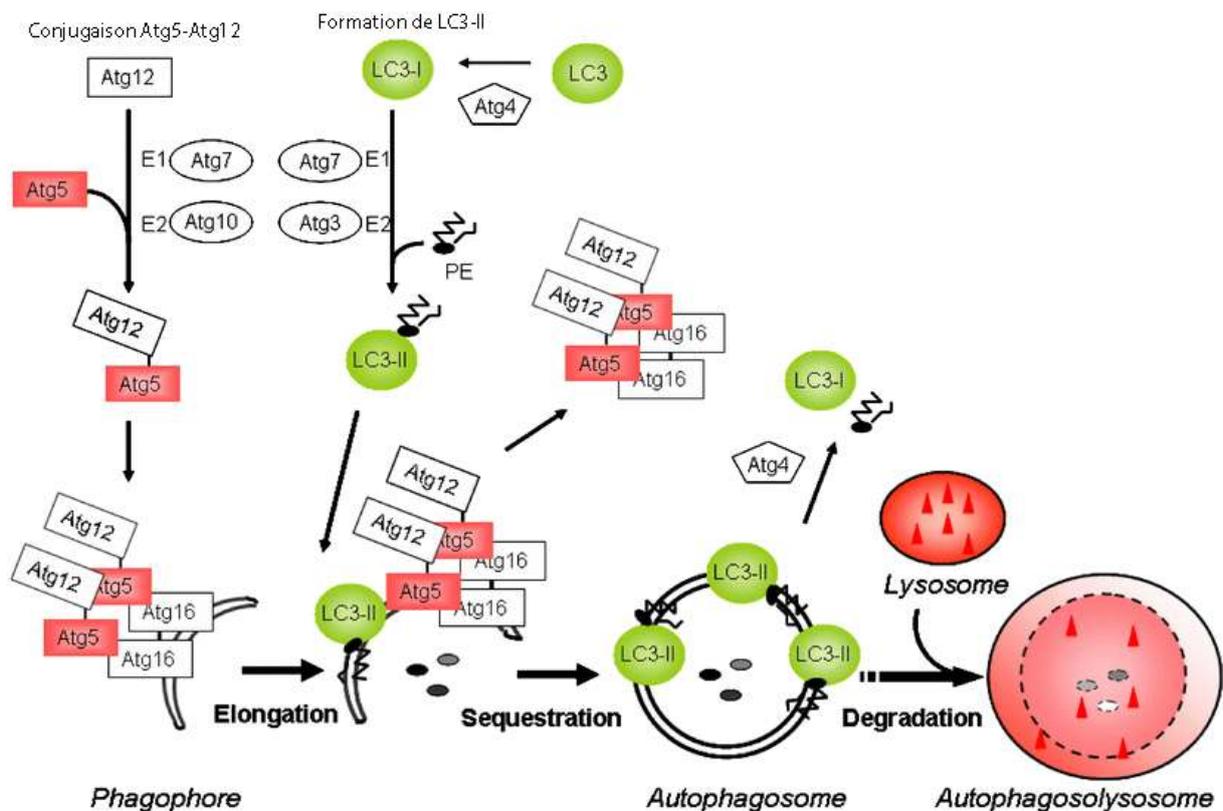


Figure 3: Les mécanismes de conjugaison impliqués dans la formation de l'autophagosome (Hamacher-Brady *et al.*, 2006).

Le second procédé de conjugaison permet l'ancrage d'un lipide, le phosphatidyl-éthanolamine (PE) sur la protéine Atg8 dont l'orthologue chez les Mammifères est appelée MAP-LC3 ou LC3 (*Microtubule-Associated Protein Light Chain-3*). Dans un premier temps, le dernier résidu arginine en région carboxyterminale de LC3 est clivé par la cystéine protéase Atg4 ce qui donne naissance à la forme LC3-I. Celle-ci est ensuite activée par Atg7 et transférée vers Atg3 (enzyme E2 like). LC3-I est ensuite couplée au PE, ce conjugué s'appelle alors LC3-II et peut s'insérer dans la membrane en formation (Tanida *et al.*, 2004).

Le premier conjugué, formé des protéines Atg5-Atg12, permet le recrutement du deuxième conjugué à la membrane pré-autophagosomale. Ce complexe Atg5-Atg12 n'est pas retrouvé dans les autophagosomes. Il serait impliqué dans l'élongation de la membrane pré-autophagosomale et/ou dans sa courbure. Il est ensuite recyclé vers le cytosol avant la formation complète de l'autophagosome. Seul le conjugué LC3-II est retrouvé dans la membrane des autophagosomes. Comme la protéine Atg4 hydrolyse la liaison entre LC3-I et le PE, seule une fraction du complexe LC3-II reste associée à la membrane interne de l'autophagosome constituant un marqueur spécifique de cet organite, le LC3 clivé est lui recyclé dans le cytoplasme (Yorimitsu & Klionsky, 2005).

Il y a de nombreuses interconnexions entre ces deux processus de conjugaison (cf. *Figure 4*) (Tanida *et al.*, 2004). En effet, des Souris déficientes pour *Atg5* ont également un défaut de conjugaison pour Atg8. En outre, Atg3, l'enzyme E2 like de la conjugaison d'Atg8, peut interagir avec le conjugué Atg5-Atg12 tandis que Atg10 (enzyme E2 de la conjugaison Atg5-Atg12) peut, elle, interagir avec Atg8. Pour finir, des concentrations excessives du complexe Atg5-Atg12 inhibent la conjugaison d'Atg8 alors qu'une sur-expression d'Atg10 la favorise. Ces deux étapes de conjugaison essentielles pour la formation des structures autophagiques se régulent donc étroitement l'une l'autre.

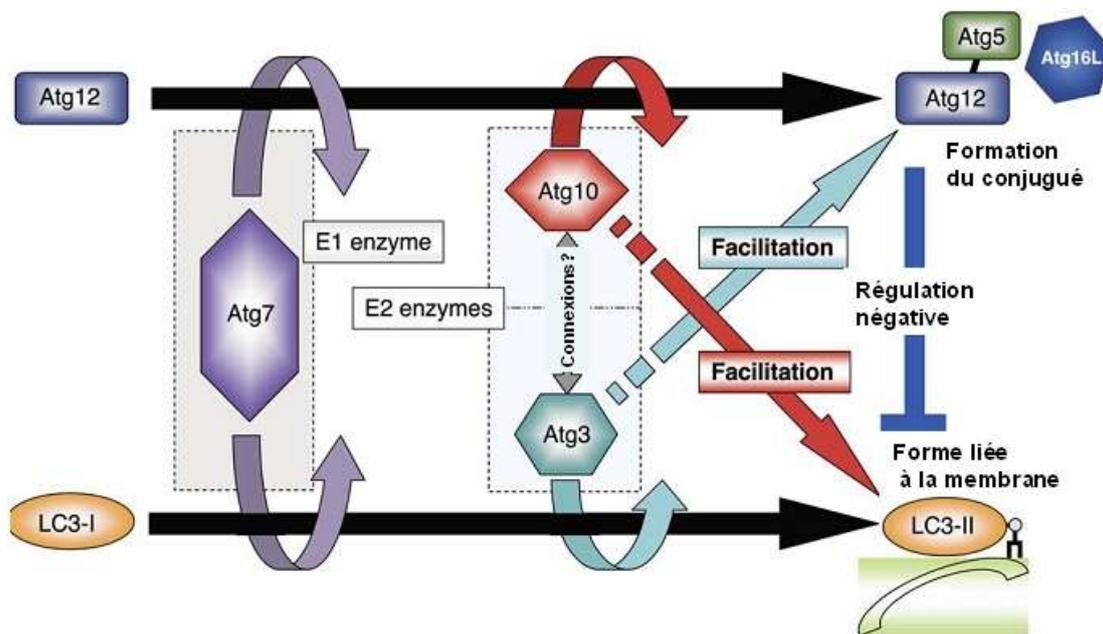


Figure 4 : Interconnexions entre les systèmes de conjugaison (d'après (Tanida *et al.*, 2004)).

La régulation de la formation des autophagosomes est assurée par deux complexes. Le premier complexe est composé entre autres de la sérine/thréonine kinase Atg1 qui est elle-même régulée par la sérine/thréonine kinase mTOR (*Mammalian Target Of Rapamycine*) et d'Atg13. Le fonctionnement de ce complexe dans la régulation de l'autophagie sera détaillé dans le paragraphe 2.2. Le second complexe est essentiellement composé d'Atg6, connue également chez les Mammifères sous le nom de Beclin-1 et d'une phosphoinositides 3 kinase (PI3-Kinase) de classe III. Il est impliqué dans la formation des autophagosomes (cf. paragraphe suivant).

2.1.2. Le rôle pro-autophagique du complexe PI3-Kinase de classe III / Beclin-1

Les PI3-Kinases sont des enzymes capables de phosphoryler un groupe hydroxyle du cycle inositol. Elles sont réparties en trois classes. Seules les PI3-Kinases de classe I et III participent à la régulation de l'autophagie (Petiot *et al.*, 2000). Les PI3-Kinases de classe I,

via leur activation d'Akt, inhibent le déroulement de l'autophagie. Elles sont activées le plus souvent par la présence de facteurs de croissance. Les PI3-Kinases de classe III, au contraire, activent le processus autophagique *via* leur interaction avec Beclin-1. Il est intéressant de noter que la plupart des inhibiteurs des PI3-Kinases ne sont pas spécifiques d'une classe en particulier. La 3-méthyl-adénine, la wortmannine et le LY293002 sont des inhibiteurs des PI3-Kinases, non spécifiques, qui sont pourtant décrites comme inhibant l'autophagie (Petiot *et al.*, 2000).

Au niveau du réseau trans-golgien, une PI3-Kinase de classe III composée de la sous-unité catalytique hVSP34 (*human Vacuolar Sorting Protein 34*) et de la sous-unité régulatrice hVSP15 (*human Vacuolar Sorting Protein 15*) connue également sous le nom de p150 peut interagir avec Atg6/Beclin-1. Les PI3-Kinase de classe III assurent la formation de phosphoinositide 3 phosphate à partir de phosphoinositides (cf. *Figure 5*). Beclin-1 est une protéine pro-autophagique qui a été identifiée par double hybride chez la Levure grâce à ses interactions avec Bcl-2 et Bcl-xL (Liang *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 1999). L'interaction hVSP34 et Beclin-1 est nécessaire à la formation de la membrane pré-autophagosomale et régule ainsi le développement de l'autophagie (cf. *Figure 5*).

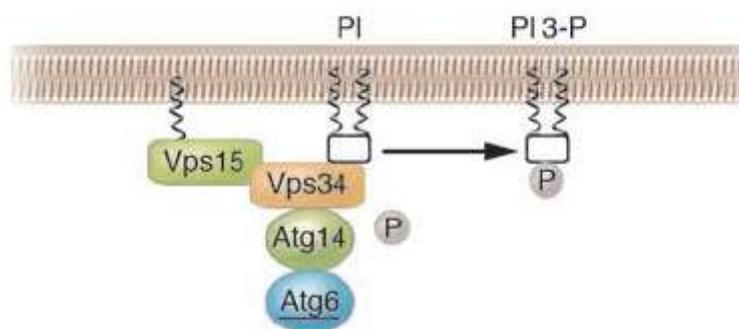


Figure 5 : Complexe PI3-Kinases de classe III/Beclin-1 (Levine & Yuan, 2005)

En effet, la délétion du domaine d'interaction de Beclin-1 avec hVPS34 (domaine ECD, *Evolutionarily-Conserved Domain*, acides aminés 244-337) entraîne une perte de sa capacité à activer l'autophagie et une perte de sa capacité de suppresseur de tumeur (Furuya *et al.*, 2005).

Par ailleurs, l'orthologue de la protéine de liaison aux phosphatidylinositol 3,5-bisphosphate, Atg18, impliqué dans la formation de la membrane des autophagosomes, a été identifié récemment : hWIPI-1 α pour *human WD-repeat protein Interacting with PhosphoInositides* (cf. *Figure 6*). Lors d'une carence nutritive, hWIPI-1 α est activée par le complexe hVSP34/Beclin-1. Elle s'accumule dans de larges vacuoles et se trouve partiellement colocalisée avec LC3-II dans la membrane des autophagosomes. Cette localisation n'est plus observée si l'autophagie induite par une carence nutritive est inhibée (Proikas-Cezanne *et al.*, 2004).

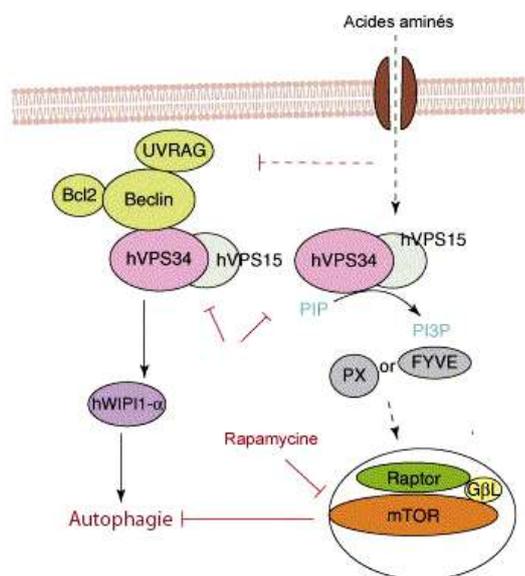


Figure 6 : Régulation de l'autophagie par le complexe PI3-Kinase de classe III (d'après (Nobukuni *et al.*, 2007))

En outre, des analyses structurales suggèrent que hWIPI-1 α contient un domaine de liaison aux phospholipides. Chez la Levure, il a été démontré que ce type de domaine est impliqué dans la formation de la membrane pré-autophagosomale (Nobukuni *et al.*, 2007). hWIPI-1 α apparaît donc comme un acteur important de la formation des autophagosomes régulé par le complexe Beclin-1/PI3-Kinases de classe III.

Il a récemment été montré que d'autres protéines peuvent également réguler les interactions entre Beclin-1 et hVPS34 (cf. paragraphe 3.2.) et donc la formation des autophagosomes.

2.2. L'inactivation de mTOR est une étape clé au développement de l'autophagie

2.2.1. Structure du complexe TOR

TOR (*Target Of Rapamycin*) est la principale kinase impliquée dans la régulation de l'induction de l'autophagie. Elle a été identifiée, dans la Levure *S. cerevisiae*, dans les années 1970 lors de la découverte d'une nouvelle drogue, la rapamycine isolée à partir des bactéries *Streptomyces hygroscopicus* du sol des îles Rapa Nui situées dans l'Océan Pacifique (Vezina *et al.*, 1975). Cette drogue possède des propriétés anti-tumorales et immunosuppressives (Corradetti & Guan, 2006). Sa cible a alors été caractérisée : c'est une sérine/thréonine kinase qui a été appelée TOR ainsi que FRAP (*FKBP12-Rapamycin-Associated-Protein*) et également RAFT (*Rapamycin And FKBP Target*). mTOR est l'orthologue chez les Mammifères. C'est une protéine d'environ 289 kDa qui fait partie de la famille des PIKK (*Phosphatidylinositol 3 Kinase related Kinase*). A la différence des PI3-Kinases qui

phosphorylent des phosphoinositides, mTOR phosphoryle uniquement des protéines. Elle est présente dans les cellules sous la forme de deux complexes différents appelés mTORC1 et mTORC2 chez les Mammifères (cf. *Figure 7*). mTORC1 est composé de mTOR et de trois autres protéines : mLST8 (également connue sous le nom de GβL pour *G beta-Like*), TCO89 et Raptor (pour *Regulatory Associated Protein of mTOR*, connue également sous le nom de KOG1 chez la Levure). mLST8 est une protéine de 34 kDa qui est impliquée dans la stabilité et l'activité catalytique des complexes mTORC1 et mTORC2. Raptor/KOG1 est une protéine de 176 kDa qui serait impliquée dans le rapprochement entre l'enzyme et son substrat. TCO89 (pour *89 kDa subunit of TOR Complex One*) est une protéine non essentielle qui fonctionnerait comme un régulateur positif de mTORC1 (De Virgilio & Loewith, 2006).

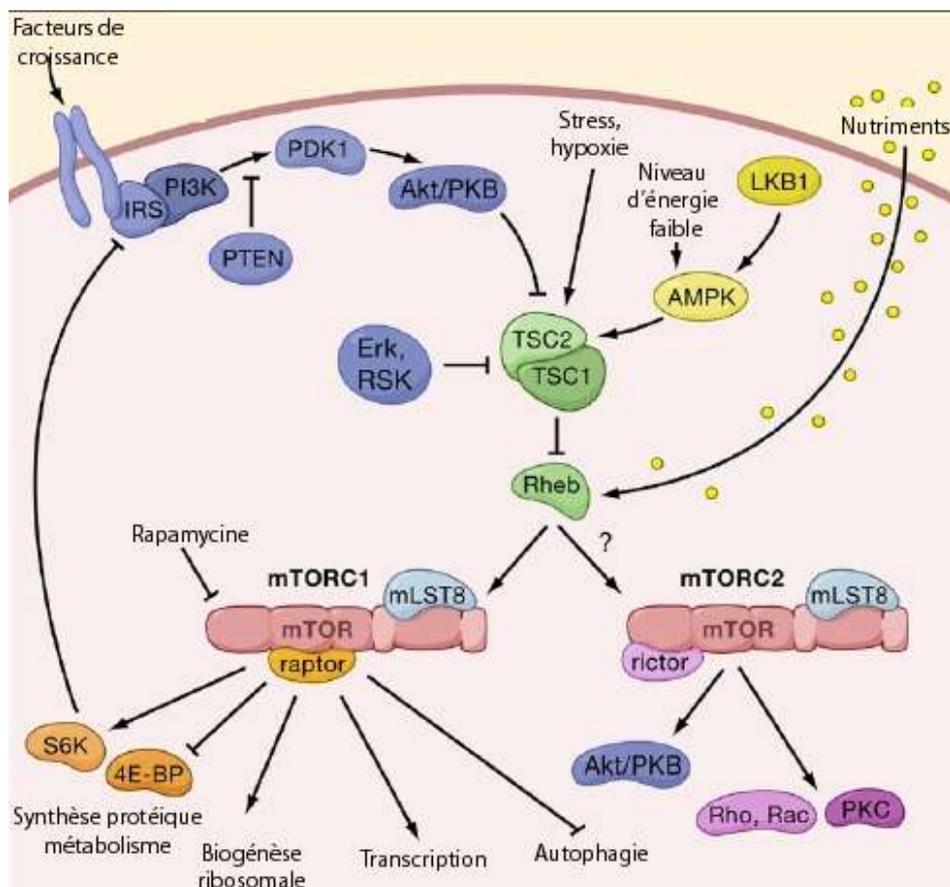


Figure 7 : Structure et principales fonctions des complexes mTOR (Wullschleger *et al.*, 2006).

Le complexe mTORC1 est inhibé par la rapamycine. Pour cela, la rapamycine doit se lier avec l'immunophiline FKBP12 (*FK506-binding protein 12 kD* ; FK506 étant une drogue immunosuppressante). Le complexe FKBP12-rapamycine interagit avec mTOR pour la rendre inactive mais n'empêche pas les interactions entre TOR, LST8 et Raptor. Cela déstabiliserait la liaison entre Raptor et TOR (Sarbasov *et al.*, 2005).

Le complexe mTORC2 est, quant à lui, composé de mTOR, mLST8 et Rictor (pour *Rapamycin Insensible Companion of mTOR*) (cf. *Figure 7*). Comme son nom l'indique, mTORC2, pour des raisons encore inconnues, ne peut interagir avec le complexe FKBP12-rapamycine et n'est donc absolument pas inhibé par la rapamycine. Il contrôle la dynamique du cytosquelette d'actine chez la Levure. En effet, chez *S. cerevisiae*, TORC2 peut activer la voie de la Rho1 GTPase/PKC1/MAP kinases. Cela participe à l'organisation du cytosquelette d'actine en régulant la polarité cellulaire. TORC2 est également capable de phosphoryler et donc d'activer Akt en position Sérine 473, Akt étant une kinase essentielle à la survie et la croissance cellulaire (Sarbasov *et al.*, 2005; De Virgilio & Loewith, 2006).

2.2.2. Régulation de mTOR

mTOR, qui est impliquée dans la régulation de nombreux processus physiologiques, peut être régulée par différents facteurs dont p53 et les sphingolipides. En effet, Feng *et al.* ont récemment montré que le facteur p53 peut indirectement inhiber mTOR (Feng *et al.*, 2005). En effet, suite à un traitement à l'étoposide connu pour activer p53 dans des cellules de fibroblastes embryonnaires murins, ils ont observé une diminution de la phosphorylation de mTOR et de sa cible p70S6K et par voie de conséquence une augmentation de l'autophagie. L'activation de p53 induit une augmentation de l'expression de *Tsc2* et de *Pten* ainsi que

l'activation de l'AMPK. L'absence de p53 diminuant fortement la réponse autophagique des MEF laisse à penser que p53 jouerait un rôle dans l'induction de l'autophagie suite à un traitement à l'étoposide. Plus récemment, a été découverte l'une des cibles de p53 qui pourrait être impliquée dans la réponse autophagique : la protéine lysosomale DRAM (pour *Damage-Regulated Autophagy Modulator*) (Crighton *et al.*, 2006). En effet, lors d'un dommage à l'ADN, Crighton *et al.* ont montré que *Dram* est surexprimé suite à l'activation de p53. Son absence, par ARN interférence, diminue fortement la mort apoptotique induite par p53 ce qui suggère son importance dans cette mort en réponse à un dommage à l'ADN. Ils ont par la suite déterminé que DRAM est également impliquée dans l'autophagie induite par p53 suite à ce traitement. Cela laisse à penser que DRAM est indispensable au déroulement des processus autophagiques et apoptotiques induits par un stress génotoxique, son rôle exact n'étant pas encore élucidé.

Les sphingolipides apparaissent également comme pouvant réguler l'autophagie (Lavieu *et al.*, 2007). En effet, l'augmentation de la concentration en céramide induite par un traitement chimiothérapeutique provoque une inhibition d'Akt associée à une augmentation de Beclin-1 déclenchant une réponse autophagique aboutissant à la mort cellulaire. Par ailleurs, l'augmentation de l'activité de la sphingosine kinase 1 (SK1), ou de la concentration en shingosine 1 phosphate, provoque l'inhibition de mTOR de manière Akt indépendante et aucune surexpression de Beclin-1, le tout couplé à une inhibition de l'apoptose et une autophagie de survie dans des MCF7 (Lavieu *et al.*, 2006). En outre, dans des MCF7 surexprimant Beclin-1, l'extinction d'*atg7* ou de la *SK1* par ARN interférence entraîne une inhibition de l'autophagie induite par une carence nutritive et augmente la mort de type apoptotique. Les sphingolipides apparaissent donc importants pour la régulation de l'autophagie suite à différents stress et seraient peut-être en partie impliqués dans la balance

entre survie ou mort cellulaire (Lavieu *et al.*, 2007).

2.2.3. Fonction de mTORC1

mTORC1 est impliqué dans la régulation de nombreux processus cellulaires dont le contrôle de la croissance cellulaire, la régulation du métabolisme cellulaire ainsi que la réponse à différents stress (De Virgilio & Loewith, 2006). Seule la régulation de la traduction et de l'autophagie par mTORC1 sera développée dans ce paragraphe.

➤ Rôle de mTORC1 dans la traduction

L'utilisation de l'inhibiteur de mTOR, la rapamycine, a permis de comprendre que le complexe mTORC1 intervient dans le contrôle de la synthèse protéique et de la croissance cellulaire en réponse aux nutriments (cf. *Figure 7*). En effet, Raptor peut interagir avec la p70S6 kinase et 4EBP1 ce qui permet leur phosphorylation par mTOR. La p70S6 kinase (également appelée S6K) est responsable de la phosphorylation de la protéine ribosomale S6, qui fait partie de la petite sous-unité des ribosomes 40S et 80S, entraînant ainsi une augmentation de l'initiation de la traduction de certains ARNm encodant des protéines impliquées dans la synthèse protéique dont les protéines ribosomales et certains facteurs d'élongation. La protéine p70S6K phosphorylée libère également le facteur d'initiation de la traduction eIF3 (*eukaryotic Initiation Factor 3*) (Mamane *et al.*, 2006). 4EBP1, qui se lie à eIF4E (*eukaryotic Initiation Factor 4E*) pour inhiber ses fonctions, est un autre élément impliqué dans l'initiation de la synthèse protéique. L'interaction 4EBP1-eIF4E prévient la formation d'un complexe entre eIF4E et eIF4G empêchant ainsi la traduction dépendante des ARNm coiffés (*CAP-dependant translation*). Lorsque 4EBP1 est phosphorylé par mTOR, il

perd sa capacité à se lier à eIF-4E permettant ainsi l'initiation de la traduction des ARNm coiffés à leur extrémité 5' (Mamane *et al.*, 2006).

➤ Rôle de mTORC1 dans la régulation de l'autophagie

Les partenaires impliqués dans la régulation de l'autophagie par TOR ont été caractérisés chez la Levure et seuls certains orthologues l'ont été chez les Mammifères. Cela met en jeu des interactions entre des protéines Atg, en particulier le couple Atg1-Atg13 (cf. *Figure 8*). TOR, quand elle est active, hyperphosphoryle Atg13 qui ne peut plus être associée avec Atg1. L'autophagie se déroule alors à un niveau basal. Quand TOR est inhibée, le complexe Atg1-Atg13 peut se former et recruter les autres protéines Atg (Atg11, Atg17) permettant l'activation du processus autophagique. Seules les orthologues d'Atg17 et d'Atg1 (ULK1) ont été actuellement identifiés chez les Mammifères (De Virgilio & Loewith, 2006).

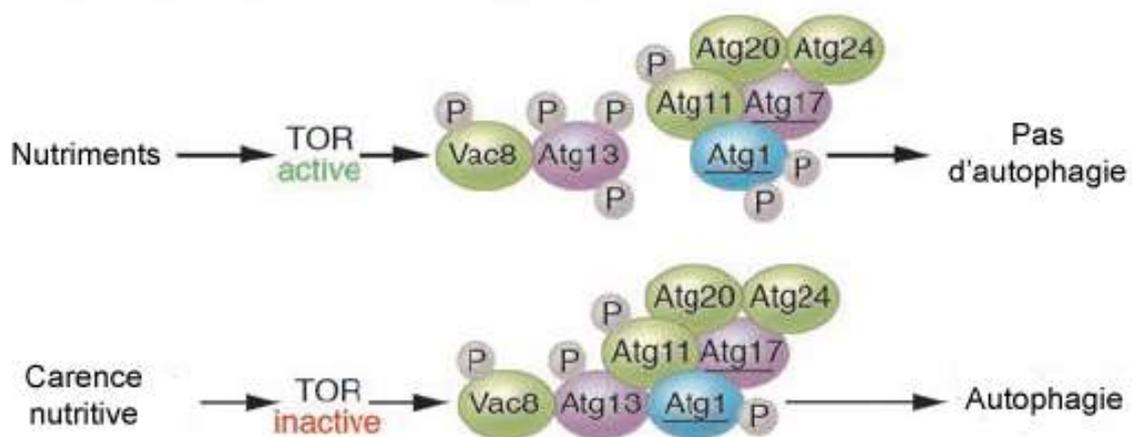


Figure 8 : Régulation par TOR du complexe d'initiation de l'autophagie chez la Levure. Les protéines Atg dont les orthologues Mammifères ont été identifiés sont soulignées. (d'après (Levine & Yuan, 2005).

2.3. La voie des facteurs de croissance et la régulation de l'autophagie par les phosphoinositides 3 kinases de classe I

Les PI3-Kinases participent de façon opposée à la régulation de l'autophagie. Alors que les PI3-Kinases de classe III l'activent, les PI3-Kinases de classe I, quant à elles, l'inhibent. Les PI3-Kinases de classe I sont composées d'une sous-unité catalytique p110 et d'un adaptateur p85. Ces membres sont activés par les petites protéines G trimériques. *In vitro*, elles peuvent phosphoryler le phosphadityl-inositol (PI), le phosphadityl-inositol 4 phosphate (PI4P) et le phosphatidyl-inositol-4,5 biphosphate (PI4,5P₂ ou PIP₂) mais *in vivo* leur substrat favori est le PI4,5P₂ ce qui aboutit à la formation de PI3,4,5P₃ (ou PIP₃) (Petiot *et al.*, 2000)

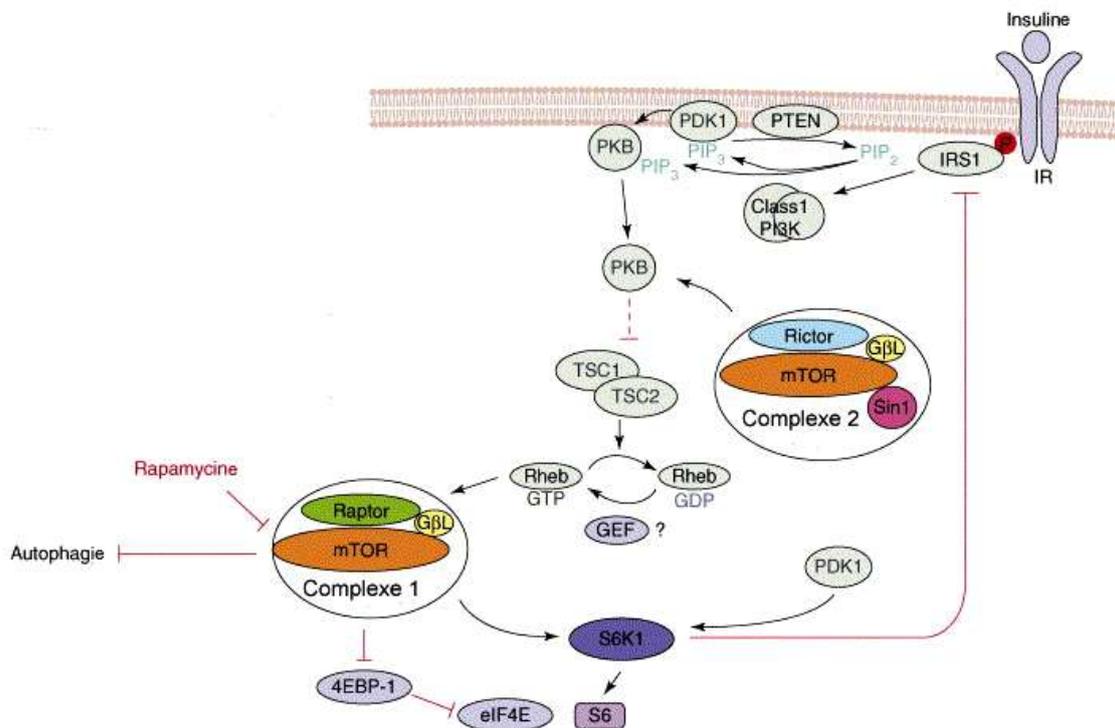


Figure 9 : Régulation de l'autophagie par les facteurs de croissance *via* les PI3-Kinases de classe I (d'après (Nobukuni *et al.*, 2007)).

La fixation de facteurs de croissance sur leur récepteur va aboutir à l'activation des PI3-Kinases de classe I (cf. *Figure 9*). Par exemple, l'insuline se fixe sur un dimère de son récepteur à l'insuline (RI) qui fait partie des récepteurs à activité tyrosine kinase. La fixation du facteur de croissance provoque l'activation du récepteur. Le signal va alors être transduit dans les cellules : dans notre exemple, une IRS (*Insulin Receptor Substrate*), qui interagit avec le domaine tyrosine-kinase du RI, va être phosphorylée sur des résidus tyrosines spécifiques.

Une des protéines impliquées dans la transduction du signal à partir d'un récepteur aux facteurs de croissance de type tyrosine kinase est une protéine de la famille des protéines G : la protéine Ras. Furuta *et al.* ont, en effet, démontré qu'en réponse à une carence nutritive la capacité autophagique est fortement réduite dans des cellules NIH3T3 transfectées avec un Ras constitutivement actif. Par ailleurs, l'ajout de sérum, en particulier d'EGF (*Epidermal Growth Factor*), ainsi que la transfection d'un mutant de Ras dominant négatif dans le milieu de culture carencé abrogent également l'autophagie de ces cellules. L'utilisation de différents mutants de Ras possédant la capacité d'activer une unique voie de signalisation (PI3-Kinases, Raf/MAPK ou RalGDS) a permis de conforter le rôle de Ras dans l'activation des PI3-Kinases de classe I suite à une carence nutritive (Furuta *et al.*, 2004).

Ces protéines activées par le récepteur aux facteurs de croissance (IRS, Ras, ...) seront à leur tour reconnues par les domaines SH2 (*Src Homology 2*) de la sous-unité régulatrice de la PI3-Kinase de classe I. Cette dernière phosphoryle alors en position 3 les phosphoinositides membranaires, créant ainsi des sites de reconnaissance pour d'autres kinases cellulaires telles que la Protéine serine/thréonine Kinase B (PKB)/Akt ou la PDK1/2 (*3-Phosphoinositide-Dependent protein Kinase 1/2*) via leur domaine d'homologie pleckstrine. Ce domaine est une région protéique d'environ 120 acides aminés qui peut se lier aux phosphoinositides et qui

permet ainsi le recrutement de protéines aux membranes lipidiques.

Recrutée à la membrane, Akt peut être phosphorylée par PDK1 ou mTORC2. Il est à noter que PTEN (*Phosphatase and TENsin homolog*), une protéine et lipide phosphatase, est capable de déphosphoryler les PIP3 en PIP2 et donc d'inhiber Akt (Arico *et al.*, 2001). Akt ainsi activée va à son tour phosphoryler TSC2 et ainsi inhiber la formation du complexe TSC1/TSC2 (*Tuberous Sclerosis Complex*). Des mutations dans TSC1 ou TSC2 ont été décrites comme étant associées à la sclérose tubéreuse de Bourneville (*Tuberous Sclerosis* ou TSC). C'est un syndrome caractérisé chez l'homme par l'apparition de tumeurs bénignes différenciées (hamartomes) qui touchent de nombreux tissus, progressent rarement vers un état malin, mais qui peuvent provoquer des désordres graves tels l'épilepsie ou certains retards mentaux. TSC1 et TSC2 sont également décrits comme étant des suppresseurs de tumeurs puisque la perte d'hétérozygotie de ces gènes est retrouvée dans de nombreux cancers (Jiang *et al.*, 2005). Le rôle de TSC1, également connue sous le nom d'hamartine, serait de stabiliser TSC2 et d'éviter ainsi sa dégradation par le protéasome. TSC2, également appelée tuberine, est un facteur d'échange de type GAP (*GTPase Activating Protein*) qui régule négativement la petite GTPase Rheb (*Ras Homolog Enriched in Brain*). Rheb interagit avec mTOR et la régule. En effet, Rheb-GTP l'active tandis que Rheb-GDP l'inhibe. En présence de facteurs de croissance, Akt inhibe TSC2 en le phosphorylant, Rheb se retrouve alors sous la forme Rheb-GTP, activant mTOR ce qui aboutit à une inhibition de l'autophagie (Avruch *et al.*, 2006).

A l'inverse, lors d'une carence en facteurs de croissance, ou quand PTEN est activée, Akt est inactive ce qui rend le complexe TSC1/TSC2 actif. mTOR est par conséquent inhibée et l'autophagie peut ainsi se dérouler.

2.4. Régulation de l'autophagie par les acides aminés et le glucose

Le retrait de sérum induit une stimulation de l'autophagie *via* une inhibition des PI3-Kinases de classe III et une activation du complexe TSC1/TSC2. Ce dernier serait également impliqué dans l'inhibition de mTOR induite par une carence en glucose mais pas dans celle induite par une carence en acides aminés.

2.4.1. Régulation par les acides aminés

Les modalités de contrôle de l'induction de l'autophagie par une carence en acides aminés ne sont pas encore totalement établies. Deux voies semblent, cependant, être impliquées de façon prépondérante (cf. *Figure 6*). Dans les deux cas, la régulation de mTOR par les acides aminés apparaît comme indépendante du complexe TSC1/TSC2 ainsi que de Rheb (Byfield *et al.*, 2005; Nobukuni *et al.*, 2007).

Dans la première, mTOR pourrait être le senseur des acides aminés. Tous les acides aminés ne participent pas à la régulation de l'autophagie et leur prépondérance peut varier selon les cellules et les tissus. Il est généralement admis que la leucine, la glutamine, la tyrosine, la phénylalanine, la proline, la méthionine, l'histidine et le tryptophane en sont les principaux régulateurs. La leucine est le principal acide aminé régulateur dans les cellules musculaires, dans les cardiomyocytes et dans les hépatocytes (Kadowaki *et al.*, 2006). Les acides aminés pourraient favoriser la formation du complexe mTORC1 ainsi que son interaction avec ses cibles. Leur absence induirait son inhibition et donc l'activation de l'autophagie.

La seconde hypothèse propose l'existence d'un senseur à acides aminés sur la membrane plasmique qui transduit ensuite vers un complexe formé de la PI3-Kinase de classe

III. En effet, il a été montré qu'un complexe formé par une PI3-Kinase de classe III (hVSP34, pour *Human Vacuolar Sorting Protein 34*) et par une sérine/thréonine kinase (hVSP15) est capable d'inhiber mTOR et la phosphorylation de S6K ainsi que l'autophagie (Nobukuni *et al.*, 2005). Il semblerait qu'en présence d'acides aminés, l'activité de hVSP34 soit forte produisant ainsi des phosphatidylinositol 3-phosphates (PI3P). Ce PI3P pourrait recruter certaines protéines contenant des domaines FYVE ou PX (domaines de liaison aux phosphoinositides) et ainsi réguler la formation du complexe mTORC1/S6K (Byfield *et al.*, 2005). Une carence en acides aminés provoque, à l'inverse, une inhibition du complexe hVSP34/hVSP15 inactivant alors mTOR.

L'absence d'acides aminés entraîne, par ailleurs, une activation du complexe PI3-kinases/Beclin-1, suggérant qu'il existerait deux types de complexe PI3-Kinase de classe III dans la cellule, un localisé au niveau des endosomes, l'autre au niveau du réseau transgolgien (Beclin-1). Le second serait capable de réguler la formation de l'autophagosome et, de manière intéressante, le premier modulerait l'activité de la kinase mTOR (cf. *Figure 6* et paragraphe 2.1.2)(Nobukuni *et al.*, 2005).

2.4.2. Régulation par le glucose

Lors d'une carence en glucose, on observe une diminution du niveau d'ATP. Le rapport ATP/ADP diminue alors que le ratio AMP/ATP augmente ce qui va activer l'AMP kinase (AMPK). L'AMPK est un complexe hétérotrimérique : la sous-unité catalytique α et les deux sous-unités régulatrices β et γ . L'AMPK est activée par la phosphorylation du résidu thréonine 172 de la sous-unité α par la kinase LKB1. En outre, la liaison de l'AMP sur la sous-unité γ augmente la phosphorylation de la sous-unité α et inhibe sa déphosphorylation par des phosphatases. De hauts niveaux d'ATP inhibent l'activation de l'AMPK (Hardie,

2005). Inoki *et al.* ont montré que l'activation de l'AMPK par un analogue du glucose, mimant une déplétion en ATP, provoque la déphosphorylation de mTOR et de ses cibles 4EBP1 et P70S6K (Inoki *et al.*, 2003). La carence en ATP favorise les interactions entre l'AMPK et le complexe TSC1/2 ce qui aboutit à la phosphorylation de TSC2. Ils ont ensuite déterminé les sites de phosphorylation de l'AMPK sur TSC2 : les acides aminés T1227 et S1345, deux sites différents des sites de phosphorylation d'Akt. Des mutants non phosphorylables de TSC2 ont permis de confirmer l'importance de ces sites dans l'activation de TSC2 par l'AMPK. Les auteurs ne se sont pas posé la question de savoir si l'inhibition de mTOR par l'AMPK permettait une induction de l'autophagie (cf. *Figure 10*) (Inoki *et al.*, 2003).

Il semblerait également qu'Akt puisse réguler le ratio AMP/ATP. En effet, Akt activée diminuerait fortement ce ratio conduisant à une diminution de l'activité de l'AMPK. TSC2 est donc phosphorylé principalement par Akt et l'autophagie est donc inhibée. Quand l'expression d'Akt est abolie, le ratio augmente ce qui conduit à une forte activité de l'AMPK et à une inhibition de mTOR (Hahn-Windgassen *et al.*, 2005).

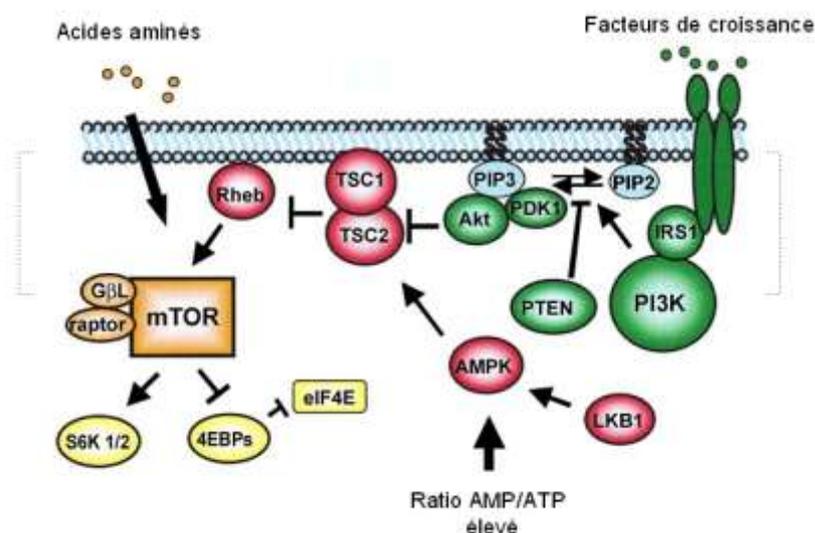


Figure 10 : Une carence en glucose induit l'activation de l'AMPK et l'inactivation de mTOR (d'après (Richardson *et al.*, 2004)).

En conclusion, une carence en sérum et en acides aminés, condition utilisée pour réaliser ce travail de thèse, provoque l'inactivation de mTOR. L'absence de facteurs de croissance inhibe la voie de signalisation des PI3-Kinases de classe I/Akt ce qui aboutit à une activation du complexe TSC1/TSC2 responsable de l'inhibition de mTOR. Concernant la carence en acides aminés, l'inhibition de mTOR est indépendante de ce complexe TSC et passerait par l'activation des PI3-Kinases de classe III/Beclin-1 et par l'inhibition directe ou indirecte de mTOR. L'hypophosphorylation de mTOR n'induit plus de répression de l'autophagie qui peut alors potentiellement se développer (cf. *Figure 11*).

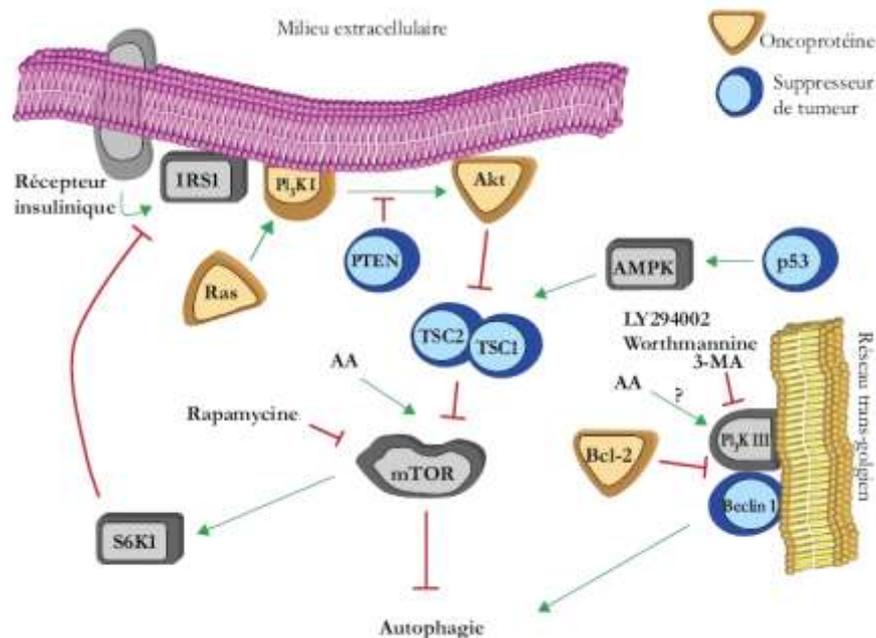


Figure 11 : Récapitulatif des différentes voies majeures impliquées dans la régulation de l'autophagie (Meley *et al.*, 2006).

III. Autophagie et mort cellulaire

3.1. Autophagie ou mort cellulaire programmée de type II

L'autophagie a été initialement décrite chez la Levure comme étant un processus de survie face à une carence nutritive (Levine & Yuan, 2005). Cependant, lors de certains processus de remodelage tissulaire complet lors du développement (régression des glandes salivaires et métamorphose chez les Insectes, ...) ou lors de processus homéostatiques chez l'adulte (régression des glandes mammaires après la période de lactation, de la prostate après castration), des vacuoles autophagiques ont également été identifiées au sein de cellules en train de mourir (Levine & Klionsky, 2004). Il a donc été proposé de l'appeler mort cellulaire programmée de type II par analogie avec l'apoptose ou mort cellulaire programmée de type I (cf. *Figure 12*).

La mort autophagique est caractérisée par l'apparition de nombreuses vacuoles autophagiques dans le cytoplasme accompagnée d'un gonflement des mitochondries et de l'appareil de Golgi ainsi que du réticulum endoplasmique. Contrairement à l'apoptose, on observe une dégradation précoce des organelles, une préservation du cytosquelette, et l'absence le plus souvent d'activité des caspases et de fragmentation de l'ADN aux stades précoces. Les cellules vont se détacher de leur substrat et leur membrane peut également présenter des «blebs». A la différence de la nécrose et comme l'apoptose, elle n'induit pas de réaction inflammatoire (Levine & Yuan, 2005).

L'autophagie comme processus de mort cellulaire a également été étudiée chez les Mammifères. Des cellules immortalisées à partir de la moelle osseuse de Souris déficientes en Bax et Bak, 2 protéines pro-apoptotiques majeures de la voie mitochondriale de l'apoptose, ont été cultivées en absence d'un facteur de croissance qui leur est spécifique : l'interleukine 3.

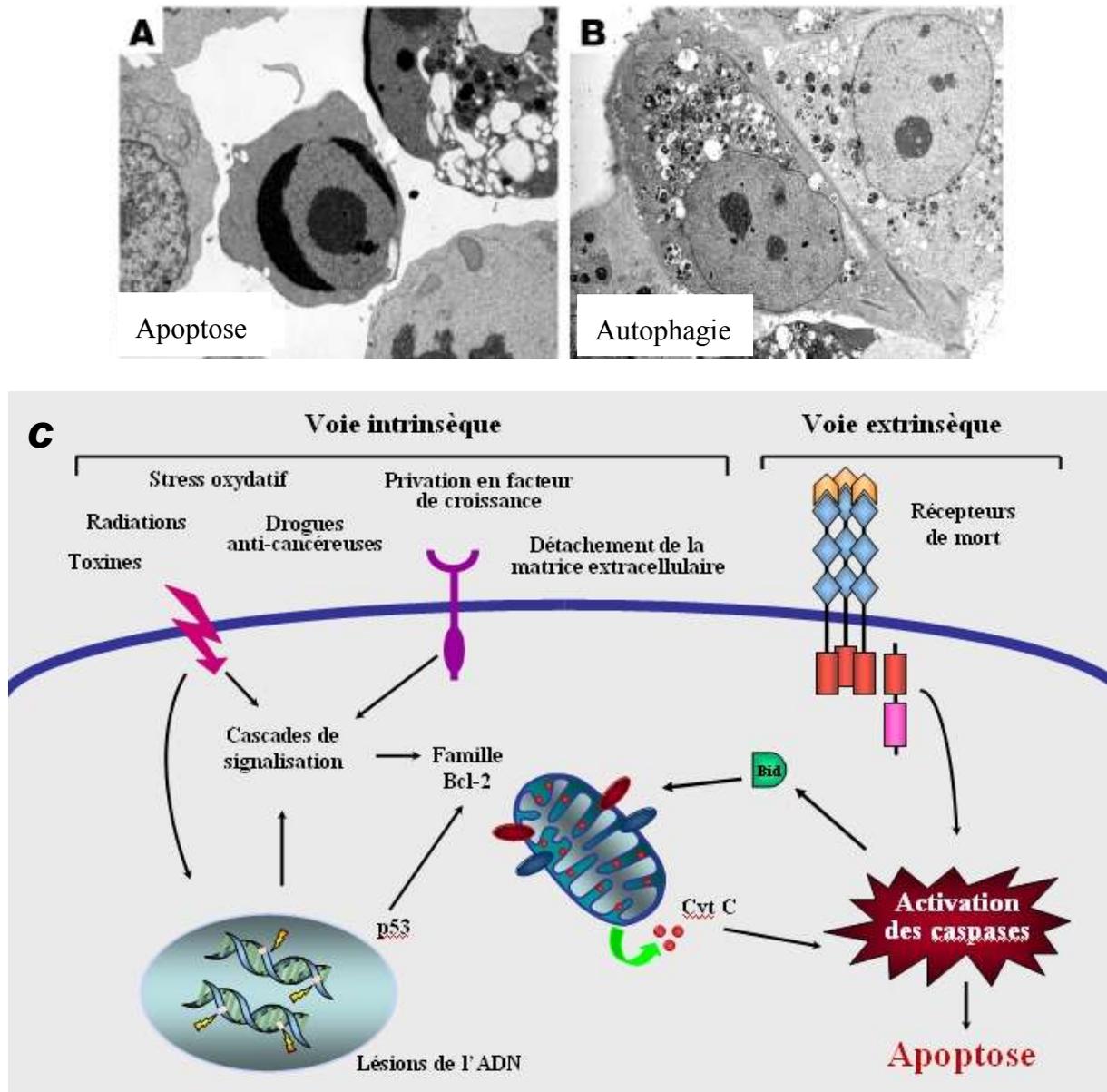


Figure 12 : Exemples de mort autophagique et apoptotique en MET. A. Cellules Jurkat traitées avec FasL en apoptose : condensation de la chromatine, condensation du cytoplasme. B. MCF7 traitées avec du tamoxifène : absence de condensation de la chromatine, présence de nombreux autophagosomes (Levine & Yuan, 2005). C. Schéma simplifié de l'apoptose.

Lors de cette carence, ces cellules, déficientes pour l'apoptose, activent les processus autophagiques. Si la déplétion en IL3 est prolongée au-delà de 24 semaines, 95% des cellules

finissent par mourir. Si l'autophagie est inhibée par des inhibiteurs pharmacologiques ou par ARN interférence, la mort est beaucoup plus précoce (3 jours). Si les cellules sont remises en culture en présence d'IL3, elles vont mettre plus ou moins longtemps, selon la durée de la carence, avant d'entrer à nouveau en cycle cellulaire et de proliférer. En effet, l'autophagie, pour permettre la survie, a provoqué la dégradation d'organelles et de protéines importantes pour la prolifération cellulaire. Les cellules vont passer un certain temps pour se trouver à nouveau dans leur état physiologique (synthèse d'organelles, de protéines,...). L'autophagie apparaît ici comme un moyen de survie limitée (environ 20 semaines) puisque si l'autodigestion est poussée à l'extrême, les cellules vont finir par en mourir (Lum *et al.*, 2005). Chez les cellules de Mammifères, l'autophagie est également un processus de survie cellulaire mais qui peut également conduire à la mort cellulaire de type II.

Par ailleurs, une étude de Shimizu *et al.* a démontré que dans des fibroblastes embryonnaires murins déficients pour l'apoptose (MEF Bax^{-/-} et Bak^{-/-}) dans lesquels l'autophagie est abrogée par ARN interférence dirigé contre *Atg5* ou *Atg6/Beclin-1*, la mort induite par la staurosporine ou l'étoposide est bloquée (Shimizu *et al.*, 2004).

De nombreux traitements anti-cancéreux peuvent induire l'autophagie. Il s'est alors posé la question de savoir si cela procurait un avantage de survie aux cellules cancéreuses ou si au contraire cette autophagie pourrait aboutir à leur mort cellulaire. Ainsi, le tamoxifène et d'autres agents anti-oestrogènes induisent dans des cellules cancéreuses de sein MCF7 une autophagie de mort bloquée par un inhibiteur de l'autophagie, la 3-Méthyl-Adénine (3-MA) (Kondo & Kondo, 2006). Les irradiations induisent également l'autophagie dans différents types cellulaires, une autophagie de survie dans les cellules du sein, du colon et de la prostate et une autophagie de mort dans les cellules gliales dans lesquelles la réparation de l'ADN par la DNA-PK est abrogée. Ces données suggèrent que l'autophagie est un phénomène de survie

permettant la réparation de l'ADN lésé par les irradiations qui peut se transformer en processus de mort cellulaire si la réparation est impossible (Daido *et al.*, 2005). De nombreux autres agents (arsenic, témozolomide, résveratrol, inhibiteurs d'Akt, de mTOR, ...) peuvent également induire une autophagie de mort (Daido *et al.*, 2004; Kanzawa *et al.*, 2004; Takeuchi *et al.*, 2005; Kondo & Kondo, 2006).

Des caractéristiques apoptotiques peuvent être retrouvées en parallèle des morphologies autophagiques dans différentes lignées Mammifères saines ou tumorales. L'autophagie est-elle réellement un processus de mort cellulaire ou intervient-elle plutôt pour retarder la mort par apoptose ? L'inhibition de l'autophagie par un inhibiteur pharmacologique, la 3-MA protège de la mort cellulaire induite par une carence nutritive dans des neurones privés de facteur de croissance neuronal (NGF), des cellules granulaires cérébelleuses carencées en sérum et phosphate, des cellules PC12 cultivées sans sérum mais ces cellules finissent par mourir par apoptose (Xue *et al.*, 1999; Canu *et al.*, 2005). Par ailleurs, de nombreux gènes impliqués dans la régulation positive de l'autophagie ont été identifiés comme des suppresseurs de tumeurs : *atg6/beclin-1* (Liang *et al.*, 1999); *p53* (Feng *et al.*, 2005), *DRAM* (Crighton *et al.*, 2006), *PTEN* (Arico *et al.*, 2001) tandis que des gènes anti-autophagiques sont des oncogènes (*PI3-Kinases*, *Akt*). En outre, des délétions dans de nombreux gènes pro-autophagiques ont été retrouvées dans les cellules cancéreuses humaines : *Atg8* dans le locus 16q24.1 dans les cancers du foie, sein, prostate et *atg7* dans le locus 3p25.2 dans les cancers du poumon (Jin, 2006). Dans le modèle murin, l'inactivation de ces gènes augmente la tumorigénicité alors que la sur-expression de ces gènes (*atg6/Beclin-1*, *atg5*) inhibe la formation des tumeurs. Tout ceci suggère un rôle anti-tumoral important de l'autophagie. Cependant, l'autophagie peut également favoriser la survie lors d'une carence nutritive fréquente au sein des tumeurs, lors de radiations ou des traitements de

chimiothérapie de cellules résistantes à l'apoptose ou alors promouvoir leur mort cellulaire (Levine, 2007). Il semble alors intéressant de se poser la question des interconnexions entre apoptose et autophagie.

3.2. Interconnexions entre l'apoptose et l'autophagie

Apoptose et autophagie peuvent être deux processus se déroulant de manière concomitante dans les cellules sous l'effet d'un stress. Par ailleurs, Beclin-1 a été identifiée par double hybride grâce à ses interactions avec deux protéines anti-apoptotiques que sont Bcl-2 et Bcl-xL. De nombreux signaux apoptotiques peuvent déclencher l'autophagie : signaux induisant la voie extrinsèque de l'apoptose, signaux activant les calcium/calmoduline serine/thréonine kinases DRP1 et DAPk ainsi que le céramide. A l'inverse, certains signaux anti-apoptotiques comme la voie PI3-Kinases/Akt inhibent également l'autophagie (Levine & Yuan, 2005). Quels sont les liens unissant ces deux processus de mort cellulaire ?

Il a été démontré que l'inhibition d'un de ces processus de mort cellulaire pouvait favoriser le déroulement de l'autre. En effet, des cellules cancéreuses humaines HeLa soumises à une carence nutritive présentent une accumulation de vacuoles autophagiques et par la suite des caractéristiques apoptotiques (Boya *et al.*, 2005). L'inhibition de l'autophagie par des inhibiteurs pharmacologiques ou par ARN interférence augmente la mort apoptotique induite par la carence en sérum tandis que l'inhibition des caspases ainsi que la stabilisation du potentiel membranaire mitochondrial la réduit. Une autre étude utilisait la lignée cellulaire murine L929 dans laquelle l'inhibiteur à large spectre des caspases (zVAD-fmk) induit la mort cellulaire autophagique. L'extinction d'*Atg7* et de *Beclin-1* ainsi que l'ajout d'inhibiteurs pharmacologiques de l'autophagie protègent les cellules de cette mort (Yu *et al.*, 2004). La

suppression de la caspase 8 par ARN interférence produit également le même effet. Dans ce modèle, l'autophagie semble être activée par la voie de signalisation impliquant les serine/thréonine kinases (RIP), la c-jun N-terminal kinase (JNK) ainsi que c-jun.

Apoptose et autophagie sont également connectées *via* les protéines de la famille de Bcl-2. En effet, l'orthologue Mammifère d'*atg6*, Beclin-1, a été identifié par double hybride chez la Levure grâce à son interaction avec Bcl-2 (domaine d'interaction : acides aminés 88-150) (Liang *et al.*, 1998) et son rôle dans l'autophagie a été par la suite caractérisé (Liang *et al.*, 1999). Pour pouvoir interagir avec Bcl-2, il avait alors été proposé que Beclin-1 pouvait posséder un domaine « BH3 like ». A partir de cette découverte le rôle respectif de Bcl-2 et Bcl-xL dans l'autophagie a été étudié. Dans des fibroblastes embryonnaires murins déficients pour l'apoptose (Bax^{-/-} et Bak^{-/-}), un traitement à l'étoposide ou à la staurosporine induit une mort de type non apoptotique, les cellules présentant des vacuoles autophagiques en microscopie électronique (Shimizu *et al.*, 2004). Cette mort est inhibée par des inhibiteurs pharmacologiques de l'autophagie et par des ARN interférence dirigés contre Atg5 et Atg6/beclin-1. La sur-expression de Bcl-2 et Bcl-xL provoque une augmentation de la mortalité cellulaire dépendante de Beclin-1. Des siRNAs dirigés contre Bcl-xL réduisent la mort autophagique induite par l'étoposide, ou la staurosporine, ainsi que la quantité du conjugué Atg5-Atg12. Ces résultats indiquent que Bcl-xL régulerait la formation des autophagosomes *via* son interaction avec Beclin-1 lors d'un stress apoptotique.

Dans des conditions de carence nutritive, Bcl-2 apparaît comme étant une protéine anti-autophagique (Patingre *et al.*, 2005). En effet, la sur-expression de Bcl-2 inhibe l'autophagie chez la Levure et dans la lignée cellulaire cancéreuse MCF7 et ceci de manière dépendante de Beclin-1. Plus précisément, Bcl-2 en interagissant avec Beclin-1 empêche la formation du complexe Beclin-1/hVSP34. En effet, dans des conditions de carence nutritive,

Pattingre *et al.* ont montré, par coimmunoprécipitation, que Beclin-1 se déplaçait du complexe Beclin-1/Bcl-2 vers le complexe Beclin-1/hVSP34. L'équilibre entre ces 2 complexes permet une régulation fine de l'autophagie induite par une carence nutritive. Par ailleurs, des mutants de Beclin-1 ne pouvant plus interagir avec Bcl-2 présentent des niveaux autophagiques particulièrement élevés ainsi qu'une mortalité élevée en conditions normales de culture ou lors d'une carence. Ainsi Bcl-2, en diminuant la quantité de Beclin-1 associée à hVSP34, inhiberait la capacité autophagique des cellules MCF7 lors d'une carence nutritive.

En 2007, une étude cristallographique d'un peptide BH3 de Beclin-1 associé à Bcl-xL a permis de confirmer l'existence du domaine BH3 de Beclin-1 (Oberstein *et al.*, 2007). Beclin-1 fait donc partie des protéines à un unique domaine BH3 (AA 114-123) qui interagit spécifiquement avec les domaines BH1 et BH2 de Bcl-2 et Bcl-xL (Maiuri *et al.*, 2007). Afin de confirmer cette interaction, les auteurs ont utilisé un BH3-mimétique, l'ABT737. Son ajout libère Beclin-1 de Bcl-2 ou Bcl-xL et provoque également une augmentation de l'autophagie en conditions normales ou en milieu carencé dans les cellules cancéreuses HeLa. Le complexe Beclin-1/hVSP34 peut ainsi être formé et permettre l'induction de l'autophagie. Cette étude montre également un rôle anti-autophagique des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL.

Le rôle fonctionnel des interactions entre Beclin-1 et Bcl-2/Bcl-xL est encore largement débattu et semble différent selon le stress utilisé (stress apoptotique ou carence nutritive) et la sensibilité des cellules à l'apoptose. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'identifier clairement tous les partenaires et leur rôle respectif selon le stress impliqué.

D'autres protéines autophagiques ont été décrites comme pouvant interagir avec des protéines apoptotiques. C'est le cas de la protéine Atg5, protéine essentielle dans la formation de la membrane pré-autophagosomale qui a été récemment identifiée comme pouvant être

impliquée dans l'apoptose (cf. *Figure 13*). En effet, Atg5 peut interagir avec la molécule adaptatrice FADD (*Fas-Associating protein with Death Domain*) intervenant dans la voie extrinsèque de l'apoptose et son rôle est essentiel à la mort autophagique induite par l'interféron γ (Pyo *et al.*, 2005). Par ailleurs, Atg5 peut être clivée par la calpaine et le fragment obtenu peut interagir avec Bcl-xL. Cette interaction déplace Bcl-xL de Bax favorisant l'apoptose (Codogno & Meijer, 2006). En effet, Bax libre peut suite à un stimulus de mort aller s'insérer dans la membrane mitochondriale et permettre le relargage de son contenu apoptogénique.

En 2006, une nouvelle protéine a été identifiée comme pouvant interagir avec le complexe Beclin-1/PI3-Kinases : il s'agit d'UVRAG (*UV irradiation Resistance Associated Gene*). Comme Beclin-1, elle fait partie de la famille des suppresseurs de tumeurs puisque sa sur-expression diminue la tumorigénicité des cellules cancéreuses coliques HCT116 implantées dans une Souris nude (Liang *et al.*, 2006).

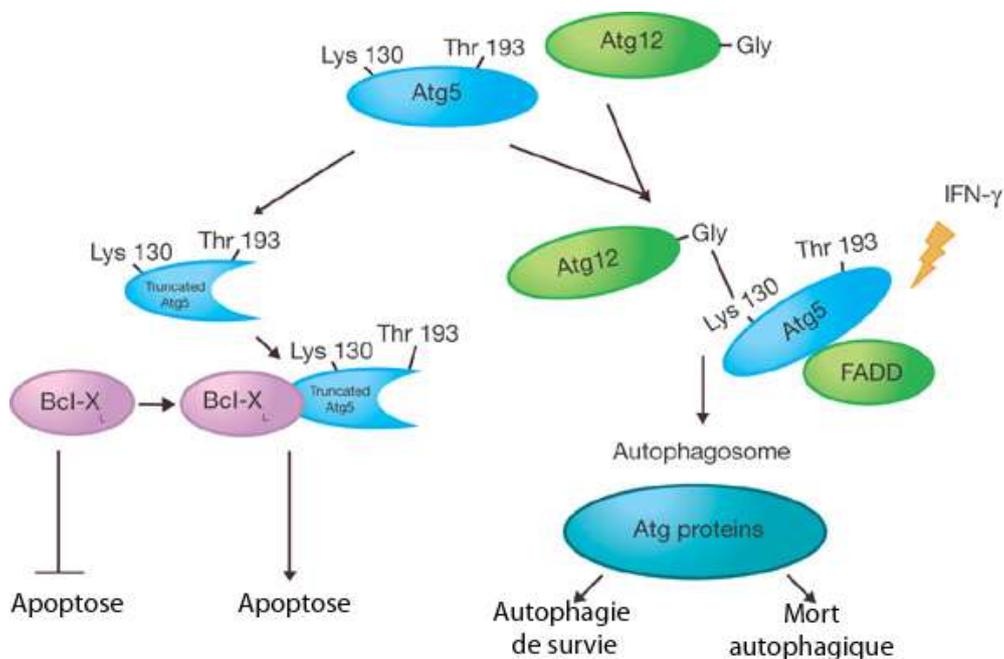


Figure 13 : ATG5 et ses rôles autophagique et apoptotique (Codogno & Meijer, 2006)

En outre, elle est mutée de façon UVRAG peut interagir avec Beclin-1 *via* leurs domaines en faisceau d'hélices (« *coil-coiled* ») respectifs pour former un complexe comprenant Beclin-1, Bcl-2, PI3-Kinase et UVRAG, Beclin-1 étant indispensable aux interactions entre Bcl-2 et les deux autres protéines et entre la PI3-Kinase et les deux autres protéines. La sur-expression d'UVRAG est capable d'induire l'autophagie en présence de Beclin-1 fonctionnelle et réciproquement. UVRAG apparaît donc comme un activateur de l'autophagie *via* son interaction avec le complexe Beclin-1/PI3-Kinase (Liang *et al.*, 2006).

Une autre protéine pro-apoptotique appartenant à la famille de Bcl-2, BNIP3 (*Bcl-2/E1B Nineteen Interacting Protein*), appelée également NIP3, jouerait un rôle dans l'autophagie. Elle a été identifiée par double hybride comme pouvant interagir avec Bcl-2. BNIP3 possède un unique et atypique domaine BH3, celui-ci ne semblant pas jouer un rôle dans le processus de mort apoptotique. BNIP3 est une protéine à localisation préférentielle mitochondriale *via* son domaine transmembranaire (TM) en C-terminal. Son domaine transmembranaire semble lui essentiel à la mort apoptotique car la délétion de ce dernier affecte la mort cellulaire. Par ailleurs, ce domaine TM lui permet également de s'homo- ou s'hétérodimériser avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL (Ray *et al.*, 2000). Le remplacement de son domaine TM par celui du cytochrome b5 empêchant la localisation mitochondriale de BNIP3 n'inhibe pas sa fonction de régulation de l'apoptose *via* ses interactions avec Bcl-2/Bcl-xL. Par ailleurs, BNIP3 a été décrite comme impliquée dans la mort autophagique induite par des traitements à l'arsenic et au céramide ainsi que dans la mort hypoxique des cellules de gliomes malins (Kothari *et al.*, 2003; Daido *et al.*, 2004; Kanzawa *et al.*, 2005). Un traitement au céramide ou à l'arsenic induit dans les cellules cancéreuses gliales une mort cellulaire non apoptotique qui présente des caractéristiques autophagiques. Le céramide ou l'arsenic induit l'augmentation de l'expression de BNIP3 qui

provoque un dysfonctionnement mitochondrial. La sur-expression de BNIP3 seule dans ces cellules est suffisante à provoquer l'autophagie (Daido *et al.*, 2004; Kanzawa *et al.*, 2005). BNIP3 est également une cible transcriptionnelle du facteur HIF-1 α et semble être impliquée dans le déroulement de l'autophagie en hypoxie.

IV. Réponse à l'hypoxie induite par HIF-1 α (*Hypoxia Inducible Factor 1 α*)

L'inhibition de mTOR est un élément clé permettant le déroulement de l'autophagie. D'autres stress induisent l'inactivation de mTOR dont l'hypoxie. Par ailleurs, des données récentes indiquent que l'hypoxie peut également provoquer une réponse autophagique.

4.1. Activation d'HIF-1 en réponse à l'hypoxie

HIF-1 (*Hypoxia Inducible Factor 1*) est le facteur de transcription responsable de l'adaptation et de la survie des cellules ou d'un organisme entier lorsque le niveau d'oxygène est inférieur à 21 % (ce qui correspond à la normoxie). A partir de 5 % d'oxygène (hypoxie), ce facteur est activé et assure l'expression de ses cibles.

4.1.1. Découverte d'HIF-1

HIF-1 a été découvert à la suite de l'identification d'un élément de réponse à l'hypoxie (HRE, pour *Hypoxia Response Element*) dans la région promotrice du gène de l'érythropoïétine. Cette hormone stimule la prolifération des érythrocytes et est induite par

l'hypoxie. Un consensus a été déterminé pour le HRE d'HIF-1 : 5'-A/TCGTG-3'. Le facteur de transcription qui se fixe sur cette séquence est un dimère de deux protéines : HIF-1 α et HIF-1 β . HIF-1 β est connue également sous le nom d'ARNT (pour *Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator*). Ces deux protéines sont exprimées de façon constitutive mais HIF-1 α est rapidement dégradée dans des conditions de normoxie (Ke & Costa, 2006).

Le gène *hif-1 α* , composé de 15 exons, produit après transcription et traduction, une protéine de 826 acides aminés. Celle-ci comprend un domaine de liaison à l'ADN (participant également à la dimérisation avec HIF-1 β) appelé bHLH pour *basic Helix-Loop-Helix*, un domaine de dimérisation avec HIF-1 β appelé PAS pour *PER-ARNT-SIM* (du nom des trois premières protéines identifiées contenant ce motif structural) ainsi que deux domaines de transactivation N- et C-terminaux (NAD ou N-TAD, *NH2-terminal TransActivation Domain*, et CAD ou C-TAD, *Carboxy terminal TAD*). Le C-TAD est responsable de l'interaction d'HIF-1 avec ses coactivateurs tels que CBP/p300 (*CREB (cAMP Response Element Binding protein) Binding Protein*). HIF-1 α contient également un domaine de dégradation dépendant de l'oxygène (ODDD, *Oxygen Dependant Degradation Domain*) qui va permettre de réguler sa stabilité (cf. *Figure 14*). Elle possède également une séquence d'adressage nucléaire (NLS, *Nuclear Localization Signal*) qui lui permet sa localisation nucléaire indissociable de son rôle de facteur de transcription.

HIF-1 β , comme HIF-1 α , fait partie de la famille des protéines à domaine d'homologie bHLH-PAS (cf. *Figure 14*). Elle possède dans sa région N-terminale un domaine de localisation nucléaire et en C-terminale un unique domaine de transactivation.

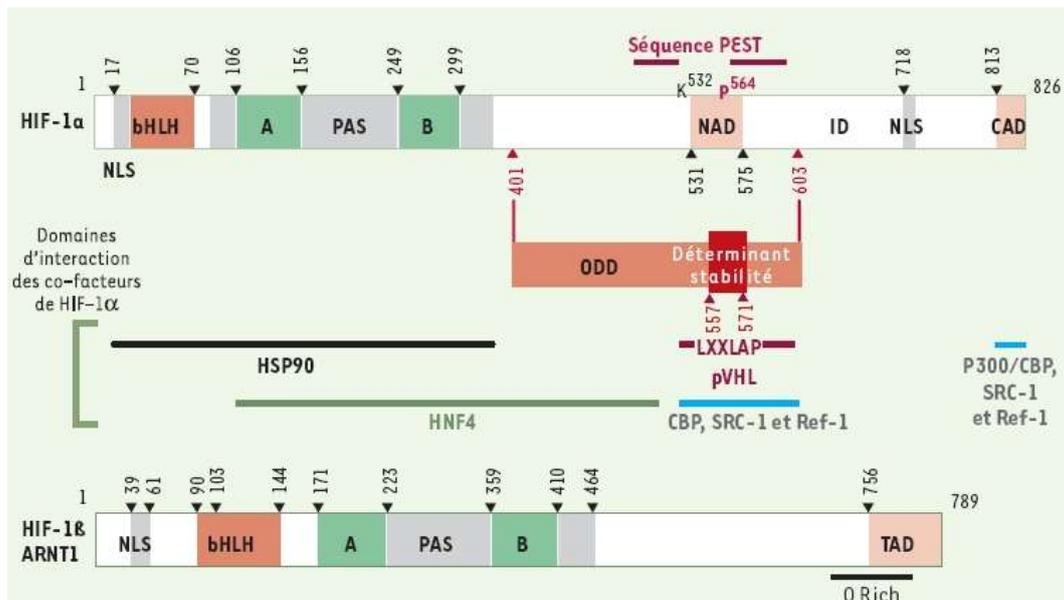


Figure 14 : Structure de HIF-1 α et HIF-1 β (Gothie & Pouyssegur, 2002).

Deux autres protéines de structure proche de HIF-1 α ont été découvertes par la suite. HIF-2 α [aussi appelée EPAS (*Endothelial PAS*), HLF (*HIF-like Factor*), HRF (*HIF Related Factor*) et MOP2 (*Member Of the PAS superfamily 2*)] et HIF-3 α . HIF-2 α partage 48 % d'homologie au niveau de la séquence d'acides aminés avec HIF-1 α . Elle peut également s'hétérodimériser avec HIF-1 β et se fixer sur des HRE. A la différence de l'expression ubiquitaire d'HIF-1 α , HIF-2 α ne s'exprime que dans les poumons et dans les cellules endothéliales. HIF-3 α s'exprime dans de nombreux tissus, peut également se dimériser et interagir avec HIF-1 β . Elle possède un variant d'épissage alternatif appelé IPAS (*Inhibitory PAS*) qui agit comme un dominant négatif vis à vis d'HIF-1 α . En effet, il peut se fixer à HIF-1 α dans sa région N-terminale et empêcher ainsi sa liaison à l'ADN. Les études actuelles se sont surtout centrées sur HIF-1 α (Ke & Costa, 2006).

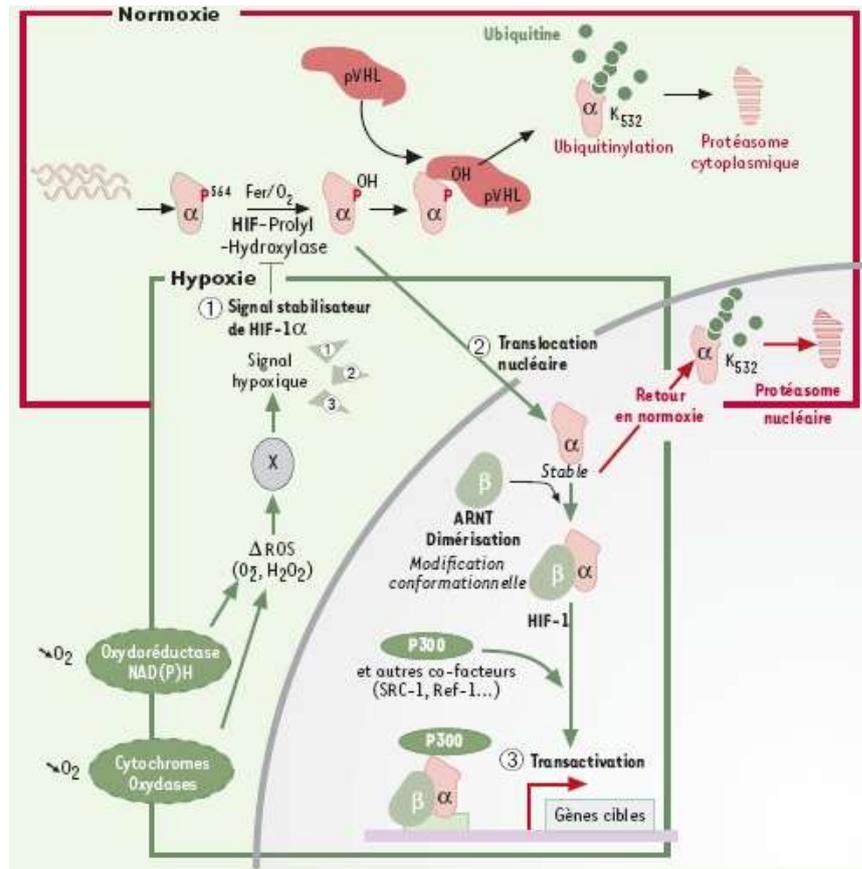


Figure 15 : Mode d'action d'HIF-1α (Gothie & Pouyssegur, 2002)

L'activation d'HIF-1α nécessite tout d'abord sa stabilisation, sa translocation nucléaire, sa dimérisation avec HIF-1β, son interaction avec des coactivateurs et sa fixation à l'ADN sur des séquences HRE (cf. *Figure 15*).

4.1.2. Régulation de la stabilité d'HIF-1α par la protéine Von Hippel Lindau (VHL)

HIF-1α est exprimée de manière constitutive mais elle est rapidement dégradée dans des conditions de normoxie (demi-vie inférieure à 5 min). Plus la concentration en oxygène baisse, plus la protéine va être stabilisée et s'accumuler (cf. *Figure 15*). Les variations de la

concentration en oxygène sont perçues par une famille de protéines appartenant aux dioxygénases dépendantes du 2-oxoglutarate et du fer. Ces réactions d'hydroxylation nécessitent la présence d'oxygène, de fer (II) et de 2-oxoglutarate ou α -cétoglutarate et produisent du succinate et du dioxyde de carbone (Hirota & Semenza, 2006). Quand le niveau d'oxygène est trop faible, ces réactions d'hydroxylation ne peuvent plus se dérouler ce qui stabilise HIF-1 α . Leur activité étant strictement dépendante de la concentration en oxygène, ces protéines sont donc de bons senseurs à oxygène (Ke & Costa, 2006).

Les premières protéines régulant la stabilité d'HIF-1 α sont des prolyl-hydroxylases appelées PHD1 à 3 (*Prolyl-Hydroxylase Domain containing protein*) qui hydroxylent HIF-1 α sur deux résidus proline en position 402 et 564 du domaine ODD (cf. *Figures 15 et 16*). Ces résidus sont situés dans un motif très conservé : L-X-X-L-A-P (A, Alanine ; L, Leucine ; P, Proline). L'hydroxylation est essentiellement réalisée par la PHD2. Ces modifications permettent à la protéine VHL (*Von Hippel Lindau*) de se fixer sur HIF-1 α (Pouyssegur *et al.*, 2006). En amont, VHL s'associe avec les élongines B et C, la culline 2 et Rbx pour former le complexe VCB-cul2 E3 ubiquitine ligase. Ce complexe peut ainsi interagir avec HIF-1 α et lui ajouter une queue d'ubiquitine. Cette dernière le cible pour sa dégradation par le protéasome 26S (Ke & Costa, 2006).

PHD2 et le complexe E3 ubiquitine ligase sont présents dans tous les compartiments cellulaires ce qui permet une rapide adaptation de la cellule lors du retour à des conditions de normoxie. Il a récemment été montré qu'une acétyltransférase appelée SSAT2 (pour *Spermidine/Spermine-N-Acetyltransferase 2*) est essentielle à la formation du complexe ubiquitine ligase. En effet, elle peut interagir avec HIF-1 α , VHL et l'élongine C. Il semblerait qu'elle stabilise les interactions entre VHL et l'élongine C et ainsi favoriserait l'ubiquitination d'HIF-1 α (Baek *et al.*, 2007).

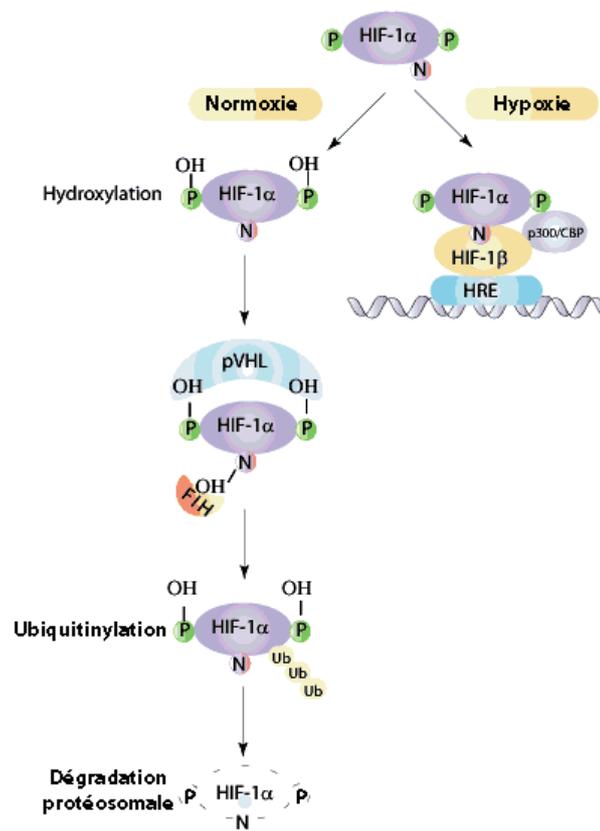


Figure 16 : Régulation de la stabilité d'HIF-1 α par des hydroxylation.

Le second niveau de régulation est réalisé par une asparagine hydroxylase appelée FIH (pour *Factor Inhibiting HIF-1 α*) (cf. *Figures 15 et 16*). Cette hydroxylation concerne un résidu asparagine en position 803 dans le domaine C-TAD. Une étude cristallographique en 2003 révèle que FIH fonctionne sous une forme dimérique (Lee *et al.*, 2003). L'hypothèse proposée alors impliquait la formation d'un complexe comprenant un dimère de FIH, un dimère de VHL et un dimère de HIF-1 α . En effet, il semblerait que FIH ne détecte pas directement la teneur en oxygène mais qu'elle reconnaisse le dimère VHL-HIF-1 α qui existe en normoxie (cf. *Figure 17*). FIH peut alors se fixer sur le C-TAD de HIF-1 α et l'hydroxyler. Cette modification empêche alors la fixation de coactivateurs tels que CBP/p300, cependant comme le N-TAD n'est pas modifié, un tiers de l'activité transcriptionnelle d'HIF-1 persiste.

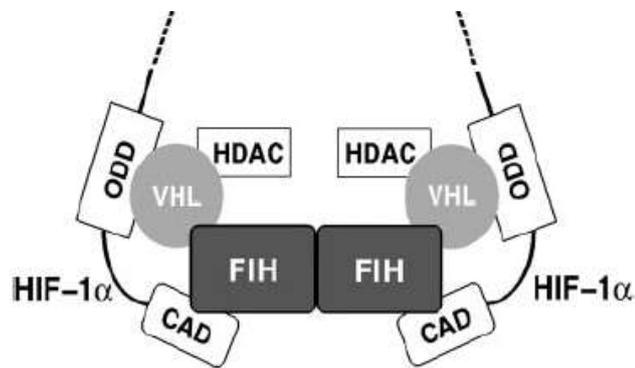


Figure 17 : L'hydroxylation de HIF-1 α par FIH semble faire intervenir au préalable des interactions entre FIH et VHL (Lee *et al.*, 2003).

La stabilisation d'HIF-1 α ne semble pas dépendre uniquement des PHD. En effet, si c'était le cas, l'accumulation d'HIF-1 α devrait s'observer dès que la teneur en oxygène serait sous la barre des 21 %. Or la quantité de la protéine n'augmente que vers 5 % d'oxygène. La stabilisation d'HIF-1 α semble également dépendante de la chaîne mitochondriale de transport d'électrons (Bell *et al.*, 2005). En effet, dans des cellules ρ_0 , cellules qui ne possèdent plus les complexes I, III et IV de la chaîne respiratoire, aucune stabilisation d'HIF-1 α n'a pu être retrouvée en hypoxie. L'hypothèse la plus probable est que l'hypoxie induit, par un mécanisme actuellement indéterminé, l'augmentation de la formation de ROS (*Reactive Oxygen Species*) au niveau de la chaîne respiratoire ce qui permettrait la stabilisation d'HIF-1 α (cf. *Figure 15*). Cette hypothèse est supportée par le fait que l'utilisation d'antioxydants empêche la stabilisation d'HIF-1 α . Trois voies de signalisation ont été décrites comme pouvant être impliquées dans la stabilisation d'HIF-1 α suite à une augmentation de ROS : voie des petites GTPases comme Rac et Rho, c-src kinase ou p38 α MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinase*). Ces voies aboutiraient à une inhibition des hydroxylases et donc à la stabilisation d'HIF-1 α . Des études sont à réaliser afin de déterminer précisément les

mécanismes mis en jeu dans la régulation des PHD.

Des modifications post-traductionnelles sont également capables de modifier la stabilité d'HIF-1 α dont l'acétylation et la nitrosylation. Par double hybride, une protéine pouvant se lier sur le domaine ODD d'HIF-1 α a été mise en évidence : il s'agit d'ARD1 (*ARrest Defective-1 protein*) qui est une acétyltransférase (Jeong *et al.*, 2002). Les interactions entre ces deux protéines sont plus fortes en normoxie qu'en hypoxie. ARD1 diminue la stabilité d'HIF-1 α en acétylant le résidu lysine 532. Cette modification augmente l'ubiquitination d'HIF-1 α en favorisant son interaction avec VHL. Par ailleurs, Li *et al.* ont observé que l'irradiation et l'implantation dans des Souris de cellules de tumeurs du sein murines provoquent l'augmentation d'HIF-1 α ainsi que son activité transcriptionnelle (Li *et al.*, 2007). L'utilisation d'un inhibiteur de la NO synthase annule cet effet indiquant que la nitrosylation de HIF-1 α est responsable de cette activation. En effet, la nitrosylation du résidu Cystéine 520 du domaine ODD entraîne une diminution de ses interactions avec VHL, qui ne peut plus cibler HIF-1 α pour sa dégradation par le protéasome. L'augmentation de l'activité transcriptionnelle s'explique, quant à elle, par la nitrosylation d'un autre résidu impliqué dans les interactions avec des coactivateurs (cf. paragraphe suivant).

4.1.3. Régulation de l'expression et de l'activité transcriptionnelle d'HIF-1 α indépendante des hydroxylases et de VHL

Différentes voies de signalisation ainsi que différentes protéines peuvent être impliquées dans l'accumulation d'HIF-1 α soit au niveau transcriptionnel/traductionnel ou soit au niveau de sa stabilité ou de son activité transcriptionnelle sur ses cibles que ce soit en normoxie ou en hypoxie.

➤ Régulation de l'expression d'HIF-1 α

Il a été montré qu'un certain nombre de facteurs de croissance peuvent modifier l'expression d'HIF-1 α en normoxie. L'IGF1 est connue pour activer en parallèle la voie des PI3-Kinases et la voie des MAPK ce qui aboutit à une augmentation de la synthèse protéique de HIF-1 α et à une sur-expression de ses cibles dont le VEGF (*Vascular Endothelium Growth Factor*) dans les cellules cancéreuses coliques (Fukuda *et al.*, 2002).

La voie des PI3-Kinases/Akt peut aboutir à l'activation de nombreux facteurs dont HDM2 (Bardos *et al.*, 2004). HDM2 est l'orthologue humain de MDM2 (pour *Mouse Double Minute*). Cette protéine, cible transcriptionnelle de p53, est connue pour cibler des protéines afin de permettre leur dégradation par le protéasome. HDM2 semble également impliquée dans la régulation d'HIF-1 α . En effet, l'activation de HDM2 par phosphorylation de la serine 166 provoque l'augmentation de l'expression d'HIF-1 α qui ne semble pas être due à une stabilisation de la protéine mais à une synthèse *de novo*. Par ailleurs, contrairement à ce qui était connu, cette sur-expression est indépendante de p53 et serait due à l'activation de la voie des PI3-Kinases/Akt.

Une étude plus récente implique également la voie des PI3-Kinases/Akt dans l'augmentation de la traduction de HIF-1 α en normoxie et en hypoxie dans différents types cellulaires (U87-MG, PC3). L'utilisation de siRNAs dirigés contre Akt1 inhibe toute accumulation de la protéine en présence ou en absence d'inhibiteurs des PHDs. Dans des conditions classiques de supplémentation en sérum, cette voie de signalisation apparaît comme insensible à la rapamycine et serait donc indépendante de mTOR. En revanche, dans des conditions de carence en sérum, la rapamycine provoque une diminution de l'expression de HIF-1 α ce qui suggère l'implication d'une autre voie de signalisation, mTOR dépendante

(Pore *et al.*, 2006).

Par ailleurs, il semblait établi que l'hypoxie induisait la sur-expression de HIF-1 α via sa stabilisation. Pourtant, des données nouvelles apparaissent et montrent qu'en plus de cela, elle peut également provoquer l'augmentation de la traduction d'HIF-1 α . En effet, une étude récente de 2006 a montré que l'hypoxie induisait l'augmentation de la traduction d'HIF-1 α en distribuant les ARNm dans des fractions polysomales plus importantes en cours de traduction. Cette modification nécessite un flux calcique ainsi que l'activation de la protéine kinase C classique, cPKC- α et de mTOR. Cette augmentation de la traduction procure 40 à 50 % de la quantité d'HIF-1 α après 3h d'hypoxie (1 %). Hui *et al.* suggèrent que l'activation de la cPKC α et que le flux calcique assurent la traduction sélective des ARNm nécessaires à l'adaptation à l'hypoxie en conférant à mTOR une activité minimale et très spécifique (Hui *et al.*, 2006). Les précédentes données de la littérature indiquaient que des conditions d'hypoxie induisent une inhibition de mTOR et un arrêt de la traduction dépendante des ARNm coiffés. La traduction d'HIF-1 α semblait alors indépendante de mTOR et possible grâce à un IRES (*Internal Ribosome Entry Site*) (Lang *et al.*, 2002).

➤ Régulation de la stabilité de HIF-1 α via son interaction avec des facteurs différents des hydroxylases

En plus de la régulation de HIF-1 α par les PHDs et FIH, d'autres facteurs peuvent également contrôler sa stabilité. Ainsi, la protéine de choc thermique HSP90 (*Heat Shock Protein 90*) est une protéine chaperonne qui protège ses cibles d'un mauvais repliement et de leur dégradation par le protéasome. Elle a été montrée comme se liant à HIF-1 α au niveau de

son domaine PAS (Liu *et al.*, 2007). Les inhibiteurs d'HSP90 induisent la dégradation protéosomale d'HIF-1 α *via* un mécanisme indépendant de VHL et de l'oxygène ce qui suggère un rôle important d'HSP90 dans la stabilisation d'HIF-1 α en normoxie. Liu *et al.* ont montré que la dégradation protéosomale d'HIF-1 α peut être induite par la protéine Rack1, qui entrerait en compétition avec HSP90 pour sa liaison avec HIF-1 α . De ce fait, l'absence de Rack1 ne permet plus la dégradation protéosomale d'HIF-1 α induite par des inhibiteurs d'HSP90. Plus précisément, Liu *et al.* ont mis en évidence que Rack1 peut se lier avec l'élongine C et promouvoir l'ubiquitination d'HIF-1 α indépendamment de la teneur en oxygène (Liu *et al.*, 2007).

D'autres protéines participent à la reconnaissance d'HIF-1 α par le protéasome. Ainsi, la protéine BRCA1 (*BReast CAncer susceptibility gene 1*), mutée dans les cancers héréditaires du sein et de l'ovaire, semble impliquée dans la stabilisation d'HIF-1 α en hypoxie *via* une interaction directe (Kang *et al.*, 2006). Des cellules ayant une réduction de l'expression de BRCA1 par siARNs présentent une diminution de la demi-vie d'HIF-1 α en hypoxie. Ces effets peuvent être réversés par des inhibiteurs du protéasome, suggérant que BRCA1 est capable de protéger HIF-1 α de sa dégradation par le protéasome en hypoxie.

Dans des conditions hypoxiques, et contrairement à ce qui a été décrit en normoxie concernant HDM2, il a été montré que la protéine p53 pouvait interagir avec HIF-1 α et la déstabiliser en rapprochant HDM2 et HIF-1 α . HDM2 peut alors l'ubiquitinyler afin de provoquer sa dégradation (Ravi *et al.*, 2000).

Par ailleurs, par double hybride, la protéine Jab1 (protéine initialement décrite comme étant un coactivateur de c-Jun et Jun D, *Jun Activation domain-Binding protein-1*) a été identifiée comme interagissant avec HIF-1 α en normoxie et en hypoxie. L'affinité de VHL étant très forte pour HIF-1 α en normoxie, l'interaction Jab1/HIF1- α n'est pas suffisante pour

provoquer un changement de stabilité de la protéine. En hypoxie, il semblerait qu'il y ait une compétition entre Jab1 et p53 en faveur de Jab1 induisant la stabilisation d'HIF-1 α couplée à une augmentation de son activité transcriptionnelle (Bae *et al.*, 2002). Les modalités précises de ce mécanisme restent encore à élucider.

Les résidus lysine du domaine ODD d'HIF-1 α peuvent également subir des modifications post-traductionnelles autres que la nitrosylation comme la sumoylation. La sumoylation consiste en la liaison covalente d'un *small ubiquitin-like modifier* (SUMO) à un résidu lysine spécifique d'une protéine cible donnée. La protéine HIF-1 α possède trois séquences consensus de sumoylation (Ψ KXE ; Ψ , pour un acide aminé hydrophobe ; X, pour n'importe quel acide aminé). Bae *et al.* ont récemment mis en évidence une sumoylation des résidus lysines 391 et 477 d'HIF-1 α , cette modification augmentant la stabilité et l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α (Bae *et al.*, 2004).

➤ Régulation de la localisation de HIF-1 α

La prostaglandine PGE2 ne provoque pas l'augmentation de la synthèse d'ARNm codant HIF-1 α mais une augmentation de la protéine ainsi qu'une localisation préférentiellement nucléaire. En effet, PGE2 induirait la phosphorylation d'HIF-1 α *via* les MAP kinases ce qui la stabiliserait et lui permettrait de se localiser dans le noyau et d'assurer ainsi la transcription de ces cibles (Liu *et al.*, 2002).

Il a récemment été découvert en position sérine 641 et 643, deux sites de phosphorylation par la p42/p44 MAP kinase (Mylonis *et al.*, 2006). Des mutants d'HIF-1 α non phosphorylables sur ces sites perdent leur capacité transcriptionnelle, sans perdre leur

stabilité, et leur localisation est exclusivement cytoplasmique. Ces données suggèrent que la phosphorylation des sérines 641 et 643 par la p42 MAPK est responsable de la localisation nucléaire d'HIF-1 α , indispensable à son rôle de facteur de transcription. L'utilisation d'un inhibiteur de l'exportine nucléaire CRM1, la leptomycine B, restaure la localisation nucléaire ainsi que l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α ce qui indique que ces phosphorylations ne permettent pas la localisation nucléaire d'HIF-1 α mais empêchent son export vers le cytoplasme.

➤ Régulation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α

L'hypoxie provoque une diminution de la quantité d'ATP ce qui active l'AMPK. Cette activation induit dans la lignée cancéreuse prostatique Du145 l'activation transcriptionnelle d'HIF-1 α de manière indépendante de la voie de signalisation des PI3-Kinases/Akt (Lee *et al.*, 2003). Par contre, l'AMPK n'est pas impliquée dans la modulation de l'expression d'HIF-1 α , dans sa stabilisation ou dans sa localisation nucléaire. Mais il est à noter que la phosphorylation d'HIF-1 α par l'AMPK seule est insuffisante pour provoquer l'activation transcriptionnelle d'HIF-1 α sur ses cibles.

p53, comme nous l'avons vu précédemment peut réguler la stabilité d'HIF-1 α , mais il semble également impliqué dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de cette dernière en entrant en compétition avec elle pour leur liaison avec le coactivateur CBP/p300. p300 augmente la transactivation des facteurs de transcription avec lesquels il interagit en entraînant le remodelage de la chromatine dans une conformation permettant un accès plus facile aux facteurs de transcription. De ce fait, la liaison de HIF-1 α à CBP/p300 entraîne une augmentation de l'activité transcriptionnelle d'HIF-1 α . A de faibles concentrations, p53

entrerait en compétition avec HIF-1 α pour sa liaison avec CBP/P300 alors qu'à de fortes concentrations, p53 induirait plutôt sa dégradation *via* HDM2 (Schmid *et al.*, 2004). Par ailleurs, la nitrosylation par le monoxyde d'azote (dérivé de donneurs de NO ou produit par la iNOS, NO synthase inductible) de la cystéine 800 du domaine TAD de HIF-1 α induit une augmentation des interactions entre HIF-1 α et p300 se traduisant là aussi par une augmentation de son activité transcriptionnelle (Yasinska & Sumbayev, 2003).

L'activité transcriptionnelle de HIF-1 α semble, par ailleurs, pouvoir être régulée par mTOR. Land *et al.* ont observé une augmentation de l'activité transcriptionnelle de HIF-1 α dans une lignée où mTOR est activée par sur-expression de Rheb (Land & Tee, 2007). Le niveau d'expression de HIF-1 α ainsi que sa stabilité ne sont pas modifiés. L'activité d'HIF-1 α est inhibée par la rapamycine ce qui suggère plus précisément l'implication du complexe mTORC1. Un motif TOS (*mTOR Signalling motif*) -FVMVL- a été identifié dans une région en aval du PAS-A d'HIF-1 α , qui permet l'interaction avec Raptor et ainsi avec tout le complexe mTORC1. La phénylalanine F99 est essentielle à cette interaction puisque la mutation F99A l'en empêche. Par ailleurs, HIF-1 α F99A est transcriptionnellement inactif et cette mutation lui confère même une fonction de dominant négatif. Ce mutant conserve, en revanche, sa stabilité, sa capacité à se dimériser avec HIF-1 β et sa localisation nucléaire. Par contre, ce mutant perd sa capacité à se lier à son coactivateur CBP/P300 ce qui suggère que mTOR pourrait jouer un rôle dans la formation du complexe transcriptionnellement actif. Des études complémentaires sont à mener afin de comprendre précisément les mécanismes mis en jeu dans l'activation transcriptionnelle de HIF-1 α par mTOR. Cependant, ce modèle d'étude présente des limites car en activant mTOR *via* la sur-expression de Rheb il empêche toute régulation par le complexe TSC1/TSC2 et passe outre la boucle de régulation négative d'HIF-1 α sur mTOR *via* la protéine REDD1 (*REgulated in Development and DNA damage*

responses 1)(Land & Tee, 2007).

Brugarolas *et al.* ont également mis en évidence que l'activation de mTOR suite à une inactivation de TSC2 induit également l'accumulation de HIF-1 α ainsi que de ses cibles dont le VEGF (Brugarolas *et al.*, 2003). Alors que l'inhibition de mTOR par la rapamycine normalise le niveau d'HIF-1 α , de façon intéressante, dans cette étude, le niveau du VEGF ne semble que partiellement réduit par la rapamycine mais inhibé par un inhibiteur des histones déacétylases ce qui suggère que d'autres voies sont impliquées dans la synthèse du VEGF.

4.2. Implication d'HIF-1 et de ses cibles dans la réponse hypoxique

En 2007, plus de 100 gènes ont été recensés comme étant régulés par HIF-1 (Harris, 2002; Ke & Costa, 2006). Ces gènes permettent notamment l'adaptation de la cellule face à une carence en oxygène. Ils sont impliqués dans le transport de l'oxygène et le métabolisme du fer, dans l'angiogénèse, dans la glycolyse et le transport du glucose ainsi que dans la prolifération et la survie cellulaire (cf. *tableau 2*).

L'hypoxie induit l'expression de nombreux facteurs de croissance impliqués dans la prolifération cellulaire comme le TGF β (*Transforming Growth Factor β*), le PDGF (*Platelet Derived Growth Factor*), l'IGF2 (*Insulin like Growth Factor 2*), Cela a pour effet de promouvoir la migration cellulaire et la régénération après des dommages subis suite à une hypoxie sévère. La fixation de ces facteurs de croissance sur leur récepteur induit, *via* les voies de signalisation p42/p44 MAPK et PI3-Kinases/Akt, la prolifération et la survie cellulaire ainsi que l'activation d'HIF-1 α .

La diminution de la teneur en oxygène provoque une modification de la voie de

synthèse de l'ATP. La voie mitochondriale de production d'ATP *via* le cycle des acides tricarboxyliques et la chaîne de transport d'électrons est remplacée par la glycolyse anaérobie. La glycolyse anaérobie produit de l'acide lactique et les anhydrases carboniques qui permettent la formation d'acide carbonique à partir de dioxyde de carbone et d'eau, sont responsables de l'acidification du milieu extérieur. A la différence des 38 molécules d'ATP produites dans le premier cas, la glycolyse ne permet que la synthèse de 2 molécules d'ATP. HIF-1 régule l'expression de toutes les enzymes glycolytiques ainsi que des transporteurs de glucose Glut1 et Glut3. Cela assure une augmentation de l'entrée de glucose nécessaire à la formation d'ATP. Cela permet également de fournir les précurseurs nécessaires pour la synthèse de glycine, sérine, purines, pyrimidines et de phospholipides (Harris, 2002).

En réponse à l'hypoxie, la capacité des hématies à transporter l'oxygène est augmentée par sur-expression des gènes impliqués dans l'érythropoïèse et dans le métabolisme du fer. L'augmentation du nombre d'hématies accroît par voie de conséquence le volume d'oxygène fourni au niveau tissulaire. La production de l'hème est l'étape limitante de la production d'hématies ce qui explique que tout le métabolisme du fer soit activé (Ke & Costa, 2006).

L'angiogénèse est également un processus activé lors de l'hypoxie. Le principal acteur est le VEGF. Il recrute activement dans les zones hypoxiques les cellules endothéliales et les fait se multiplier afin d'accroître la densité vasculaire et limiter la diffusion passive de l'oxygène (Harris, 2002; Ke & Costa, 2006).

<p>Métabolisme du glucose</p> <p>Adénylate kinase 3, aldolase A, aldolase C, éno­lase 1, glucose transporteur 1, glucose transporteur 3, glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase, hexokinase 1, hexokinase 2, lactate déshydrogénase A, NIP3, phosphofruc­to­kinase L, phosphoglycérate kinase 1, pyruvate kinase M, triosephosphate isomérase</p>
<p>Prolifération cellulaire / viabilité</p> <p><i>Insulin-like growth factor 2, IGF binding protein 1, IGF binding protein 2, IGF binding protein 3, p21, transforming growth factor β3</i></p>
<p>Métabolisme du fer et érythropoïèse</p> <p>Céru­léoplasmine, érythropoïétine, transferrine, récepteur de la transferrine</p>
<p>Développement vasculaire /remodelage et tonus vasomoteur</p> <p>Récepteur α_{1B}-adrénergique, adrénomédulline, endothéline-1, hème oxy­gé­nase-1, <i>nitric oxyde synthase 2, plasminogen activator inhibitor 1, vas­cu­lar endothelial growth factor (VEGF), récepteur du VEGF R1 (FLT1)</i></p>
<p>Autres</p> <p>Anhydrase carbonique 9, p35srj, prolyl-4-hydroxylase α (I)</p>

Tableau 2 : Liste des principaux gènes dont l'expression est activée par HIF-1
(Gothie & Pouyssegur, 2002)

L'hypoxie peut modifier l'ADN cellulaire de telle sorte que cela puisse induire la transformation cellulaire. L'activité des télomérases augmente en hypoxie ce qui favorise l'immortalisation. L'hypoxie est connue pour induire des amplifications géniques, des cassures chromosomiques au niveau des sites fragiles et d'inhiber la réparation de l'ADN. Les histones déacétylases, impliquées dans des modifications de l'organisation de la chromatine et dans la tumorigénèse sont également activées par l'hypoxie (Harris, 2002; Ke & Costa, 2006).

4.3. Présentation détaillée de deux cibles de HIF-1 : les protéines VEGF et BNIP3

4.3.1. Le VEGF (*Vascular Endothelium Growth Factor*)

Le VEGF-A (*Vascular Endothelium Growth Factor*) est également connue sous le nom de VPF (*Vascular Permeability Factor*). Il a été découvert au début des années 1980. Le VEGF est un facteur de croissance puissant et diffusible capable d'induire spécifiquement la prolifération des cellules endothéliales vasculaires. C'est également un facteur de survie pour ces mêmes cellules. Le VEGF joue, en outre, un rôle important dans l'hématopoïèse et est capable de réguler la perméabilité et la constriction vasculaire (Ferrara, 2004).

Le gène *vegf* est composé de huit exons et de sept introns et est localisé sur le chromosome 6p21.3. Différents épissages alternatifs permettent la synthèse de neuf isoformes différentes (cf. *Figure 18*). Elles possèdent toutes une séquence signal permettant leur sécrétion, un site de dimérisation, les sites d'interactions avec leur récepteur. Les isoformes les plus longues possèdent également des sites de liaison avec la matrice extracellulaire (Woolard *et al.*, 2004).

Les isoformes les plus exprimées sont les formes 121, 189, 206 et surtout la forme 165. Toutes les isoformes possèdent la même fonction sauf l'isoforme 165b qui aurait un effet inhibiteur de la fonction du VEGF (Ferrara, 2004). Le VEGF 165 est une glycoprotéine homodimérique d'environ 45 kDa qui est capable de se lier avec l'héparine de la matrice extracellulaire (MEC). La liaison entre les deux monomères se fait *via* deux ponts disulfure. Le VEGF 121 est une petite protéine acide qui ne peut se lier à la MEC et qui est donc extrêmement diffusible. Les VEGF 189 et 206 sont des protéines basiques qui sont liées à la MEC. L'isoforme 165 possède la capacité d'être liée à la MEC ou diffusible.

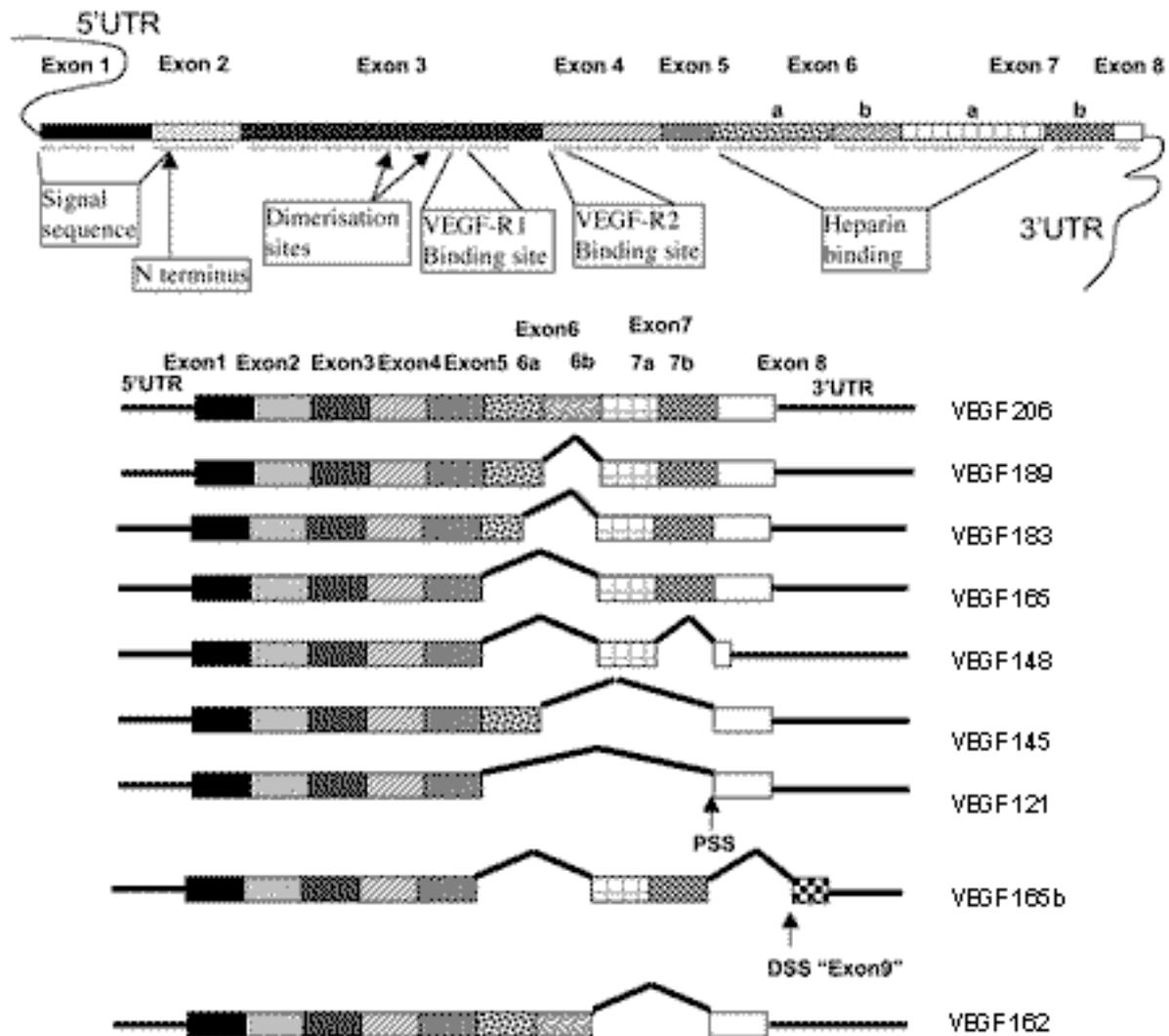


Figure 18 : Structure des différentes isoformes de *veg*f (d'après (Woolard *et al.*, 2004))

Les formes liées à la MEC peuvent être libérées après clivage par une héparinase ou par une plasmine (Park *et al.*, 1993).

Le VEGF présente de fortes homologies avec le facteur de croissance PDGF. Le VEGF se lie sur deux récepteurs de type tyrosine kinase VEGFR1/Flt-1 (*Fms-related Tyrosine kinase 1*) et VEGFR2/KDR (*Kinase insert Domain containing Receptor*) et interagit avec une famille de corécepteurs, les neuropillines. VEGFR1 semble être un récepteur inhibiteur (« decoy ») pour VEGF-A. La liaison sur le VEGFR2 est responsable de la

prolifération, migration, survie et angiogénèse des cellules endothéliales (Ferrara, 2004).

Outre l'induction du VEGF par l'hypoxie, il a été montré qu'il pouvait également être induit par une carence en sérum dans des cellules cancéreuses coliques HT29 (Jung *et al.*, 1999). Cette activation est indépendante d'HIF-1 α et est induite par l'activation des kinases Erk1 et Erk2 (*Extracellular signal-Regulated Kinases 1 and 2*).

4.3.2. BNIP3 (*Bcl-2/E1B Nineteen Interacting Protein*)

BNIP3 est une protéine pro-apoptotique de la famille de Bcl-2 (cf. paragraphe 3.2). Guo *et al.* ont démontré que BNIP3 est induite par l'hypoxie dans de nombreux types cellulaires dont des cardiomyocytes de rat et qu'elle possède dans son promoteur un élément HRE. Cette induction repose sur l'activation d'HIF-1 et est indépendante de p53. Par ailleurs, la mort induite semble indépendante de l'activation des caspases 3 et 9 et de la libération du cytochrome c, cette mort ne serait donc pas de type apoptotique. Les auteurs n'ont pas déterminé plus précisément si la mort était de type nécrotique ou autophagique (Guo *et al.*, 2001).

D'autres études ont renforcé le rôle de BNIP3 dans la mort induite par des conditions hypoxiques. En effet, Kothari *et al.* ont observé une sur-expression de BNIP3 dans les régions hypoxiques et démontré que cette sur-expression est due à l'activation d'HIF-1 α (Kothari *et al.*, 2003). Par ailleurs, la sur-expression ectopique de BNIP3 induit une mort cellulaire de type non précisée, suite à l'hypoxie dans des cellules épithéliales humaines alors que son inhibition entraîne une diminution de la mort cellulaire induite par l'hypoxie dans les cellules HEK293. BNIP3 apparaît donc comme responsable de la mort induite par l'hypoxie, à noter que cette mort peut être contrecarrée par l'ajout de facteur de croissance.

4.4. HIF-1 et processus de mort cellulaire

HIF-1 est connu pour promouvoir l'adaptation et la survie des cellules en conditions hypoxiques. Pourtant l'hypoxie peut également induire différents types de mort cellulaire. Tout d'abord, l'hypoxie peut inhiber la chaîne mitochondriale de transporteurs d'électrons ce qui induit la perméabilisation de la membrane interne et induit l'apoptose suite à la libération de cytochrome c et de l'activation de la caspase 3. L'hypoxie peut également provoquer la formation de ROS ou activer la voie des JNK/SAPK (*c-Jun NH2-terminal Kinase/Stress Activated Protein Kinase*) aboutissant également à l'induction de l'apoptose (Greijer & van der Wall, 2004).

Par ailleurs, l'hypoxie peut entraîner la stabilisation de p53, qui est dépendante de la présence d'HIF-1 α , ainsi que son activation transcriptionnelle, qui est par contre indépendante d'HIF-1 α . L'activation de p53 permet, quant à elle, d'induire une mort de type apoptotique *via* la sur-expression de protéines pro-apoptotiques cibles de p53 telles que Bax, Noxa et Puma. Il est par ailleurs décrit que p53 est capable d'interagir avec HIF-1 α ce qui stabilise p53 mais qui inhibe sa liaison avec HIF-1 β . En outre, cette interaction avec p53 peut également rapprocher HIF-1 α de Mdm-2 ce qui le cible pour une dégradation protéosomale (Ravi *et al.*, 2000). L'interaction entre p53 et HIF-1 α semble dépendante du statut de phosphorylation d'HIF-1 α : HIF-1 α phosphorylé interagit avec HIF-1 β ce qui favorise la survie cellulaire alors que sa forme non phosphorylée peut interagir avec p53 ce qui permet l'activation des cibles de p53 et ainsi l'apoptose. La balance survie/apoptose est également régulée par l'intensité de l'hypoxie : l'anoxie promeut essentiellement la mort cellulaire (Piret *et al.*, 2002).

Il est par ailleurs intéressant de signaler que certaines protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 peuvent également être régulée par HIF-1 α et donc également activer l'apoptose. C'est le cas de Noxa qui possède un HRE dans son promoteur ce qui fait de lui une cible directe d'HIF-1 α (Kim *et al.*, 2004). Une autre protéine de cette famille régulée par HIF-1 α est BNIP3 dont le rôle dans l'autophagie a été précédemment décrit. Dans des conditions hypoxiques, la sur-expression de BNIP3 ou de son homologue BNIP3L (connue également sous le nom de NIX) provoque une mort de type apopto/nécrotique selon la quantité d'ATP disponible. BNIP3 provoquerait cette mort en interagissant et en inhibant Bcl-2 et Bcl-xL (Ray *et al.*, 2000; Greijer & van der Wall, 2004).

Alors que l'activation de p53 par l'hypoxie peut provoquer la sur-expression de Bax et d'autres protéines pro-apoptotiques, de manière contradictoire, il a déjà été montré que la carence nutritive et en oxygène induisait la sous-expression de Bax dans des cellules de carcinomes hépatiques HepG2. En outre, Erler *et al.* ont montré que l'hypoxie induisait la sous-expression des protéines pro-apoptotiques de la famille de Bcl-2 que sont Bid, Bad et Bax dans des cellules cancéreuses coliques, hépatiques, ovariennes, du poumon et dans des fibroblastes embryonnaires. En utilisant la technique de l'ARN interférence, ils ont démontré que l'absence d'HIF-1 α restaurait l'expression de Bid dans des conditions hypoxiques mais ne restaurait pas le niveau d'expression de Bad et de Bax. Ils ont, par la suite, identifié un HRE dans le promoteur de Bid sur lequel se fixe HIF-1 α et contrairement aux autres cibles connues de HIF-1 α , sa fixation sur le promoteur de Bid induit une diminution de son expression. La diminution de l'expression de Bax et de Bad serait la conséquence de la diminution globale de la traduction en réponse à l'hypoxie. Par ailleurs, il avait précédemment été montré que l'hypoxie induisait une sur-expression de Bcl-2 et de Bcl-xL

dans des cancers du poumon et uniquement une surexpression de Bcl-2 dans la lignée HCT116 (Erler *et al.*, 2004). Pour terminer, l'hypoxie provoque également une sur-expression de protéines anti-apoptotiques Mcl-1, de la survivine et de IAP-2 (*Inhibitor of Apoptosis Protein 2*), diminue la libération de cytochrome c ainsi que l'activité de la caspase 3. Les mécanismes moléculaires de la fonction anti-apoptotique d'HIF-1 ne sont pas encore totalement élucidés.

Alors qu'HIF-1 α est capable d'induire l'apoptose, sa sur-expression est très fréquente dans de nombreuses tumeurs humaines (astrocytomes, oligodendrogliomes, mélanomes malins, cancers du tractus digestif, cancer du sein, du poumon, des ovaires, de la prostate, ...) et favorise leur survie (Hirota & Semenza, 2006). Elle est associée à une forte mortalité des patients, un mauvais pronostic et une forte résistance aux traitements. L'introduction chez la Souris de tumeurs colo-rectales HCT116 qui n'expriment pas HIF-1 α , ou sa cible VEGF, révèle qu'elles possèdent une croissance diminuée, indiquant qu'HIF-1 α présente un fort pouvoir tumorigénique et joue donc un rôle important dans la progression tumorale (Dang *et al.*, 2006). La sur-expression d'HIF-1 α apparaît comme étant sans doute la conséquence de l'hypoxie intratumorale et d'altérations génétiques (Zhong *et al.*, 1999; Ke & Costa, 2006). En effet, la croissance tumorale rapide crée, au centre de la tumeur, des régions hypoxiques qui sur-expriment alors HIF-1 α afin de s'adapter à cet environnement (angiogénèse, ...). Des études immuno-histo-chimiques ont montré qu'il existait un niveau faible d'HIF-1 α dans les tumeurs bénignes, un fort niveau dans les tumeurs primaires et un niveau très élevé dans les métastases (Zhong *et al.*, 1999). De plus, de nombreuses altérations génétiques présentes dans les cellules tumorales aboutissent à la sur-expression d'HIF-1 α . C'est le cas lors de la perte de VHL, de p53, et de PTEN ou de l'activation de voies oncogéniques (PI3-Kinases/Akt) qui

sont très fréquentes dans les tumeurs (Zhong *et al.*, 1999; Ke & Costa, 2006).

De nombreux essais thérapeutiques ciblent actuellement HIF-1 α ou sa cible pro-angiogénique VEGF (inhibiteurs du récepteur 2 au VEGF : Semaxanib, PTK787, ...). Ces essais apparaissent comme très importants puisque que les tumeurs hypoxiques sont particulièrement résistantes aux traitements anti-cancéreux (chimiques, radiations, ...). Une étude de Dong et Wang en 2004 a permis de mettre en évidence le rôle de Bcl-xL dans cette résistance des cellules hypoxiques aux traitements (Dong & Wang, 2004). Après avoir sélectionné des cellules résistantes à l'hypoxie par plusieurs cycles hypoxie/normoxie, ils ont montré que ces cellules étaient résistantes face à différentes drogues (cisplatine, staurosporine, azide). Ces cellules se sont révélées sur-exprimées la protéine anti-apoptotique Bcl-xL qui pourrait être à l'origine de la résistance observée. D'autres études sont nécessaires pour évaluer comment sensibiliser de nouveau ces cellules à l'apoptose.

4.5. Liens entre hypoxie et autophagie

Alors que l'existence d'interconnexions entre la réponse à l'hypoxie et l'apoptose est bien connue, l'autophagie est récemment apparue comme pouvant également avoir des liens avec la réponse à l'hypoxie.

Comme précédemment décrit, si mTOR est capable d'activer HIF-1 α , paradoxalement l'hypoxie est également capable de réprimer mTOR et donc d'activer l'autophagie. En effet, dans des conditions hypoxiques, l'activation d'HIF-1 α induit la sur-expression de nombreuses cibles dont REDD1 (également connue sous le nom de RTP801) et REDD2 (ou RTP801L). Or cette protéine est capable d'inhiber mTOR *via* le complexe TSC1/TSC2 (cf *Figure 19*)

(Brugarolas *et al.*, 2004). Cette inhibition pourrait permettre aux processus autophagiques de se développer (cf. paragraphe 1.2.3).

Par ailleurs, l'hypoxie, provoque une carence en ATP activant également la voie de l'AMPK, cette voie a été montrée comme pouvant induire la phosphorylation de TSC2 et par voie de conséquence une inhibition de mTOR (Liu *et al.*, 2006)(cf. paragraphe 1.2.4).

D'autres données montrent que l'hypoxie induit l'hypophosphorylation de mTOR et de ses cibles (4EBP1, p70S6K, ...) dans des cellules rénales embryonnaires humaines immortalisées HEK293. Cette hypophosphorylation n'est pas réversée par ajout de sérum ou d'acides aminés et semble indépendante de l'activité d'Akt, de l'AMPK et de HIF-1 α (Arsham *et al.*, 2003). L'hypoxie induit donc l'hypophosphorylation de mTOR, signal prépondérant par rapport aux autres voies de signalisation connues pour activer mTOR (PI3-kinases/Akt, AMPK, ...).

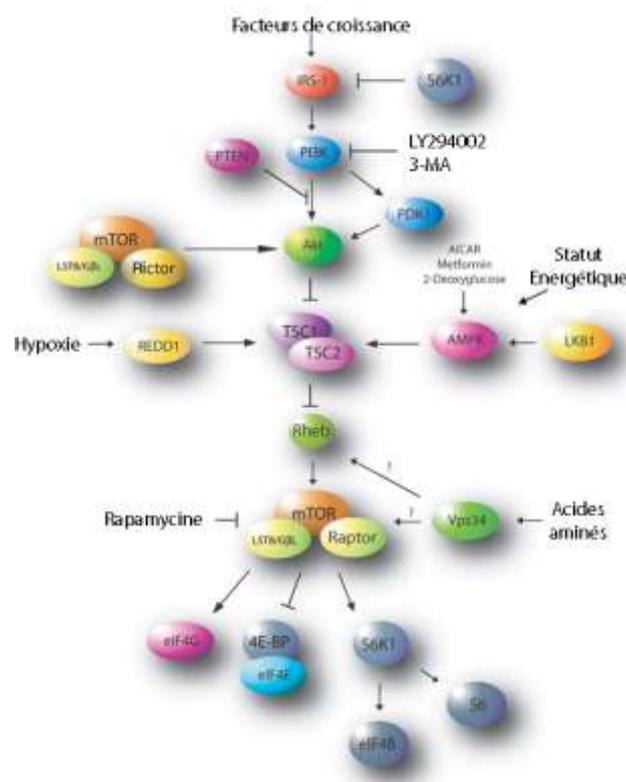


Figure 19 : L'hypoxie induit également l'inhibition de mTOR (Mamane *et al.*, 2006)

Par ailleurs, lors d'un stress hypoxique, nous avons vu que BNIP3 est sur-exprimée *via* l'activation d'HIF-1 α . Il est suggéré que l'induction rapide de BNIP3 dans un environnement hypoxique contribue à la survie cellulaire par des mécanismes autophagiques jusqu'à un point de non-retour où l'acidification de cet environnement en réponse à l'hypoxie induit une mort de type nécrotique. Dans de nombreuses tumeurs, l'expression de BNIP3 est éteinte par des méthylations de son promoteur. Le rôle de BNIP3 dans la progression tumorale et dans la résistance des cellules à une mort induite par l'hypoxie mérite de plus amples investigations (Pouyssegur *et al.*, 2006). Très récemment, il a été montré que l'expression de BNIP3 est réprimée par le suppresseur de tumeur Rb (*RetinoBlastome*) *via* son inhibition du facteur de transcription E2F1 (Tracy *et al.*, 2007). Rb diminue l'induction de BNIP3 ce qui a pour conséquence de limiter la mort cellulaire de type autophagique lors de l'hypoxie. BNIP3 apparaît comme essentiel à l'autophagie induite par l'hypoxie et la formation des autophagosomes est accrue quand des conditions de carence nutritive s'ajoutent à l'hypoxie.

Très récemment, Li *et al.* ont démontré que BNIP3 est capable d'induire l'inhibition de mTOR en hypoxie. En effet, ils ont découvert par double hybride que BNIP3 interagit avec Rheb dans la Levure. La liaison entre ces deux protéines diminue le niveau de Rheb-GTP et inhibe la phosphorylation de la p70S6K ainsi que de 4EBP1, deux cibles de mTOR. BNIP3 interagit avec Rheb *via* son domaine transmembranaire TM et *via* son domaine N-terminal (AA1-114) dans des cellules HEK293. L'extinction de BNIP3 par ARN interférence leur a permis de conforter le rôle de BNIP3 dans l'inhibition de mTOR uniquement en réponse à l'hypoxie. Par ailleurs, cette extinction favorise la croissance des cellules HEK293 réimplantées dans des souris nude en renforçant l'activité de mTOR. Ces données soulignent également la complexité des mécanismes induits par l'hypoxie et permettant l'inhibition de mTOR, un passerait par TSC1/TSC2 *via* l'activation de REDD1/2, l'autre inhiberait

directement Rheb (Li *et al.*, 2007).

BNIP3 semble donc être un facteur clé impliqué dans l'autophagie induite par l'hypoxie.

V. Problématique

L'autophagie est un processus catabolique physiologique impliqué dans de nombreux phénomènes dont l'homéostasie, le développement, la réponse à différents stress, la résistance aux pathogènes, ... Sa dérégulation permet le développement de nombreuses pathologies dont les cancers. De nombreux acteurs pro-autophagiques sont décrits comme étant des suppresseurs de tumeurs ce qui semble indiquer que ce processus puisse jouer un rôle anti-cancéreux, dont le mécanisme n'est actuellement pas totalement déterminé. Pourtant, lors du développement tumoral, il semblerait également que l'autophagie puisse *via* la dégradation de constituants non essentiels ou endommagés procurer un avantage sélectif aux cellules cancéreuses face à un milieu carencé en nutriments. Son inhibition peut potentialiser la mort apoptotique suite à différents traitements thérapeutiques. De forts niveaux d'autophagie dans des cellules déficientes pour l'apoptose peuvent également promouvoir la mort. Tout ceci semble indiquer qu'apoptose et autophagie seraient finement imbriquées l'une par rapport à l'autre. Par ailleurs, ces deux processus sont connectés *via* les protéines de la famille de Bcl-2 et certaines protéines autophagiques dont Atg5 et Atg6. Mais là aussi, il semble actuellement difficile de conclure quant au rôle pro- ou anti-autophagique des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL qui peut varier selon le stress et la compétence des cellules pour l'apoptose. C'est pourquoi il nous a semblé intéressant de nous pencher sur le rôle de ces protéines anti-apoptotiques dans la réponse autophagique de survie de la lignée cancéreuse colo-rectale HCT116 suite à une carence nutritive (carence en sérum et en acides aminés).

La carence nutritive est l'une des caractéristiques de l'environnement tumoral qui est également pauvre en oxygène. Cela est dû à la croissance rapide des cellules cancéreuses. Il a été montré de nombreuses fois que la carence nutritive provoque l'activation de l'autophagie.

Plus récemment, quelques données de littérature indiqueraient que l'inhibition de mTOR par des conditions hypoxiques pourrait également promouvoir l'autophagie. En réalisant des puces à ADN afin d'identifier de nouveaux régulateurs de l'autophagie, nous avons remarqué que la carence nutritive induisait une réponse de type hypoxique. Nous nous sommes alors demandé s'il existait des interconnexions autres que l'inhibition de mTOR entre la réponse à l'hypoxie et l'autophagie. Par ailleurs, comme l'hypoxie induit effectivement l'autophagie dans les HCT116, nous avons voulu comparer les deux types de réponse autophagique induites soit par une carence nutritive soit par une carence en oxygène. Nos études ont également porté sur le rôle du principal facteur impliqué dans la régulation de la réponse à l'hypoxie : le facteur de transcription HIF-1 α et ses cibles dans l'autophagie de survie des cellules cancéreuses HCT116.

MATERIELS ET METHODES

MATERIELS ET METHODES

I. Culture cellulaire

1.1. Entretien

Les lignées de cellules cancéreuses colo-rectales humaines HCT116 déficientes pour Bax, p53, p21 nous ont été généreusement données par le Dr. B. Volgestein (Baltimore, USA). La lignée d'astrocytome humain U87-MG provient de l'ATCC (*American Type Culture Collection*). Les cellules cancéreuses prostatiques DU145 nous ont été généreusement données par P.T Daniel (Berlin, Allemagne). Les cellules d'encapsidation dérivées des cellules de foie embryonnaire humain HEK293FT (*Human Embryonic Kidney*) nous ont été données par le Dr. R. Breathnach (INSERM U601, Nantes).

Toutes ces lignées sont cultivées dans leur milieu de culture respectif complémenté avec de la L-glutamine à 2 mM, de la pénicilline à 100 U/mL, de la streptomycine à 100 µg/mL et 10 % de sérum de veau fœtal (SVF). Les HCT116 sont cultivées dans du Mc Coy's 5A; les U87-MG, les DU145 et les HEK293FT dans du DMEM (*Dubelco's Modified Eagle's Medium*) contenant respectivement du glucose à 1 g/L ou à 4,5 g/L. Pour les cellules HEK293FT, 0,5 g/L de néomycine (G418) est également ajouté. Toutes les lignées sont incubées sous atmosphère humide contenant 5 % de CO₂ et à 37°C.

1.2. Transfection transitoire

Les cellules HCT116 Bax^{-/-} sont cotransfectées en utilisant la lipofectamine 2000 (Invitrogen) avec 0,3 µg de plasmide dsRed et 3 µg de plasmide pcDNA3 codant pour BNIP3 ou BNIP3 délété de son domaine transmembranaire (BNIP3 Δ TM) selon le protocole du fournisseur. 6h

après lipofection, les cellules sont rincées deux fois avec du milieu complet. 24h après lipofection, les cellules sont récupérées afin d'être utilisées.

1.3. Production et utilisation de particules lentivirales

1.3.1. Construction de shARNs

Un vecteur de clonage pSIH1-H1-copGFP (System Biosciences) a été utilisé pour introduire des shARNs dans les cellules HCT116. Les shARNs sont clonés sous le contrôle du promoteur H1 entre les sites de restriction BamH1 et EcoR1 selon le protocole du fournisseur. En outre, ce vecteur code également pour une protéine fluorescente GFP (*Green Fluorescent protein*) sous le contrôle du promoteur fort du CMV (CytoMégaloVirus). Brièvement, les amorces correspondant aux futurs shARNs doivent être synthétisées. Elles sont ensuite hybridées et phosphorylées par une T4 polynucléotide kinase (Biolabs). La ligation entre les amorces et le vecteur ouvert s'effectue sur la nuit à 16°C avec une ADN ligase (Biolabs). Des bactéries XLI blue sont ensuite transformées par la méthode du TSS (*Transformation and storage method*) avec 1 µL de la solution de ligation. Les clones obtenus sont validés par PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en utilisant deux amorces pouvant s'hybrider sur le vecteur. La taille du fragment PCR obtenu permet d'identifier les clones possédant le shRNA inséré dans le vecteur (taille du fragment PCR quand le vecteur est vide : 120 paires de bases (pb), sinon 170 à 190 pb selon la taille du shARN). Après validation par séquençage, des bactéries XL10, plus compétentes que le XL1 blue pour une forte production de plasmide, sont alors transformées par TSS et le plasmide est isolé par midiprep (Qiagen) selon le protocole du fournisseur.

1.3.2. Production des particules lentivirales

Les cellules HEK293FT sont transfectées par la méthode du phosphate de calcium. L'information génétique permettant la formation de particules est codée sur trois plasmides différents : pLP1, pLP2, pLP-VSVG. pLP1 et pLP2 portent les gènes codant pour des protéines de structures (gag), des protéines régulatrices (vif, gfp4, rev, nef) et une protéine permettant la réplication (pol), protéines nécessaires à la synthèse du virus. Le gène viral *env* qui code pour une protéine de l'enveloppe définissant la cible du virus est remplacé dans le plasmide pLP-VSVG par une glycoprotéine de l'enveloppe du virus de la stomatite vésiculeuse (VSVG). Cette protéine permet l'entrée du virus par fusion avec la membrane plasmique.

3 µg de chaque plasmide d'encapsulation (pLP1, pLP2, pLP-VSVG) ainsi que 3 µg du plasmide contenant le shARN d'intérêt sont repris dans 450 µL d'eau stérile. 50 µL de CaCl₂ à 2,5 mol/L sont alors ajoutés et ce mélange est vortexé. Sous constante agitation sur le vortex, 500 µL d'une solution d'Hepes (HBS2X : Hepes 50 mM pH=7,05, NaCl 280 mM et Na₂HPO₄ 1,5 mM) sont ajoutés goutte à goutte et une vingtaine d'allers et retours en bullant avec une pipette de 1 mL sont réalisés afin de favoriser la formation de cristaux de phosphate de calcium contenant nos plasmides. Le mélange obtenu est laissé 30 min. à température ambiante. Il est ensuite bien remis en suspension afin de casser les gros cristaux formés qui sont moins efficaces pour la transfection. Le mélange est alors déposé au goutte à goutte sur les cellules qui ont étéensemencées la veille à 3 millions par boîte de Pétri 100 mm. Pour chaque production, trois boîtes sont prévues par shARN.

48 h plus tard, le surnageant est récolté, centrifugé si de gros débris cellulaires sont présents, filtré (filtre de 0,45 µm) et déposé délicatement sur coussin de saccharose 20 %. Les surnageants sont alors ultracentrifugés sous vide (25000 rpm, 1h30, 4°C). Le surnageant est

ensuite vidé et le culot est repris dans 60 μL de PBS-1X stérile froid (*Phosphate Buffer Saline*). Les tubes sont agités dans la glace pendant 2 h au minimum pour permettre la remise en suspension des particules virales. Les 60 μL de particules lentivirales sont ensuite récupérées, aliquotées et conservées à -80°C .

1.3.3. Titration des particules virales

La titration par cytométrie de flux est possible car le plasmide codant pour le shARN possède également la séquence de la protéine GFP (*Green Fluorescent Protein*) sous le contrôle du promoteur du CMV (cytomégalovirus). Les cellules exprimant la GFP sont donc considérées comme exprimant également le shARN.

1 ; 5 et 10 μL d'une dilution au $1/10^{\text{ème}}$ de particules virales (PI) sont ajoutés dans une plaque 24 puits contenant des HEK293FT dont le nombre exact par puits a été déterminé (nombre de HEK293FT J. inf). 72 h post-infection, les cellules sont récupérées et le nombre de cellules exprimant la GFP (*Green Fluorescent Protein*) est déterminé par cytométrie de flux. Ce pourcentage de cellules vertes permet de déterminer alors le titre viral initial car il est admis que la MOI (*Multiplicity Of Infection*) des HEK293FT est égale à 1. La MOI est le nombre de particules virales nécessaires à l'infection d'une cellule. Une MOI de 1 signifie qu'une PI entre dans une cellule.

$$\text{Titre viral} = \% \text{ de cellules GFP positives} \times \text{dilution des PI} \times \text{nombre de HEK293FT J.inf}$$

1.3.4. Infection des HCT116

Les HCT116 ont été infectées sans adjuvant à une MOI comprise entre 2 et 4.

1.3.5. Séquences de shARNs utilisés

Les différents shARNs réalisés sont regroupés dans le *tableau 3*. Les shARNs dirigés contre Mcl-1 n'ont pas été utilisés pour ce travail mais au sein de mon équipe. Les sous-expressions ont été validées par Q-PCR ou par immuno-empreinte.

GENE	Nom shARN	Séquence cible (5'-3')
Beclin-1/atg6	sh1	CTAAGGAGCTGCCGTTATA
	sh2	CATGCTCTGGCCAATAAGA
	sh3	CAGTTTGGCACAATCAATA
Bax	shUTR	GTAACCTCCTTCGGGACAC
	sh392	GCTGATCAGAACCATCATGG
BNIP3	shUTR	CCACGTCACCTTGTGTTTAT
	sh1	CCTCGGTTTCTATTTATAA
	sh2	CTTCTGAAACAGATACCCA
HIF-1α	sh1	CGCTGGAGACACAATCATA
	sh2	CAGTTATGATTGTGAAGTT
	sh3	TGATGAAAGAATTACCGAA
	sh4	GGCGAAGTAAAGAATCTGA
	sh5	GACACAGCCTCGATATGAA
MCL1	shINV	CCGGCAGTCGCTGGAGATTATCTCT
	shAMBION	GGACTTTTATACCTGTTAT
VEGF	shUTR	GGATGTATTTGACTGCTGT
	shS1	GGGCAGAATCATCACGAAG
	shS5	GCGGATCAAACCTCACCAA
CONTROLE	shLuciferase	GTGCGTTGTTAGTACTAATCCTATTT

Tableau 3 : Liste des gènes et des séquences ciblées par les shARNs utilisés. En gras, apparaissent les shARNs permettant une bonne extinction de la cible dans les HCT116 Bax-/-.

1.4. Stress nutritif et hypoxique

1.4.1. Induction

L'autophagie est induite par un milieu carencé en acides aminés et en sérum. Les cellules sont rincées deux fois avec du PBS-1X stérile et incubées dans du milieu EBSS tamponné (*Earle's Balanced Salt Solution*) ajusté pour contenir 0,1 % de BSA (*Bovine Serum Albumin*), 0,1 g/L de MgCl₂, 0,185 g/L de CaCl₂ et 97 mg/L de MgSO₄.

L'autophagie peut également être provoquée par l'ajout d'un inhibiteur pharmacologique de mTOR, la rapamycine à 400 nM dans du milieu complet.

L'hypoxie sévère est créée en plaçant les cellules dans une poche étanche contenant un système capable de piéger l'oxygène et de produire ainsi un milieu contenant environ 0,1% d'oxygène (Anaerocult P, Merck ou BD Gas Pak EZ Gas generating pouch system, BD ; (Dang *et al.*, 2006). L'hypoxie est validée par un indicateur coloré.

Différents inhibiteurs pharmacologiques ont été utilisés afin d'empêcher ou de limiter le déroulement de l'autophagie :

- Bafilomycine A1 (BafA1) : inhibiteur des pompes protoniques des lysosomes à 50 µM final ;
- LY294002 : Inhibiteur de la voie des PI3-Kinases/Akt à 20 µM final ;
- 3-méthyl-adénine (3-MA) : Inhibiteur des PI3-Kinases à 10 mM final ;
- PD98059 : Inhibiteur des MAPK à 50 µM final ;
- Wortmannine : Inhibiteur des PI3-Kinases à 1 µM final.

1.4.2. Mesure de la prolifération et de la viabilité cellulaire

➤ Mesure de la prolifération cellulaire

Les cellules sontensemencées à 10^5 cellules par puits en plaque 6 puits. Tous les jours jusqu'à quasi-confluence, les cellules sont décollées et comptées dans une cellule de Malassez en utilisant un colorant vital, le bleu trypan à 0,25 %, au dixième. Les cellules vivantes ne sont pas perméables et donc ce colorant est exclus.

➤ Etude morphologique de la mort cellulaire par vidéomicroscopie

L'étude morphologique de l'effet de la carence nutritive sur les cellules peut se réaliser par vidéomicroscopie (« Time-Lapse ») en utilisant un microscope inversé Zeiss Axiovert 200-M selon le protocole du fournisseur. Les plaques 6 ou 24 puits (Falcon) sont placées dans un incubateur XL-3 qui maintient une température de 37°C et une pression en CO₂ de 5 %. Des photos sont prises toutes les 10 min. pendant 48 à 72 h grâce à la caméra AxioCam MRm digital et au logiciel AxioVision. Des films sont ensuite réalisés en mettant les photos à la suite les unes des autres et ces films peuvent alors être analysés.

➤ Mesure de la viabilité cellulaire par mesure de la perméabilité membranaire à l'iodure de propidium

Les cellules sontensemencées en plaque 24 puits. A 70-80 % de confluence, les cellules sont soumises aux différents traitements. A la fin du traitement, les cellules sont récupérées et rincées deux fois avec du PBS-1X. Le culot cellulaire est ensuite repris dans du PBS-1X contenant de l'iodure de propidium (IP) à 5 µg/mL final (BD Pharmingen). Après

une incubation à température ambiante de 10 min, les cellules sont analysées à l'aide d'un cytomètre de flux (BD FacsCalibur). Les cellules qui sont marquées par le IP fluorescent dans le rouge (FL2 ou FL3) sont des cellules qui ont perdu leur intégrité membranaire.

1.4.3. Mesure de la capacité autophagique

L'autophagie est un processus permettant la dégradation des protéines à longue durée de vie et est caractérisée par la présence de vacuoles autophagiques. Ce sont ces caractéristiques qui ont été retenues pour obtenir des moyens d'analyse permettant d'évaluer son niveau dans la cellule.

➤ *Visualisation des vacuoles autophagiques par microscopie électronique à transmission*

Les cellules ont étéensemencées dans des plaques 6 puits. A la confluence voulue, les cellules ont été placées en conditions de carence nutritive ou de carence en oxygène. Après lavage au PBS-1X stérile, les cellules ont été fixées 30 min. à 4°C avec du PBS-1X-glutaraldéhyde 4 %, pH=7,4. Après rinçage au PBS-1X, les cellules sont post-fixées avec du PBS-1X-acide osmique 2 % pendant 1h à température ambiante puis rincées au PBS-1X. Après déshydratation des cellules par une série de bains successifs de concentration croissante en éthanol, une résine composée d'un mélange d'épon et d'éthanol est déposée sur les cellules et laissée 24 h à température ambiante. Le surplus de résine est enlevé le lendemain et des gélules remplies de résine sont déposées sur les boîtes. Les boîtes sont ensuite placées dans une étuve à 37°C pendant 24 h puis à 50°C pendant 48 h. Les gélules sont alors décollées, la surface en contact avec la boîte permet, lors de leur retrait, de récolter une monocouche de

cellules fixées. Des coupes ultra-fines (20 nm d'épaisseur) sont réalisées à l'aide d'un couteau diamant sur le Reichert Ultracut E microtome. Elles sont ensuite contrastées avec de l'acétate d'uranyle et du citrate de plomb avant de pouvoir être observées sur un microscope électronique à transmission JEM-1010 à 80 kV (JEOL, Tokyo, Japan). Les images de cellules soumises à une carence nutritive sont analysées *via* le logiciel Leica Q-WIN.

➤ Marquage des vacuoles autophagiques par le MDH

Les vacuoles autophagiques sont marquées par le monodansylpentane (MDH) comme décrit par Priault *et al.* Brièvement, les cellules sontensemencées dans des plaques 24 puits contenant des lamelles préalablement saturées en PBS-1X-gélatine 0,1 % stérile. Quand les cellules ont atteint 50-70 % de confluence, elles sont incubées en milieu carencé ou en condition hypoxique pendant 6 h. Les cellules sont ensuite rincées 2 fois avec du PBS-1X stérile et incubées pendant 30 min à l'obscurité avec 200 μ M de MDH. Après cette incubation, les cellules sont rincées avec du PBS-1X et les lamelles sont montées sur un agent polymérisant (Mowiol). Les lamelles sont observées sous UV ($\lambda_{exc}= 359$ nm) avec un microscope Leica DMLB. Des photos sont prises grâce à la caméra DC300-F. Le marquage par le MDH est évalué en comptant au minimum 100 cellules pour chaque expérience et trois expériences indépendantes ont été réalisées.

➤ Mesure de la dégradation des protéines à longue durée de vie par protéolyse

La dégradation de la L-valine radioactive ^{14}C contenue dans les protéines à longue durée de vie est mesurée comme décrit par Priault *et al.* Brièvement, les cellules à 80 % de

confluence en plaque 6 puits sont incubées en milieu complet contenant 0,1 μCi de L-Valine ^{14}C . Après 3 rinçages, la radioactivité contenue dans les protéines à courte durée de vie est éliminée par une incubation d'1 h en milieu complet contenant un excès de L-Valine froide (10 mM). Après 3 rinçages, les cellules sont alors incubées pendant 9 h en milieu complet ou en milieu carencé en présence d'un excès de L-Valine froide. Les surnageants sont collectés et les acides aminés libres sont précipités avec du TCA 80 % (Acide TriChloro-Acétique). Les protéines contenues dans les cellules adhérentes sont précipitées avec du TCA 10 %. La radioactivité est comptée dans un analyseur de liquide de scintillation Tri-carb 2100TR (Packard). La protéolyse est le pourcentage de radioactivité contenu dans le surnageant par rapport à la radioactivité totale.

1.5. Immuno-cytochimie

Les cellules sont mises en culture sur lamelles préalablement saturées 30 min. à 37°C avec du PBS-1X-Gélatine 0,1 %. Une fois la semi-confluence atteinte, les cellules sont traitées pendant 16 h soit en EBSS soit dans des conditions d'hypoxie sévère. Les cellules sont ensuite rincées 3 fois au PBS-1X. Toutes les étapes se réalisent à température ambiante. La fixation est réalisée au paraformaldéhyde (PBS-1X; 4 % Paraformaldéhyde; 0,19 % acide picrique) sous hotte pendant 30 min. Après 3 lavages au PBS-1X, les cellules sont perméabilisées par incubation de 10 min avec du PBS-1X - 0,1 % SDS. Après 3 lavages au PBS-1X, la saturation est réalisée avec du PBS-1X - 5 % gélatine (15 min au minimum), suivie d'un lavage au PBS-1X. Les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire dilué dans du PBS-1X - 1 % gélatine pendant 1h (cf. *tableau 4*). Après 3 lavages au PBS-1X, la lamelle est incubée avec l'anticorps secondaire couplé à un fluorochrome (Alexa Fluor, Invitrogen) pendant 1h.

Anticorps	Isotype	Fournisseur	Dilution
HIF-1 α	Lapin polyclonal IgG	A&G Pharmaceutical	1/600
Alexa Fluor	Anticorps secondaire couplé à un flurochrome vert (488 nm) ou rouge (568 nm)	Invitrogen	1/400

Tableau 4 : Liste des anticorps utilisés en immuno-cytologie

Les anticorps secondaires couplés à un fluorochrome doivent être utilisés à l'abri de la lumière ce qui implique que toutes les étapes suivantes se font à l'abri de la lumière. Après 3 autres lavages, les lamelles sont montées sur lame dans un agent polymérisant Mowiol et lutées avec du vernis à ongles. Les lames sont conservées à 4°C pour une observation au microscope confocal (LEICA TCS-SP1).

II. Biologie moléculaire

2.1. Extraction d'ARN

L'ARN total a été extrait à partir d'1 à 2 millions de cellules avec le kit RNeasy mini kit (Qiagen) selon le protocole du fournisseur (en réalisant le traitement à la DNase pour éviter les possibles contaminations avec de l'ADN génomique). La qualité des ARNs totaux est déterminée par la mesure du ratio 28S/18S avec le bioanalyseur Agilent 2100 en utilisant un kit RNA6000 Nano assay (Agilent Biotechnologies). La concentration de l'échantillon est mesurée par le nanodrop (Thermo Fisher Scientific). Un μg d'ARNtotal est rétro-transcrit par la superscript transcriptase (Superscript II, Invitrogen) selon le protocole du fournisseur.

2.2. Puces à ADN

2.2.1 Réalisation des puces à ADN

Les puces à ADN utilisées sont des cancéropuces, c'est-à-dire des puces dédiées à l'analyse transcriptionnelle d'environ 7 000 gènes impliqués dans différents cancers, dans l'angiogénèse tumorale, ... Environ 21 000 oligonucléotides d'une longueur de 50 mer ont été hybridés par puce.

La préparation des cibles se fait à partir du kit Cyscribe cDNA post labelling (Amersham). Cette technique est basée sur le principe d'hybridation non compétitive entre un échantillon test qui sera marqué par la Cyanine 3 et un échantillon référence qui sera marqué par la Cyanine 5. Le marquage est réalisé de façon indirecte, avec tout d'abord la synthèse d'ADNc en présence de dUTP portant un groupement amino-allyle, sur lequel seront fixés ultérieurement des esters liés au fluorochrome.

Pour préparer les lames à l'hybridation des échantillons, les lames subissent des lavages qui sont nécessaires pour réactiver les liaisons hydrogènes des oligonucléotides fixés sur les lames de verre. Tous les échantillons d'ADNc marqués sont repris dans un mix d'hybridation. Les échantillons test (Cy3) sont ensuite mélangés avec les échantillons de référence (Cy5) et sont déposés sur la zone spottée de chacune des deux lames répliqués. Les lames sont placées dans une chambre d'hybridation (Telechem) pendant une nuit à 42°C. Les lames sont ensuite lavées dans des bains de concentrations décroissantes en SSC (2 X à 0,2 X) avant d'être centrifugées pour les sécher.

La révélation du signal d'hybridation est effectuée par un scanner confocal de type ScanArray3000 (Perkin Elmer). Les lames sont scannées à une résolution de 10 µm à une longueur d'onde de 532 nm (Cy3) et de 635 nm (Cy5). Les images obtenues sont analysées

grâce au logiciel GenePix[®]Pro 5.1 (Axon Instruments) afin d'extraire les données numériques correspondant à chaque spot.

2.2.2. Techniques d'analyse des puces

Le logiciel Genepix[®]Pro permet de repérer visuellement les spots non exploitables (zones de la lame couverte de bruit de fond, spot absent ...) par un système de balisage (dépôts de drapeaux) qui assigne un code numérique selon la qualité du spot considéré. Ceci afin de faciliter le filtrage des données non significatives. Les spots dont la somme des intensités médianes, rouge et verte est inférieure à 300, et les signaux dont le rapport signal/bruit de fond est inférieur à 1,5 sont éliminés de la suite de l'analyse.

Le niveau d'expression relatif de chaque gène est ensuite estimé par le ratio d'expression calculé à partir des intensités en rouge et en vert des spots :

$$R_{r/v} = \frac{\text{Intensité médiane du spot } i \text{ en rouge} - \text{médiane du bruit de fond local en rouge}}{\text{Intensité médiane du spot } i \text{ en vert} - \text{médiane du bruit de fond local en vert}}$$

Pour manipuler et analyser les données, les ratios d'expression sont usuellement transformés dans une échelle logarithmique : $\log_2 (R_{r/v})$. Le logarithme permet de transformer le ratio d'expression en une fonction linéaire, symétrique de $-\infty$ à $+\infty$, centrée sur 0 et additive, ce qui facilite les analyses statistiques.

Le calcul du différentiel d'expression est l'approche la plus simple et la plus intuitive pour trouver les gènes qui sont différemment exprimés entre la référence et la condition test. Pour cette étude, le logiciel utilisé est SAM « Significance Analysis of Microarray ». Il permet une analyse par ré-échantillonnage et estime le taux de faux positifs. Par un test

statistique, SAM permet de mettre en évidence les gènes avec un différentiel d'expression significatif dans un ensemble de puces à ADN. La comparaison utilisée est le test sous forme « two class paired » qui est une comparaison de deux groupes possédant plusieurs points expérimentaux pour chaque groupe.

Il existe une méthode de regroupement hiérarchique (« pair-wise hierarchical clustering ») avec le logiciel Cluster qui a également été utilisé pour l'analyse des puces à ADN. Les gènes sont comparés deux à deux en fonction du degré de similitude entre leurs profils d'expression. Les gènes montrant la plus faible distance entre leurs profils sont groupés sous un « nœud » (« node »). Le nœud est ensuite lui-même comparé à un autre gène ou un autre nœud. Ainsi, les gènes sont ordonnés de manière hiérarchique dans un dendrogramme qui peut être visualisé avec le logiciel Treeview. Treeview permet d'afficher les profils des gènes sous forme d'une carte d'expression colorée.

Cet outil d'analyse permet une meilleure visualisation des résultats et met en évidence des groupes de gènes ayant une expression commune et donc un sens biologique commun potentiel.

2.3. PCR quantitative en temps réel

La plupart des amorces ont été dessinées avec l'aide du logiciel Amplifx afin de mesurer le niveau d'expression de différents ARNm (cf. *tableau 5*).

La Q-PCR est réalisée avec le kit Brilliant sybr green QPCR core reagent kit (Stratagene) et le thermocycler du MX4000 multiplex Quantitative PCR system (Stratagene). Le mix suivant est réalisé pour les réactions de Q-PCR par puits : ADNc 20 ng, Core PCR Buffer 1X, 3 mM MgCl₂, 0,8 mM dNTPs, 4 à 5 % de DMSO (diméthylsulfoxyde), 0,2 µM d'amorces sens et antisens, 0,334X de Sybr Green, 75 mM de Rox (reference dye), 1,25 U

d'enzyme Sure start Taq DNA Polymerase). Le cycle utilisé est le suivant : une étape d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 5 min, suivie par 40 cycles avec une étape de dénaturation à 95°C pendant 30 s, une étape d'hybridation au T_m (*Melting Temperature*) pendant 60 s, une étape d'élongation à 72°C pendant 30 s.

La fluorescence spécifique de l'amplicon est mesurée par une étape de dénaturation commençant au T_m et montant 0,5 degré par 0,5 degré jusqu'à 95°C. La quantification relative de chaque ADNc est effectuée grâce aux ARNm des gènes de ménage *rplpo* et *β₂-microglobuline* par la méthode de $\Delta\Delta C_t$.

Cibles	Sens (5'→3')	Antisens (5'→3')	T_m °C
<i>Atg8</i>	TAGAAGGCGCTTACAGCTCA	TGGGAGGCATAGACCATGTA	60
<i>β₂μglo-buline</i>	TTCACCCCCACTGAAAAAGATGA	GGCATCTTCAAACCTCCATGATG	68
<i>Bnip3</i>	CTGCAGGGCTCCTGGGTAG	TAGAAACCGAGGCTGGAACG	55
<i>Enolase</i>	TGGTTGACTTTGAGCAGGAG	ATCTCACAGTGACCAACCCA	60
<i>Egfr</i>	GATCATGGTCAAGTGCTGGATGA	AAGTTGGAGTCTGTAGGACTTGG CA	55
<i>Glut-1</i>	GATTGGCTCCTTCTCTGTGG	TCAAAGGACTTGCCAGTTT	63
<i>Hif-1α</i>	GATGACCAGCAACTTGAGGA	TGCAGGGTCAGCACTACTTC	60
<i>Mcl-1</i>	GCATCGAACCATTAGCAGAA	TGCCACCTTCTAGGTCCTCT	60
<i>Noxa</i>	TCCTGAGCAGAAGAGTTTGG	GCTGGAAGTCGAGTGTGCTA	63
<i>P21</i>	CCTAAGAGTGCTGGGCATTT	GAGGAGGAAGTAGCTGGCAT	60
<i>Rplpo</i>	GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT	GATGACAGCCCAAAGGAGA	68
<i>Vegf</i>	GGAGGGCAGAATCATCACGAAG	CACACAGGATGGCTTGAAGATG	60

Tableau 5 : Amorces et températures utilisées pour la Q-PCR

2.4. Constructions BNIP3/BNIP3 Δ TM

BNIP3 et BNIP3 Δ TM ont été clonés par PCR à partir d'ADNc humain en utilisant les amorces suivantes : BNIP3 , 5'-ATGTCGCAGAACGGAGCGCCC-3' (1) et 5'-AAAGGTGCTGGTGGAGGTTGTC-3' ; BNIP3 Δ TM (1) et 5'-TTTCAGAAATTCTGCAGAGAATATGCC-3'. Le fragment PCR obtenu a été purifié sur gel à l'aide du kit Qiaquick Gel extraction kit (Qiagen) et ligé dans le vecteur Topo pcDNA3-TA selon le protocole des fournisseurs. Les clones ont été criblés par PCR et envoyés à séquencer. Les protéines BNIP3 et BNIP3 Δ TM possèdent également une séquence de six histidines et un épitope V5 ce qui a permis de valider leur sur-expression par immuno-empreinte.

III. Immuno-empreinte (Western Blot)

Après centrifugation à 1 000 g pendant 5 min à froid, les cellules sont lavées deux fois dans du PBS-1X froid et centrifugées à nouveau dans les mêmes conditions. Le culot sec est soit conservé à -20°C, soit repris dans du tampon de lyse contenant 1 % de NP40, 0,5 % de sodium-deoxycholate, 0,1 % de SDS ainsi qu'un inhibiteur de protéases EDTA Free (cocktail inhibiteurs Roche 11873580001); pH=7,4). Après 30 à 45 min de lyse sur glace et centrifugation à 16 000 g pendant 30 min à froid, le surnageant contenant les protéines est récupéré. Les protéines sont alors dosées par la méthode colorimétrique de Bradford (Bio-rad).

Les lysats protéiques (50-100 μ g) sont dénaturés à 95°C pendant 5 min avec du tampon de charge (20 % saccharose, 2,4 % SDS, 5 % bleu de bromophénol, 5 % β -mercaptoéthanol). Les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire par

électrophorèse sur un gel SDS-PAGE concentré entre 6 et 18 % en polyacrylamide selon la taille de la protéine à analyser. Après un transfert semi-liquide (10 V, 30 à 70 min selon la taille de la protéine), la membrane PVDF (Millipore) est incubée pendant 1 h dans du PBS-1X - Lait 5 %. Après incubation sur la nuit à 4°C avec l'anticorps primaire, 3 lavages de 10 min au PBS-1X - Lait 1 % - Tween20 0,05 % sont réalisés avant l'incubation de 1 h à 37°C avec l'anticorps secondaire couplé à la HRP (*Horseradish Peroxydase*, Biorad)(cf. *tableau 6*). La révélation s'effectue avec le kit Immobilon western (Millipore) ou le kit BM Chemoluminescence (Roche) et les films autoradiographiques CL-XPosure Film (Pierce) et Hyperfilm ECL (Amersham) selon le protocole du fournisseur.

L'homogénéité des dépôts est contrôlée en mesurant le niveau d'expression d'une protéine de ménage : l'actine. La quantification est réalisée grâce au logiciel ImageJ.

Protéines ciblées	Type	Dilution	Fournisseur
Actine	Souris monoclonal IgG1	1/10000	Chemicon
Atg8/LC3	Lapin polyclonal IgG	1/1000	MBL
HIF-1 α	Lapin polyclonal IgG	1/200	Santa Cruz
4EBP1	Lapin polyclonal IgG	1/1000	Cell Signaling
V5	Souris monoclonal IgG	1/2000	Millipore

Tableau 6 : Liste des anticorps utilisés avec leur isotype, leur dilution et leur fournisseur.

RESULTATS

RESULTATS

I. Régulation de l'autophagie de survie par les membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2

1.1. La carence nutritive induit une réponse de type autophagique dans les cellules HCT116 Bax^{-/-}

1.1.1. Effet de la carence nutritive sur la viabilité cellulaire

L'aspect morphologique de la réponse des cellules cancéreuses colo-rectales HCT116 déficientes en Bax soumises à une carence nutritive a été analysé par vidéo-microscopie, en comparaison avec une lignée cancéreuse ovarienne (cellules HeLa) (cf. *Figure 20*). Les cellules HeLa se décollent et entrent en apoptose assez rapidement (environ 8 h), caractérisée par la présence de « blebbing ». Lors d'une carence nutritive de 48 h, environ 80 % des cellules meurent par apoptose et moins de 20 % présentent une mort de type osmotique.

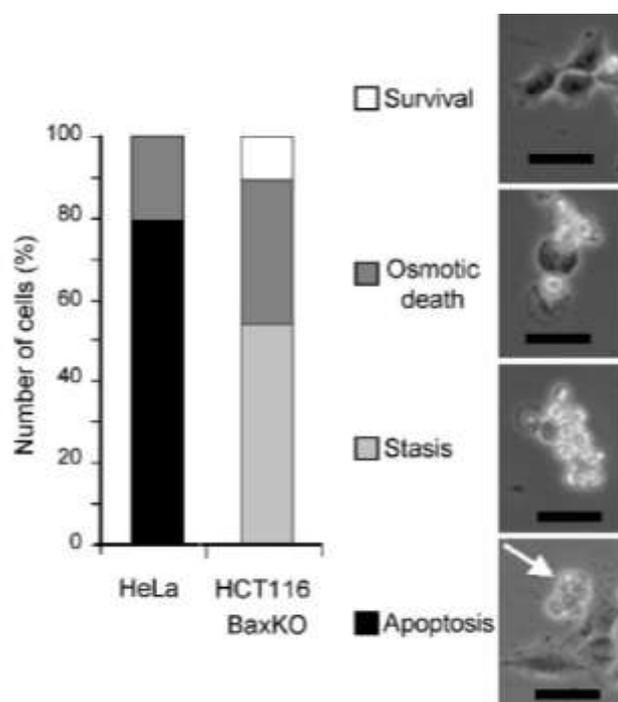


Figure 20: Comparaison de l'effet d'une carence nutritive de 48 h sur la survie des cellules HCT116 Bax^{-/-} et des HeLa par vidéo-microscopie (Priault *et al.*, Figure 2A).

Les cellules HCT116 Bax^{-/-} se décollent également, entrent dans une phase de stase assez longue et finissent par éclater en un unique bleb (mort osmotique). Environ 10 % des cellules restent adhérentes jusqu'à la fin du traitement. En conclusion, la carence nutritive n'induit pas de mort apoptotique dans les cellules HCT116 Bax^{-/-} : 50 % des cellules entrent en stase prolongée et 40 % des cellules meurent par mort osmotique.

Afin de confirmer l'absence d'apoptose dans les cellules HCT116 Bax^{-/-}, différentes expériences ont été réalisées. En effet, j'ai mesuré l'activité des caspases : dans la lignée HCT116 Bax^{-/-}, aucune activité des caspases n'a pu être mise en évidence en comparaison avec la lignée des cellules cancéreuses HeLa en réponse à différents stress apoptotiques (UV, étoposide) ou à une carence nutritive (EBSS) (cf. *Figure 21*). Par ailleurs, par immunopempreinte, nous n'avons pas pu mettre en évidence de clivage de la caspase 3 lors d'un traitement à la staurosporine dans les HCT116 Bax^{-/-}, contrairement aux cellules HeLa et aux HCT116 Bax^{+/+} (cf. Priaul *et al.*, *Figure 2B*).

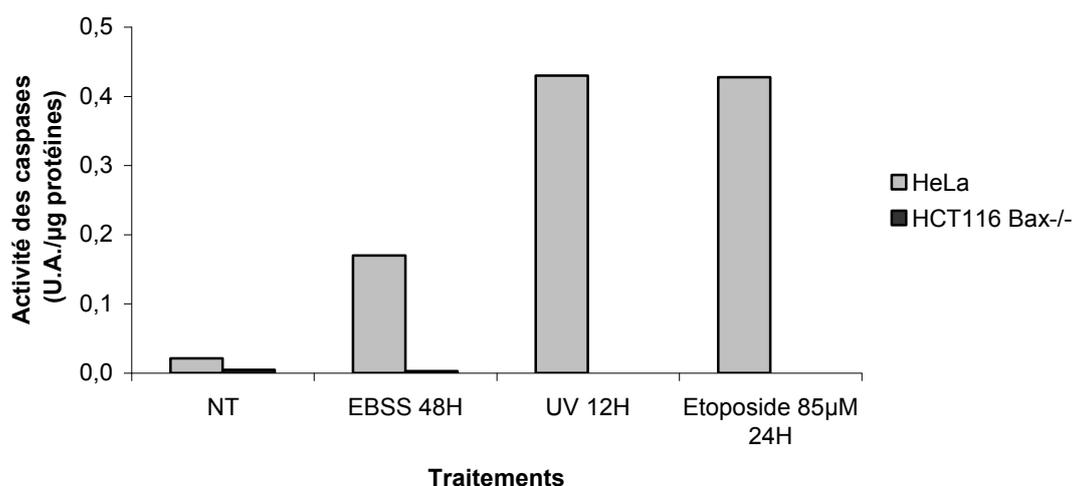


Figure 21 : Mesure de l'activité des caspases de deux lignées cancéreuses en réponse à différents traitements.

En outre, la coloration de l'ADN par du Hoechst 33258 ne m'a également pas permis de visualiser une condensation ou une fragmentation de la chromatine dans les cellules HCT116 Bax^{-/-} en comparaison avec les cellules HeLa, signes caractéristiques des phases précoces de l'apoptose (données non montrées). L'ensemble de ces données nous permet de conclure que la carence nutritive induit une réponse de type non apoptotique dans les cellules cancéreuses HCT116 Bax^{-/-}.

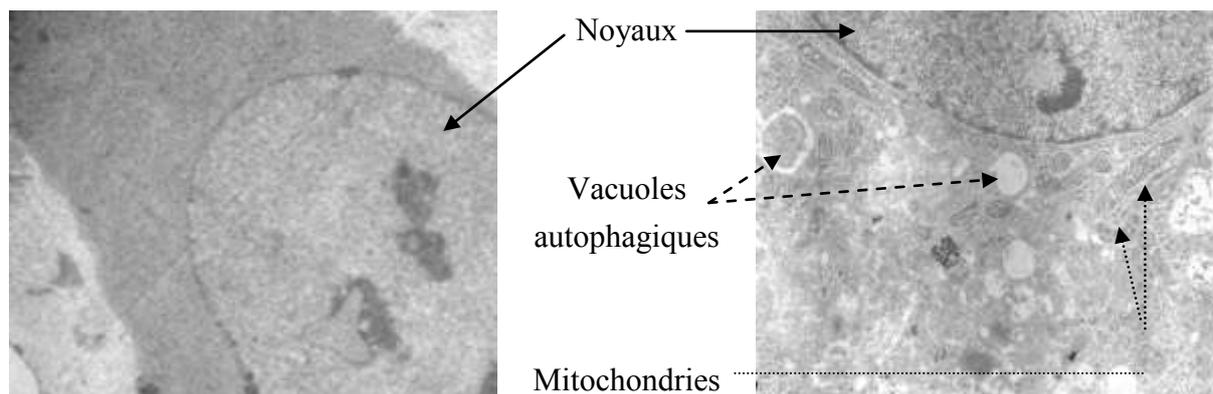
1.1.2. La carence nutritive induit une réponse de type autophagique

La carence nutritive est connue pour activer une réponse autophagique dans les cellules soumises à ce stress. Afin de confirmer que les cellules HCT116 Bax^{-/-} présentent bien ce type de réponse, différentes techniques connues pour mettre en évidence l'autophagie ont été réalisées.

La dégradation des protéines à longue durée de vie (protéolyse) a été mesurée par pulse chase (cf. Priault *et al.*, Figure 1A). Lors d'une carence nutritive, le taux de protéolyse double dans ces cellules et la protéolyse peut être inhibée par des inhibiteurs pharmacologiques de l'autophagie (3-Méthyl-Adénine et Bafilomycine A1).

Une immuno-empreinte dirigée contre LC3/ATG8 montre également l'accumulation de la forme clivée LC3-II dans les cellules HCT116 Bax^{-/-} ce qui est également caractéristique d'une induction autophagique (cf. Priault *et al.*, Figures 1B et C).

Enfin, une analyse de microscopie électronique des cellules HCT116 Bax^{-/-} soumises à une carence nutritive révèle la présence de nombreuses vacuoles autophagiques dans le cytoplasme et confirme que la chromatine n'est pas condensée (cf. *Figure 22*).



Milieu Complet (MC)

EBSS

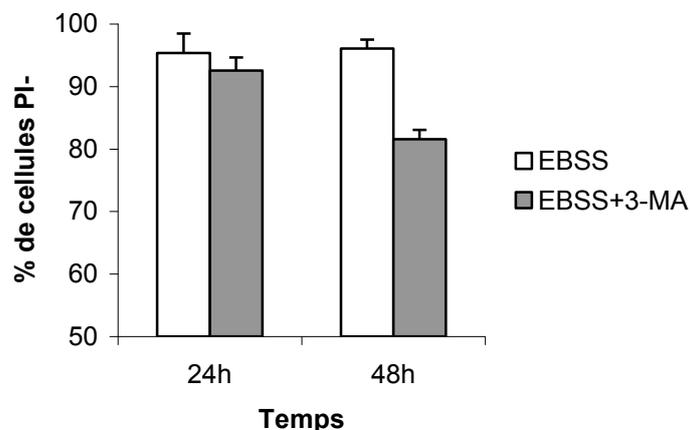
Figure 22 : Présence de vacuoles autophagiques dans les HCT116 Bax^{-/-} soumises à une carence nutritive par rapport au milieu complet.

Tous ces éléments permettent de conclure que la carence nutritive induit une réponse de type autophagique dans les cellules cancéreuses colo-rectales HCT116 déficientes en Bax.

1.2. La carence nutritive induit une autophagie de survie dans les HCT116 Bax^{-/-}

Afin de déterminer si la carence en sérum et en acides aminés déclenche l'autophagie comme processus de survie cellulaire ou comme processus de mort cellulaire, j'ai mesuré la survie cellulaire des HCT116 Bax^{-/-} par un marquage avec un colorant vital (iodure de propidium/ IP) et analysé les cellules par cytométrie de flux. Les cellules positives à l'IP (IP+) sont des cellules perméables vis-à-vis de ce colorant, coloration due à une désorganisation de la membrane plasmique. Les cellules ont été soumises à une carence nutritive et l'autophagie a été inhibée avec un inhibiteur pharmacologique des PI3-Kinases, la 3-méthyl-adénine (3-MA).

Lors d'une carence nutritive, les cellules HCT116 Bax^{-/-} sont peu perméables à l'iodure de propidium à 24 h et 48 h (moins de 10 % de cellules sont positives à l'IP). Lors de ce marquage, seules les cellules entières sont analysées, les débris cellulaires sont exclus ce qui tend à sous-estimer la mort cellulaire. Il est à noter qu'à 48 h, alors que 50 % des cellules HCT116 Bax^{-/-} sont en phase de stase (cf. *Figure 20*), plus des 4/5 de ces cellules conservent leur intégrité membranaire. Les cellules qui ont éclaté par mort osmotique ne sont pas ou très peu prises en compte par ce marquage. Quand l'autophagie est inhibée par la 3-MA, une augmentation de la mortalité (15 %) est observée à 48 h (cf. *Figure 23*) et s'amplifie à 72 h (données non montrées).



	% PI excluding cells		
	0h	24h	48h
Starv	100	95,4 ± 3,1	96,0 ± 1,4
Starv + 3-MA	100	92,5 ± 2,1	81,6 ± 1,5

Figure 23: L'autophagie induite par la carence nutritive chez les HCT116 Bax^{-/-} est un processus de survie cellulaire (Priault *et al.*, *Figure 2C*).

L'étude par vidéo-microscopie de cellules dans lesquelles l'autophagie est inhibée par ARN interférence dirigé contre *Atg7* montre une forte diminution du nombre de cellules en stase (inférieur à 5 %) corrélée à une forte augmentation des cellules mourant par mort osmotique (80 %). Cela permet de confirmer que les cellules en état de stase correspondent à des cellules vivantes qui font de l'autophagie et également que l'inhibition de l'autophagie induit une plus forte mortalité cellulaire (cf. Priault *et al.*, Figure 2A). Par ailleurs, la remise en culture dans du milieu complet des cellules décollées lors d'une carence nutritive de 24 h permet aux cellules de proliférer à nouveau (cf. Priault *et al.*, Figure 2D).

L'autophagie induite dans les HCT116 Bax^{-/-} soumises à une carence en sérum et en acides aminés est donc un processus de survie qui retarde leur mort cellulaire.

1.3. Régulation de l'autophagie de survie par Bcl-2 et Bcl-xL dans les HCT116 Bax^{-/-}

Le rôle de la famille de Bcl-2 dans la régulation de l'autophagie est encore largement débattu. C'est pourquoi nous nous sommes intéressés au rôle des protéines anti-apoptotiques dans la régulation de l'autophagie de survie observée dans les HCT116 Bax^{-/-} soumises à une carence nutritive.

Afin de déterminer l'effet de la sur-expression de protéines anti-apoptotiques sur la réponse des HCT116 Bax^{-/-} soumises à une carence nutritive, une étude morphologique par vidéo-microscopie a tout d'abord été effectuée dans des cellules sur-exprimant Bcl-2, Bcl-xL et Mcl-1 (cf. Priault *et al.*, Figure 3B). Contrairement aux cellules sur-exprimant Mcl-1 dans lesquelles le nombre de cellules adhérentes triple, une augmentation d'un facteur d'environ 1,5 des cellules en stase peut être observée dans les cellules sur-exprimant Bcl-2 et Bcl-xL.

Alors que la sur-expression de Mcl-1 ne semble avoir aucun effet sur la capacité autophagique des cellules, celle de Bcl-2 et de Bcl-xL augmente la protéolyse (respectivement d'un facteur 1,3 et 1,5) et augmente la fréquence d'autophagosomes de diamètre plus important (cf. Priault *et al.*, Figures 3C, 3D, 3E et 3F). Bcl-2 et Bcl-xL semblent donc réguler positivement la réponse autophagique des HCT116 soumises à une carence nutritive.

Afin de confirmer le rôle de Bcl-2 et Bcl-xL dans la régulation de l'autophagie, l'extinction de ces protéines est réalisée par ARN interférence. La sous-expression par shARN de Bcl-xL et de Bcl-2 diminue la capacité autophagique des HCT116 mais de manière plus marquée pour Bcl-xL (diminution d'1/5^e dans les cellules shBcl-2 et diminution des 4/5^e dans les cellules shBc-xL) ce qui suggère qu'ils auraient un rôle différent dans la régulation de l'autophagie (cf. Priault *et al.*, Figures 4C et ED).

Bcl-2 et Bcl-xL ont déjà été décrits comme régulant l'autophagie *via* leur interaction avec Beclin-1, cette piste a été étudiée dans les HCT116 Bax^{-/-} soumises à une carence nutritive. Par co-immuno-précipitation, l'interaction de Beclin-1 avec Bcl-2 a pu être confirmée ; en revanche, aucune interaction avec Bcl-xL n'a pu être mise en évidence dans les mêmes conditions (cf. Priault *et al.*, Figure 5A). Cette différence d'interaction pourrait être un élément de réponse concernant le rôle différentiel de Bcl-2 et Bcl-xL dans l'autophagie de survie de notre lignée.

Cette étude indiquerait qu'en plus de leur rôle anti-apoptotique, Bcl-2 et Bcl-xL possèderaient une fonction de survie plus large en régulant positivement l'autophagie de survie *via* des mécanismes non redondants.

Article 1 : Differential regulation of pro-survival autophagy by Bcl-2 and Bcl-xL

Muriel PRIAULT, Erika HUE, Fanny B. MARHUENDA, Paul PILET, Lisa OLIVER
et François M. VALLETTE.

Article en préparation

Differential regulation of pro-survival autophagy by Bcl-2 and Bcl-xL

Muriel PRIAULT^{1,2*}, Erika HUE^{1,2}, Fanny MARHUENDA^{1,2}, Paul PILET³, Lisa OLIVER^{1,2}
and François M. VALLETTE^{1,2}.

¹ INSERM UMR 601, F-44000 Nantes, France

² Université de Nantes, Faculté de Médecine, 9 quai Moncoussu, F-44035 Nantes cedex 01,
France

³ INSERM U791, 1 place Alexis Ricordeau, F- 44042 Nantes cedex, France

*Corresponding Author. Present mailing address: IBGC/CNRS UMR 5095, 1 rue Camille
Saint-Saëns, F-33077 Bordeaux cedex, France. Phone: +33 556999050. Fax: +33 556999051.

Email: muriel.priault@ibgc.cnrs.fr

KEY WORDS

Autophagy, Bcl-2 family, Bcl-2, Bcl-xL

ABBREVIATIONS LIST

3-MA: 3-methyl adenine; AVs: Autophagic vesicles; Baf A1: Bafilomycin A1; EM: Electron Micrographs; FCS: foetal calf serum; GFP: green fluorescent protein; HBSS: Hank's Buffered Salts Solution; KO: Knock Out; LC3: microtubule-associated protein light chain 3; PE: phosphatidylethanolamine; TCA: trichloroacetic acid; MDH: monodansylpentane; MOI: multiplicity of infection.

ABSTRACT

Autophagy is described to be involved in homeostasis, development and disease. However, the mechanisms responsible for its implication both in survival and death have yet to be unravelled. Identification of interrelationships with the apoptotic pathway has begun to shed light on the involvement of autophagy in cell death. Here we show that some anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family play a specific role in regulating survival autophagy. We have observed that, while over-expression of Mcl-1 remained ineffective in autophagy regulation, an over-expression of Bcl-2 and Bcl-xL was accompanied by a stimulation of autophagic proteolytic activity and an increase in the size of autophagic vesicles. In addition, Bcl-xL seemed to exert a tight control on autophagy regulation since its down-regulation caused a more potent inhibition of autophagy than Bcl-2. Furthermore, the regulation of autophagy by Bcl-2 and Bcl-xL did not seem to be redundant since, in contrast to Bcl-2, the autophagic function of Bcl-xL was, on the whole, independent of its interaction with Beclin 1. This study highlights that, in addition to their well-established anti-death function during apoptosis, Bcl-2 and Bcl-xL have a broader role in survival mechanisms and may stand at the cross-roads between pro-survival and pro-death autophagy.

INTRODUCTION

Macro-autophagy is a catabolic process orchestrated by the evolutionary conserved¹ *ATG* genes (for autophagy)². The macroautophagic process (hereafter referred to as autophagy) is morphologically characterised by the formation in the cytoplasm of lipid-rich³ double or multiple membrane bound vesicles called autophagosomes, which randomly trap cytosolic macromolecules, and owing to their size (usually between 500-1500 nm in mammalian cells^{4,5}), can enclose soluble material as well as whole organelles. Degradation of the autophagosomal contents is achieved after nascent autophagic vacuoles have fused with lysosomes⁶. The degradation products are then available for recycling in biosynthetic pathways; thus autophagy is one of the main lysosomal pathways for biological material turnover.

Autophagy was initially characterised as a survival mechanism since it allows cells to overcome stringent conditions thereby extending the lifespan. Upon starvation, mutations in *ATG* genes result in cell death in yeast, chlorosis in plants, and decreased adult life-span in the *daf-2 Caenorhabditis elegans* mutant (reviewed in¹). In mammals, autophagy exists at a basal level and controls homeostatic functions. Stimulation of autophagy was long known as a response to starvation or hormonal stimulation⁷, however, recent studies have extended the cytoprotective role of autophagy to maintenance of cell viability by showing that *ATG* genes are necessary for survival in different settings in mammals⁸⁻¹¹. Such studies elegantly pinpoint that autophagy is critical for bioenergetics maintenance and cell viability *in vitro*, and also plays an essential part in survival of the whole organism *in vivo*.

Beside this physiological role in tissue homeostasis, autophagy is also paradoxically associated with cell death. This concept arose from the observation that autophagy is

commonly seen in dying cells when massive elimination is required in organs (reviewed in¹²). The existence of “autophagic cell death” rather than “cell death with autophagy”¹³ was long questioned because autophagy and apoptosis are often activated together in response to stress¹⁴⁻¹⁶ although displaying distinct morphologies¹⁷. However, recent loss of function studies have provided direct evidence that *ATG* genes are required for death in apoptosis-deficient cells^{18,19}. Therefore, autophagy can be envisaged as an alternative cell death programme, at least in cells with impaired apoptosis machinery. Yet, if autophagic cell death is now acknowledged, the causal event for its onset is still unknown as (i) no definitive proof of autophagy as the primary initiator of cell death has been reported, and (ii) evidence is still lacking of a stimulus that would skew pro-survival autophagy into a deadly programme.

Finally, the field of interest for autophagic cell death was widened due to the finding that autophagy deregulation is implicated in cancer, and because molecular interplays have substantiated a crosstalk between apoptosis and autophagy. The known pro-survival function of autophagy fosters its view as a survival strategy developed by tumour cells, which are generally confronted with nutrient starvation, growth factor deprivation and hypoxia.

Hence the fate of cells is clearly ruled by the coordinated regulation of apoptosis and autophagy, but the when and how are still unresolved questions (reviewed in^{20,21}). Recently, a BH3 domain was identified in the key regulator of autophagy Beclin 1²², which bound to the BH1-BH2 domains of anti-apoptotic Bcl-2²³ or Bcl-xL²⁴. Such interactions were reported to result in autophagy inhibition, but the view of Bcl-2 as an anti-autophagic protein²⁵⁻²⁷ was challenged by the finding that over-expression of Bcl-2 in apoptosis-deficient cells could potentiate autophagy¹⁹. Moreover, Beclin 1 does not seem to be an obligate binding partner for Bcl-xL²⁸. Hence, the functional relevance of these interactions is not fully understood.

We were interested in looking into the basis for the opposing effects of Bcl-2 family members on autophagy under different settings. We have designed a paradigm in which autophagy

postpones cell death and show that survival autophagy is also entangled with anti-apoptotic functions of certain Bcl-2 family members.

RESULTS

Comparison of the autophagic capacities of cancer cell lines

A wide discrepancy has been reported in the autophagic response of cancer cells²⁹. Therefore, we assayed the autophagic response of a panel of cancer cell lines originating from various tissues. Figure 1A shows the degradation of L-[¹⁴C]valine-labeled long-lived proteins measured in DU145 (prostate carcinoma cells), U87-MG (astrocytoma cells), LN-18 (glioblastoma cells), HeLa (cervix carcinoma cells), and HCT116 cells (colorectal carcinoma cells) expressing or not the pro-apoptotic protein Bax (HCT116-BaxKO). The basal degradation of long-lived proteins under control conditions was comparable in all the cell lines tested (not shown), and respectively set as the internal reference (dotted bars) for all treatment-induced proteolytic activities further measured. Starvation-stimulated activities measured in nutrient/serum free medium (black bars) showed a heterogeneous response among the cell lines tested, DU145 being almost defective in the stimulation of the proteolytic process, while HCT116 depicted a two-fold increased activity as compared to basal conditions. The degradative process was essentially lysosomal since Bafilomycin A1 (Baf A1, an inhibitor of lysosomal ATPase proton pump) completely prevented this augmentation (hatched bars). Moreover, starvation-induced proteolysis was associated with autophagy in most cell lines since it was significantly reversed by 3-methyl adenine (3-MA), an inhibitor of PI3 kinases (grey bars). As a control, an apoptotic induction by etoposide over the same period of time did not stimulate any proteolysis (white bars). Of note, HCT116-BaxKO cells exhibited the same autophagic degradation of long-lived proteins as HCT116 parental cells, suggesting that Bax was not critical for autophagy, at least over the time frame of the experiment.

One of the hallmarks of autophagy is the conversion of cytosolic Atg8/LC3-I into the autophagosome-bound phosphatidylethanolamine conjugate LC3-II. Figure 1B & C

confirmed that DU145 were defective for autophagy as these cells failed to produce LC3-II upon starvation treatment. In the case of U87-MG cells, a slight conversion into LC3-II could be observed but the lack of effect of 3-MA in figure 1A suggested rather that other proteolytic pathways prevailed over autophagy to carry out proteolysis during starvation. LN18, HeLa, HCT116 and HCT116-BaxKO cells exhibited significant amount of LC3-II when starved. Hence, our data show that cancer cells display heterogeneous autophagic capacities, suggesting that some of the numerous pathways leading to autophagy stimulation might be impaired in certain cancer cells³⁰, and that Bax is not essential for autophagy.

Morphometric comparison of starved cell lines by video microscopy: Autophagy as a survival process.

We were interested in comparing the behaviour of different cell lines placed for 48h in a serum/nutrient free medium, to look into the different morphologies exhibited depending on their competency for autophagy (Fig. 1) and/or apoptosis (Fig. 2B). Video microscopy followed by morphometric analyses were performed on all cell lines, and Figure 2A exemplifies typical results. When cells were competent for both autophagy and apoptosis (HeLa, LN18 or HCT116 parental cells) starved cells essentially displayed the multiple membrane blebs typical of apoptosis execution. When cells could execute neither apoptosis, nor autophagy (DU145), they underwent a default cell death characterised by a rapid loss of osmotic integrity resulting in the swelling of a single major bleb (within 20 to 30 mins after detachment from the plate). Among the cell lines tested, HCT116 cells were the most competent for autophagy, and the Bax-KO subclone was chosen to exemplify autophagy competent and apoptosis deficient cells, as shown by the absence of caspase 3 cleavage (Fig. 2B) and caspase activity assay (not shown). Morphometric analyses of starved HCT116-BaxKO cells showed that over 48h, more than 50% detached from the plate but maintained

plasma membrane integrity, as measured by propidium iodide exclusion (Fig. 2C) and as shown in Figure 2D, where the detached cells were collected after up to 24h post-starvation, re-cultured in complete media, and recuperated their capacity to adhere and proliferate normally. Of note, the detached cells could not account for a fraction of mitotic cells since no cell division occurred after 6h of starvation, in agreement with cell cycle arrest documented in autophagic cells^{11,31}. Hence, starvation seems to drive autophagy competent cells into a transient “stasis” state, which is reversible and resembles the metabolically quiescent phenotype which Lum *et al.* have correlated to the autophagic capacity¹¹.

We further assayed the correlation with autophagy using ShRNA targeting of Atg7 in HCT116-BaxKO cells (Fig. 2A). The autophagic machinery uses two ubiquitin-like conjugation systems for autophagosomes completion, which include *ATG7*, a gene encoding a protein reminiscent of the E1 ubiquitin-activating enzymes³². ShRNA targeting of Atg7 efficiently decreased the gene expression (Fig. 4A). Video microscopy analyses (Fig. 2A) showed that while Atg7 silencing had no detectable effect under control conditions (not shown), it resulted in a dramatic decrease in the number of stasis cells (light grey bar <5%) with a corresponding increase in the number of the cells undergoing osmotic death (dark grey bar ~80%). These results reaffirmed that the stasis state was relevant to the autophagic capacity since HCT116-BaxKO-ShATG7 cells were similar to autophagy-defective DU145 cells in morphometric analyses. Moreover, entry into the stasis state appeared as a means for autophagy competent cells to keep death at bay for a certain time at least. Therefore, following a similar rationale to previous studies¹¹, we conclude that over the time frame of the experiment autophagy confers a survival advantage, albeit transient, since cells eventually die.

Ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xL, but not Mcl-1, stimulates autophagy

Next we addressed the regulation of pro-survival autophagy by anti-apoptotic proteins of the Bcl-2 family. HCT116 cells were the most autophagy-competent cells among those tested, however, the kinetics of apoptosis in the parental cell line were not compatible with a study of the slower autophagic process, for this reason and in order to separate the contribution of the Bcl-2 family members to apoptosis, the apoptosis-deficient background of HCT116-BaxKO cells was used for the rest of the experiments. The HCT116-BaxKO cells were transfected with plasmids encoding either Bcl-2, Bcl-xL or Mcl-1, resulting respectively in 9, 2 and 3 fold protein increase (Fig. 3A). Morphometric analyses by video microscopy of cells cultured under starvation conditions showed that over-expression of Bcl-2 and Bcl-xL but not Mcl-1, significantly stimulated the number of cells entering the autophagic stasis state (Fig. 3B, light grey bars are respectively 88%, 82% and 45%). This was dependent on Atg7 since the number of stasis cells in Bcl-xL ShAtg7 cells was only ~30% (Fig. S1). Mcl-1 over-expression, however, had a different effect since it augmented the number of viable adherent cells at the end of the 48h starvation (white bar = 48%).

The above data were confirmed by proteolysis experiments, which showed that ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xL triggered a slight but significant increase in total autophagic proteolysis, while cells over-expressing Mcl-1 essentially remained at the level of the parental HCT116-BaxKO cells (Fig. 3C).

We next attempted to visualise autophagosomes. The accuracy of autophagosomes detection by starvation-induced relocalisation of exogenous LC3-GFP introduced by transient transfection was recently called into question³³. Moreover, in some settings, an increase in total LC3 content has already been described to sensitise cells to autophagy; thus we reasoned that stable LC3 transformants were not appropriate for our study, and we combined instead transmission electron microscopy and *in vivo* labelling of autophagic vesicles (AVs) by monodansyl-pentane (MDH). MDH staining showed that ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-

xL markedly stimulated the number of AVs as compared to parental HCT116-BaxKO or to cells over-expressing Mcl-1 (Fig. 3D). Electron micrographs confirmed that degradative vesicles were more abundant in starved cells over-expressing Bcl-2 and Bcl-xL, while those expressing Mcl-1 remained essentially as HCT116-BaxKO cells (Fig. 3F); occasionally, and opposite to all the other cell lines, extensive vacuolisation of the cytoplasm could be observed in cells over-expressing Bcl-xL (Fig. 3F, right end panel).

Computer assisted analysis of MDH staining (Fig. 3E) raised the unexpected observation that ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xL also correlated with an increase in the size of AVs. Under control conditions, the AVs diameter in HCT116-BaxKO cells ranged from ~400 to ~1700 nm, similar to that reported in mammals (between 500 and 1500 nm^{4,5}). This, therefore, reaffirmed that MDH staining was an accurate method for AVs detection. Ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xL under control conditions augmented the maximum diameter size (respectively 1880 and 1970 nm) but the distribution was not statistically different from that of parental cells (see legend of Fig. 3E for statistics). However, upon nutrients/serum withdrawal, ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xL resulted in a marked increase in the frequency of larger AVs; the average 810 nm diameter in HCT116-BaxKO cells was increased to ~1000 nm in Bcl-2 and Bcl-xL over-expressing cells. In addition, the maximum 2030 nm diameter in HCT116-BaxKO cells reached 3730 nm in Bcl-2 and Bcl-xL over-expressing cells. This observation was confirmed in electron micrographs of occasional cells (Fig. 3F). The distributions of starved cells over-expressing Bcl-2 or Bcl-xL, but not Mcl-1, were statistically different from that of starved parental cells (see legend of Fig. 3E for statistics), therefore the effect of Bcl-2 and Bcl-xL appeared to be specific since cells over-expressing Mcl-1 essentially remained as the parental cells.

Hence we conclude that, while Mcl-1 does not seem to play an essential role in autophagy, ectopic expression of Bcl-2 or Bcl-xL specifically stimulates the autophagic capacity and this phenomenon is accompanied by an increase in the size of the AVs.

Down-regulation of Bcl-xL is a more potent inhibitor of autophagy than that of Bcl-2

In order to ascertain the autophagic role of Bcl-2 and Bcl-xL, we explored the effect of their down-regulation as compared to that of Atg7. A multiplicity of infection (MOI) of 4 caused at least a 90% silencing of the target genes (Fig. 4A) without any cross effect on each other (not shown). Starvation-induced proteolysis showed that all the ShRNAs had an inhibitory effect (Fig. 4B & S2), Bcl-2 knocked-down cells retaining 75% of the 3-MA sensitive autophagy as compared to a scramble shRNA (SCR cells), while Bcl-xL and Atg7 silencing decreased the degradation rate respectively to 15 and 17% (Fig. 4B & S2). Hence, Bcl-2 and Bcl-xL knock-down both had a compelling inhibitory effect on the degradation of long-lived proteins, however, only Bcl-xL down-regulation was as efficient as that of Atg7 in inhibiting autophagy. This was a first indication that Bcl-2 and Bcl-xL may not be completely redundant in the regulation of autophagy.

In vivo labelling of AVs by MDH was also performed (Fig. 4C). The plasmid used to transduce the ShRNAs carries the green fluorescent protein (GFP) gene as selection marker and we could thus correlate the efficiency of infection with the autophagic response. Under control conditions (Fig. 4C, left), MDH labelling was independent of the degree of infection or of the gene targeted, showing that the knock-down of the different protein had no obvious effect. When cells were cultured under serum/nutrient starvation (Fig. 4C, right), those transduced with a SCR-ShRNA displayed an increased MDH labelling irrespective of the high (arrows) or low (arrow heads) degree of infection, indicating intact autophagy promoting capacity. Furthermore down-regulation of Bcl-2 only had a marginal inhibitory

effect since transduced cells (arrows) exhibited only slightly less MDH-labelled AVs than non-transduced cells (arrow heads). In comparison, Bcl-xL-shRNA or Atg7-shRNA had a much more amplifying effect since bright green cells exhibited far less (if any) MDH-stained AVs than non-transduced cells. Thus, *in vivo* labelling of AVs by MDH confirmed that Bcl-xL down-regulation had a comparable effect to that of Atg7 during autophagy, and was more efficient than Bcl-2 to prevent AVs formation. This was also confirmed by electron microscopy since double membrane bound vesicles were barely detectable in starved cells transduced with Bcl-xL-shRNA or Atg7-shRNA (Fig. 4D).

Bcl-xL regulates autophagy independently of Beclin 1

The autophagic role of Bcl-2 has already been documented as tightly dependent on its interaction with the BH3-like domain of Beclin 1^{23,34}. Beclin 1 was also depicted as a non-obligate²⁸ Bcl-xL interacting protein²⁴. We assayed these different partnerships in HCT116-BaxKO cells grown under either normal or starvation conditions (Fig. 5A). Endogenous Beclin 1 was immunoprecipitated from cell lysates and antibodies against Bcl-2 and Bcl-xL were used to probe the proteins associated. Only Bcl-2 was found associated with Beclin 1 and opposite to previous reports, the association was not found to vary in starved versus control cells²³. Inversely, the immunoprecipitation of endogenous Bcl-2 and Bcl-xL confirmed that Beclin 1 co-precipitated with Bcl-2 in equal amounts in control and starved cells, but no interaction between Bcl-xL and Beclin 1 was detected.

Because interactions between an antibody and its epitope can sometimes be disrupted during the immunoprecipitation process, we further analysed the subcellular localisation of Bcl-xL and Beclin 1 as another clue of their possible interaction (Fig. 5B). Confocal analyses showed that Bcl-xL completely co-localised with the mitochondrial protein Atp1, under control and starvation conditions (Fig. 5B upper panels) while Beclin 1 exhibited a diffuse cytosolic

staining under control conditions and redistributed toward a network typical of actin stress fibres under starvation conditions (Fig. 5B, lower panel). Hence, confocal analyses showed that Bcl-xL and Beclin 1 were essentially localised in separate compartments and underlined an autophagic role of Bcl-xL independent of Beclin 1.

We could, however, not exclude the fact that a minor fraction of both proteins would co-localise and be functional partners. Bcl-xL^{G138A} was shown to lose its interaction with the BH3 domain of Beclin 1²⁴, therefore we set up a last approach based on the ectopic expression of this BH3-binding defective mutant of Bcl-xL. The level of over-expression of Bcl-xL^{G138A} in HCT116-BaxKO cells was similar to that of ectopic native Bcl-xL (Fig. 3A). Starvation-induced proteolysis showed that Bcl-xL^{G138A} was far less efficient than its native counterpart to stimulate autophagic proteolysis (Fig. 3C). Likewise, time-lapse experiments showed that cells over-expressing Bcl-xL^{G138A} exhibited an altered capacity to enter autophagic stasis as compared to cells over-expressing Bcl-xL (Fig. 3B). Thus, disrupting BH3-mediated interactions of Bcl-xL resulted in a less functional autophagic pathway.

However, if some of the parameters reflecting the functionality of autophagy were affected by this mutation, the physical size of AVs was not; MDH labelling of AVs (Fig. 3D & 3E) and electron micrographs (Fig. 3F) of cells over-expressing Bcl-xL or Bcl-xL^{G138A} under control and starved conditions indicated that both proteins retained the capacity to trigger a comparable increase in the amount and size of AVs. Taken together, these data suggested that Bcl-xL regulation of AVs size was not dependent on its BH3-binding capacity, and was likely not ruled by an interaction with Beclin 1.

DISCUSSION

We were interested in studying the regulation of autophagy by anti-apoptotic Bcl-2 family members. Since the controversy about the pro-survival or pro-death role of autophagy has not settled yet, some reports indicating that starvation stimulates pro-survival autophagy¹¹, whereas others disagree with this view²³, we set out to determine the purpose of starvation-induced autophagy. We have performed morphometric and survival analyses of various starved cell lines, and were able to delineate a “stasis state” strictly correlated to autophagy competency, which proved to be a reversible metabolically quiescent phenotype allowing cells to sustain viability during nutrient restriction (Fig. 2). This led us to conclude that starvation stimulated pro-survival autophagy.

We then attempted to elucidate whether anti-apoptotic proteins could exceed the well-established anti-death functions they exert during apoptosis and investigated their possible role in survival autophagy. Long-lived protein degradation combined with morphometric analyses has pointed toward HCT116 colon cancer cells as the best autophagic responsive cells among those tested (Fig. 1). In order to analyse autophagy in cell-autonomous survival and the possible role of anti-apoptotic members of the Bcl-2 family, apoptosis-deficient cells were used to circumvent the commitment of the latter proteins to apoptosis regulation. This choice was fostered by our observation that pro-apoptotic Bax did not seem to be an essential regulator of starvation-induced autophagy (Fig. 1) in HCT116 cells. In agreement with Shimizu *et al.*¹⁹, our finding that neither etoposide nor UV-irradiation (not shown) stimulated autophagic proteolysis in HCT116 cells supported the observation that depending on the settings (apoptotic stimuli or starvation) the autophagic process triggered does not exhibit the same requirement for Bax.

The choice of HCT116-BaxKO cells limited the evidence to specific pro-autophagic functions played by Bcl-2 and Bcl-xL. We have analysed the effect of ectopic expression as well as

down-regulation of these proteins and have shown in each case by three different approaches (proteolytic rate analyses, electron microscopy and AVs staining) that Bcl-2 and Bcl-xL were implicated in regulating the production and the size of AVs; Bcl-2 and Bcl-xL consequently stimulated survival autophagy. Both pro- and anti-autophagic functions have been attributed to Bcl-2 and Bcl-xL as they have been reported to inhibit autophagy in apoptosis competent cells^{23,24} and to stimulate autophagy in Bax/Bak deficient cells¹⁹. In the former studies, ER-localized Bcl-2 was the relevant pool for autophagy regulation as it hampered the formation of Beclin 1/hVPS34 complex, and subsequently impaired the recruitment at the nascent autophagosomal membrane of other soluble autophagy regulators. Inversely, in the latter study, the ectopic expression of Bcl-2 and Bcl-xL stimulated autophagy. Data presented here were obtained in apoptosis-deficient cells, and supported the data of Shimizu *et al.*¹⁹, which also suggested possible functional differences between Bcl-2 and Bcl-xL in the regulation of autophagy; our data would substantiate such an hypothesis since endogenous Bcl-2 interacted with endogenous Beclin 1 (Fig. 5A) while we detected no interaction between Bcl-xL and Beclin 1 (Fig. 5A & B). In addition, the down-regulation of Bcl-xL had a more potent inhibitory effect on AVs formation (Fig. 4C & D) and activity (Fig. 4B) than that of Bcl-2. Hence, Bcl-2 and Bcl-xL may regulate autophagy through non-redundant mechanisms.

The pro-autophagic functions depicted here do not coincide with data from the groups of Levine²³ or Kroemer's²⁴ on Bax-expressing cells, however, it is noteworthy that Bcl-2 and Bcl-xL always seem to retain a pro-survival function, highlighting their immovable status of "pro-survival molecules" independent of the pathway. Moreover, these groups also pinpointed that the array of functions a given protein can wield is strictly dependent on its subcellular localisation²³, and on the partners available, the hierarchy of the respective affinities orchestrating the different functions²⁴. Hence, even if Bax is not a relevant protein for autophagy, its presence or absence may modify the panel of interactions in the cell as well as

the subcellular distribution of the potential partners. It is clear from *in vitro* assays that Bcl-xL is capable of interacting with the BH3 domain of Beclin 1²². *In vivo* experiments have, however, shown that this interaction may be displaced in some models²⁸ (this study). Also, the fact that autophagic functions of Bcl-2 and Bcl-xL may be regulated by BH3-independent mechanisms was hypothesized by Maiuri *et al*²⁴. Using a BH1 mutant of Bcl-xL we brought supporting evidence since this BH3-binding defective mutant retained the capacity to control the size and number of AVs (Fig. 3D-E). Only the parameters reflecting the functionality of the autophagic pathway, namely the starvation-induced proteolysis (Fig. 3C) and the capacity to enter the stasis state (Fig. 3B) depended on the capacity of Bcl-xL to interact with a BH3-containing protein. Therefore, further work will be necessary to identify the binding partner(s) of Bcl-xL under autophagic conditions. The present study underlines that Bcl-2 and Bcl-xL wield their survival functions beyond apoptosis regulation. Their differential implication in autophagy is a promising opportunity to decipher the possible interplay between pro-survival processes.

ACKNOWLEDGEMENTS:

M.P. was supported by a post-doctoral fellowship from INSERM.

We thank B. Salin for technical help with electron microscopy experiments.

TITLES AND LEGENDS TO FIGURES

Figure 1: Cancer cells display heterogeneous degradation of long-lived proteins under starvation.

(A) Different cell lines were incubated with L-[¹⁴C]valine, and chased for 9h in complete medium (dotted bars), HBSS (black bars) or HBSS supplemented with either 10 mM 3-MA (grey bars) or 0,1 μM Baf A1 (dashed bars), or in complete medium + 20 μM Etoposide. Results report the stimulation of proteolysis relative to the respective basal levels measured under non-starving conditions (dotted bars). The values are the means of at least 3 independent experiments ± SD. (B) Western blots show the starvation-induced conversion of LC3-I into PE-conjugated LC3-II in the presence of E-64d (20 μg/ml) and leupeptine (20 μg/ml) to prevent the degradation of intra-autophagosomal LC3-II. 150 μg whole cell lysate were loaded on 15% SDS-PAGE. (C) Quantification of LC3-I and LC3-II respectively in each cell line; *Student test p<0,02.

Figure 2: Morphometric analysis of cells exhibiting different competency for apoptosis and autophagy.

(A) Morphometric analyses to determine the viable cells (defined as adherent cells), apoptotic cells (defined as cells exhibiting multiple membrane blebs), cells dying from osmotic demise (defined as cells displaying the swelling of a single major bleb), and stasis cells (defined as cells that have detached from the substratum but maintain plasma membrane integrity). Cells were plated in complete media and time-lapse video microscopy started when cells were transferred into HBSS. A minimum of 700 cells were analysed over triplicate experiments. (B) Western-blot showing caspase 3 cleavage in control or staurosporine-treated cells (1μM for 6h). 50 μg whole cell lysate were loaded on a 12% SDS-PAGE. (C) Cells were starved for the indicated times with or without 3-MA, and PI excluding cells were counted by FACS;

values are the means of at least 3 independent experiments \pm SD . (D) The non-adherent HCT116 cells from 24h-starved cultures were collected and transferred into complete medium. Cells were allowed to adhere for 6 hours, then time-lapse video microscopy was started for 48h. Scale bar: 100 μ m.

Figure 3: Bcl-2 and Bcl-xL stimulate survival autophagy while Mcl-1 does not.

(A) Western blots of cells over-expressing various anti-apoptotic proteins. Total protein extracts were performed and 50 μ g proteins were analysed on a 12% SDS-PAGE. Immunodetections were performed with the antibodies mentioned in the material and methods section. Mcl-1 was detected as a mature protein (m), a spliced variant (s) and a caspase-cleaved product (c). (B) Morphometric analyses of HCT116-BaxKO-derived stable cell lines: cells were plated in complete media and time-lapse video microscopy started when cells were transferred to HBSS (starvation) or not (ctrl). A minimum of 700 cells were analysed in at least triplicate experiments. (C) Relative stimulation of starvation-induced 3-MA-sensitive degradation of long-lived proteins in HCT116-BaxKO cell lines over-expressing various anti-apoptotic proteins. Cells were chased for 6h in HBSS or HBSS + 3-MA. The 3-MA sensitive activity measured in HCT116-BaxKO cells was set at 1 and results represent the 3-MA sensitive activities of each infected cell line relative to that found in HCT116-BaxKO cells. Data are the mean (\pm SD) of at least 3 independent experiments. Student test was used for statistics significance: (*) $p=0,013$ (**) $p=0,009$ (***) $p=0,174$ and (****) $p=0,016$. (D) Cells were transferred (Starvation) or not (complete medium) in starvation medium for 6h, and then stained with MDH. Pictures are representative of at least 4 independent experiments. Scale bar: 25 μ m. (E) Computer-assisted analyses were performed to determine the diameter of all MDH-stained structures. The distribution of the diameters was plotted by intervals of 0,2 μ m, and the frequency of occupation of these intervals labelled (% events). A Student test was

applied for statistic analysis: for transfected cells, distributions under control conditions were not statistically different from control parental cells ($p=0,42$ for HCT116-pBcl-2, $p=0,24$ for HCT116-pBcl-xL, $p=0,20$ for HCT116-pBcl-xL^{G138A}, $p=0,17$ for HCT116-pMcl1); within each cell line, the distribution under starved conditions was statistically different from their respective control distribution ($p<0,0001$) except for Mcl-1 transfectants ($p<0,4$); within each cell line, distributions under starved conditions were statistically different from starved parental cells ($p<0,00005$). For each cell line 200 to 400 cells were analysed. (F) Electron micrographs of HCT116-BaxKO cells starved for 6h. Scale bar: 2 μ m.

Figure 4: Silencing of Bcl-2 and Bcl-xL has non-redundant effects on autophagy.

(A) Western blots of HCT116-BaxKO cells infected with increasing amounts of viral particles carrying ShRNA against Bcl-2, Bcl-xL or Atg7, or a scrambled ShRNA (SCR). Total protein extracts were performed, and 50 μ g proteins were analysed on SDS-PAGE. Immunodetections were performed with the antibodies mentioned in the material and methods section. (B) HCT116-BaxKO cells infected with viral particles carrying ShRNA against Bcl-2, Bcl-xL or Atg7 with a MOI=4 were analysed for autophagic degradation of long-lived proteins shortly after infection. Cells were chased for 6h in HBSS or HBSS+10 mM 3-MA. 3-MA sensitive activity measured in SCR-infected cells was set to 100%, and results represent the 3-MA sensitive activities of each infected cell line relative to that found in SCR-infected cells. Data are the mean (\pm SD) of at least 3 independent experiments. When the error is not indicated, bar was too small to be seen. (C) HCT116-BaxKO cells infected with viral particles carrying ShRNA against Bcl-2, Bcl-xL or Atg7 with a MOI=4 were analysed for their GFP and MDH staining after 6h of starvation (right) or growth in control medium (left). Highly infected cells are bright green (arrows) and low infected cells are light green (arrow heads). (D) Electron micrographs of HCT116-BaxKO cells starved for 6h.

Figure 5: Bcl-xL does not seem to interact or co-localise with Beclin 1.

(A) Co-immunoprecipitation of endogenous Beclin 1 with endogenous Bcl-2 and Bcl-xL in cells grown under normal conditions (C) or starved for 6h (H).

(B) Immunocytochemistry on endogenous Bcl-xL and Beclin 1 in cells grown under normal conditions or starved for 6h.

MATERIALS AND METHODS

Materials:

All cell culture material was obtained from Gibco (Invitrogen, Cergy Pontoise, France).

Unless stated otherwise, all chemicals were from Sigma (St. Louis, USA)

Cell lines and cell culture:

U87-MG (human astrocytoma cells) and LN-18 (human glioblastoma cells) were purchased from ATCC (American Type Culture Collection, Rockville, MA, USA). DU145 (prostate carcinoma cells) were obtained from Dr P.T. Daniel (Berlin, Germany). HCT116 and HCT116-Bax knock out (KO; colorectal carcinoma cells) were obtained from Dr B. Vogelstein (Baltimore, USA).

All growth media are supplemented with 2 mM L-glutamine, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 10% foetal calf serum (FCS), unless otherwise stated. U87-MG cells were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 1 g/L glucose. LN-18 cells were grown in DMEM containing 4,5 g/L glucose and 5% FCS. DU145 and HEK293FT cells were grown in DMEM containing 4,5 g/L glucose. HCT116 and HeLa cells were respectively grown in McCoy's 5A and RPMI-1655 media.

Stable cell lines were established from HCT116-BaxKO cells transfected with pRc-CMV or pRc-CMV encoding Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-xL^{G138A} or Mcl-1. Cells (1×10^6) were transfected with 10 µg plasmid DNA using the Gene pulser II (Biorad, Marnes La Coquette, France) and two pulses of 250 V-850 µF. Stable cell lines were established by neomycin (1 mg/mL) selection.

HIV-1 lentivirus-based vectors were used to introduce shRNAs into HCT116-BaxKO cells. ShRNAs were cloned under the control of U6 promoter between Bam-HI and Hind-III sites in pSilencer 2.1 (Ambion, Applied Biosystems, Courtaboeuf, France), according to the manufacturer's protocole. PCR amplified fragments were further subcloned between Xba-I

and Xho-I sites of FG12 lentivector³⁵. HEK293FT cells were used as packaging cells, and virus production was as described in ³⁵. Human Bcl-2 siRNA, 5'- CCG GGA GAU AGU GAU GAA G -3', Bcl-xL siRNA, 5'- AGG AUA CAG CUG GAG UCA G -3' and Atg7 siRNA, 5'- AGG ATA CAG CTG GAG TCA G -3' were used.

Autophagy Assays:

Autophagy was induced by amino acids and serum starvation: cells were washed three times with PBS and incubated for 6 to 9h in Hank's Buffered Salts Solution (HBSS) buffered with 2,2 g/L NaHCO₃ and supplemented with 0,1% BSA.

Autophagic vacuoles were stained with monodansylpentane (MDH) as described by Nieman *et al.*³⁶. Briefly, cells were grown on gelatine-coated glass cover-slips to approximately 70% confluence, transferred into HBSS for 6h, washed with PBS, and incubated for 30 mins with 200 µM MDH at 37°C in the dark then washed with PBS, and mounted with Mowiol polymerising agent for immediate observation under UV (λ_{ex} =359 nm) on a Leica DMLB microscope. Digital pictures were acquired with a Leica DC 300-F camera. Analyses of the images were done with a home-made programme on a Leica Q550 imaging workstation (Cambridge, UK).

The degradation of radio-active L-[¹⁴C]valine-labeled long-lived proteins was measured as follows: cells were incubated for 24h in complete medium with 0,1 µCi L-[¹⁴C]valine to label total proteins. Radio-activity was further pre-chased for 1h in complete medium in the presence of an excess of L-valine (10 mM) to remove the contribution of short-lived protein degradation. Finally, cells were incubated for 6 to 9h either in complete medium or in HBSS in the presence or in the absence of 3-methyl adenine (3-MA) and with an excess of L-valine. Supernatants were collected and free amino acids precipitated with 80% TCA, while proteins in adherent cells were precipitated with 10% TCA. Radio-activity was quantified in a

scintillation liquid analyser Tri-carb 2100TR (Packard). Proteolysis is expressed as the percentage of free radio-activity released in the supernatant relative to the total radio-activity. Electron microscopic (EM) analyses of autophagy were done on fixed cells with 4% glutaraldehyde in PBS (pH 7,4), followed by 2% OsO₄ post-fixation. After dehydration in a graded series of ethanol, adherent cells were embedded in Epoxy resin, and thin sections (60 to 70 nm) were cut on a Reichert Ultracut E microtome and stained with uranyl acetate and lead citrate for observation at 80 KV under a JEM-1010 transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan).

Time-lapse analysis:

Time-lapse videomicroscopy experiments were performed using a Zeiss Axiovert 200-M inverted microscope and the AxioVision 4.6 programme. Dishes were placed inside an Incubator XL-3, on a heating insert M06 (37°C) topped with a CO₂-cover HM connected to a CO₂ controller that maintained environmental CO₂ concentration at 5% for the duration of filming. Digital pictures were acquired and saved every 10 mins over 48h using an AxioCam MRm digital camera. The series of photographs were displayed as continuous time-lapse movies for analyses.

Western blot:

Total proteins were extracted in 1% NP-40, 0,5% sodium-deoxycholate, 0,1% SDS supplemented with protease inhibitor Mini[®] from Roche Diagnostics (Mannheim, Germany). Protein concentration was determined using BCA kit (Interchim, Monluçon, France). Protein extracts were separated on SDS-PAGE, transferred onto PVDF membrane (Millipore, St. Quentin-Yvelines, France) and revealed with ECL (Roche Diagnostics). Primary antibodies were used at 1/1000 dilution: mouse monoclonal anti-actin (Chemicon, Millipore), rabbit

polyclonal anti-Atg7 (Rockland, Tebu-Bio, Le Perray en Yveline, France), mouse monoclonal anti-Bcl-2 (DakoCytomation, Trappes, France), rabbit polyclonal anti-Bcl-x (Transduction Lab, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France), rabbit monoclonal anti-Caspase 3 (Abcam, Cambridge, UK), rabbit polyclonal anti-Mcl-1 (PharMingen, BD Biosciences). Rabbit serum raised against the human LC3 peptide PSEKTFKQRRSFEQ (MilleGen, Labège, France) was used at 1/250 dilution. HRP-conjugated secondary antibodies were from Biorad. Quantification was performed with the software ImageJ.

Immunoprecipitation:

Cells were resuspended in CHAPS buffer (1% CHAPS, 10 mM HEPES, 150 mM NaCl, supplemented with protease inhibitors) then disrupted by 3 cycles of freeze/thawing on ice. Cell debris was removed by centrifugation (20 mins at 13000g). Immunoprecipitation was performed on 500 µg proteins, using a Protein G-agarose Immunoprecipitation Kit (Sigma), and 2 µg antibodies (mouse monoclonal anti-Becn1 1), rabbit monoclonal anti-Bcl-2 (Epitomics, Euromedex, Mundolsheim, France), or rabbit monoclonal anti-Bcl-x_L (Epitomics)). After elution, 1/5 of the eluted proteins were separated on a 12% SDS-PAGE, and Western blot were as described above.

Immunocytochemistry:

Cells were grown on gelatine-coated cover-slips. Cells were fixed in 4% paraformaldehyde for 40 mins, permeabilised with 0,1% SDS for 10 mins, blocked with 3% BSA for 20 mins, and then incubated with primary antibodies for 1h followed by secondary Alexa antibodies (Molecular Probes, Invitrogen) for 30 mins. Cells were finally mounted with Mowiol polymerizing solution, and observed under a confocal microscope (LEICA TCS-SP1). Primary antibodies were: mouse monoclonal anti-Becn1 1, mouse monoclonal anti-ATP1

(Molecular probes), rabbit polyclonal anti-ATP1 was a gift from Pr J. Lunardi and rabbit polyclonal anti-Bcl-x (Transduction Lab).

FACS analysis:

Cells were grown in 24 wells plate to approximately 70% of confluence and then starved with or without 3-MA (10mM) for 24 or 48 hours. Cells were then collected, washed two times with PBS, resuspended in PBS supplemented with IP (5µg/mL) and analysed on a Facscalibur.

Supplementary information is available at Cell Death and Differentiation's website.

BIBLIOGRAPHY

1. Levine B and Klionsky DJ Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell* 2004; **6**: 463-477
2. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, Sibirny A, Subramani S, Thumm M, Veenhuis M and Ohsumi Y A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Developmental Cell* 2003; **5**: 539-545
3. Fengsrud M, Raiborg C, Berg TO, Stromhaug PE, Ueno T, Erichsen ES and Seglen PO Autophagosome-associated variant isoforms of cytosolic enzymes. *Biochemical Journal* 2000; **352**: 773-781
4. Fengsrud M, Erichsen ES, Berg TO, Raiborg C and Seglen PO Ultrastructural characterization of the delimiting membranes of isolated autophagosomes and amphisomes by freeze-fracture electron microscopy. *Eur J Cell Biol* 2000; **79**: 871-882
5. Dunn WA, Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: formation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* 1990; **110**: 1923-1933
6. Dunn WA, Jr. Studies on the mechanisms of autophagy: maturation of the autophagic vacuole. *J Cell Biol* 1990; **110**: 1935-1945
7. Schworer CM and Mortimore GE Glucagon-induced autophagy and proteolysis in rat liver: mediation by selective deprivation of intracellular amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1979; **76**: 3169-3173.
8. Boya P, Gonzalez-Polo RA, Casares N, Perfettini JL, Dessen P, Larochette N, Metivier D, Meley D, Souquere S, Yoshimori T, Pierron G, Codogno P and Kroemer G Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol* 2005; **25**: 1025-1040
9. Kirkegaard K, Taylor MP and Jackson WT Cellular autophagy: surrender, avoidance and subversion by microorganisms. *Nat Rev Microbiol* 2004; **2**: 301-314

10. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, Ohsumi Y, Tokuhisa T and Mizushima N The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature* 2004; **432**: 1032-1036
11. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C, Lindsten T and Thompson CB Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 2005; **120**: 237-248
12. Lockshin RA and Zakeri Z Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 2405-2419
13. Kroemer G, El-Deiry WS, Golstein P, Peter ME, Vaux D, Vandenabeele P, Zhivotovsky B, Blagosklonny MV, Malorni W, Knight RA, Piacentini M, Nagata S and Melino G Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 2005; **12 Suppl 2**: 1463-1467
14. Bursch W, Ellinger A, Gerner C, Frohwein U and Schulte-Hermann R Programmed cell death (PCD). Apoptosis, autophagic PCD, or others? *Ann N Y Acad Sci.* 2000; **926**: 1-12
15. Xue L, Fletcher GC and Tolkovsky AM Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci* 1999; **14**: 180-198
16. Gonzalez-Polo RA, Boya P, Pauleau AL, Jalil A, Larochette N, Souquere S, Eskelinen EL, Pierron G, Saftig P and Kroemer G The apoptosis/autophagy paradox: autophagic vacuolization before apoptotic death. *J Cell Sci* 2005; **118**: 3091-3102
17. Clarke PG Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat. Embryol.* 1990; **181**: 195-213.
18. Yu L, Alva A, Su H, Dutt P, Freundt E, Welsh S, Baehrecke EH and Lenardo MJ Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science* 2004; **304**: 1500-1502

19. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S, Thompson CB and Tsujimoto Y Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 2004; **6**: 1221-1228
20. Levine B and Yuan J Autophagy in cell death: an innocent convict? *J Clin Invest* 2005; **115**: 2679-2688
21. Debnath J, Baehrecke EH and Kroemer G Does autophagy contribute to cell death? *Autophagy* 2005; **1**: 66-74
22. Oberstein A, Jeffrey P and Shi Y Crystal structure of the BCL-XL-beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *J Biol Chem* 2007;
23. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, Packer M, Schneider MD and Levine B Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 2005; **122**: 927-939
24. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain JC, Gautier F, Juin P, Tasdemir E, Pierron G, Troulinaki K, Tavernarakis N, Hickman JA, Geneste O and Kroemer G Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *Embo J* 2007; **26**: 2527-2539
25. Canu N, Tufi R, Serafino AL, Amadoro G, Ciotti MT and Calissano P Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem* 2005; **92**: 1228-1242
26. Cardenas-Aguayo Mdel C, Santa-Olalla J, Baizabal JM, Salgado LM and Covarrubias L Growth factor deprivation induces an alternative non-apoptotic death mechanism that is inhibited by Bcl2 in cells derived from neural precursor cells. *J Hematother Stem Cell Res* 2003; **12**: 735-748

27. Saeki K, Yuo A, Okuma E, Yazaki Y, Susin SA, Kroemer G and Takaku F Bcl-2 down-regulation causes autophagy in a caspase-independent manner in human leukemic HL60 cells. *Cell Death Diff.* 2000; **7**: 1263-1269
28. Zeng X, Overmeyer JH and Maltese WA Functional specificity of the mammalian Beclin-Vps34 PI 3-kinase complex in macroautophagy versus endocytosis and lysosomal enzyme trafficking. *J Cell Sci* 2006; **119**: 259-270
29. Pattingre S and Levine B Bcl-2 inhibition of autophagy: a new route to cancer? *Cancer Res* 2006; **66**: 2885-2888
30. Otsuka H and Moskowitz M Differences in the rates of protein degradation in untransformed and transformed cell lines. *Exp Cell Res* 1978; **112**: 127-135
31. Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C and Blenis J mTOR controls cell cycle progression through its cell growth effectors S6K1 and 4E-BP1/eukaryotic translation initiation factor 4E. *Mol Cell Biol* 2004; **24**: 200-216
32. Tanida I, Tanida-Miyake E, Ueno T and Kominami E The human homolog of *Saccharomyces cerevisiae* Apg7p is a Protein-activating enzyme for multiple substrates including human Apg12p, GATE-16, GABARAP, and MAP-LC3. *J Biol Chem* 2001; **276**: 1701-1706
33. Kuma A, Matsui M and Mizushima N LC3, an Autophagosome Marker, Can be Incorporated into Protein Aggregates Independent of Autophagy: Caution in the Interpretation of LC3 Localization. *Autophagy* 2007; **3**: 323-328
34. Liang XH, Kleeman LK, Jiang HH, Gordon G, Goldman JE, Berry G, Herman B and Levine B Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol* 1998; **72**: 8586-8596.

35. Qin XF, An DS, Chen IS and Baltimore D Inhibiting HIV-1 infection in human T cells by lentiviral-mediated delivery of small interfering RNA against CCR5. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 183-188
36. Niemann A, Baltes J and Elsässer HP Fluorescence Properties and Staining Behavior of Monodansylpentane, a Structural Homologue of the Lysosomotropic Agent Monodansylcadaverine. *J Histo Cytochem* 2001; **49**: 177-185

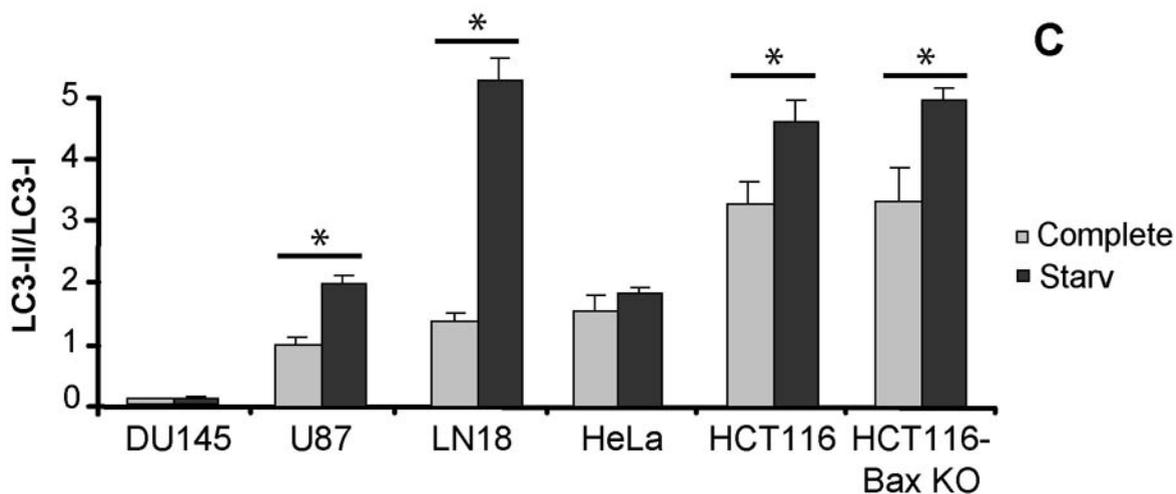
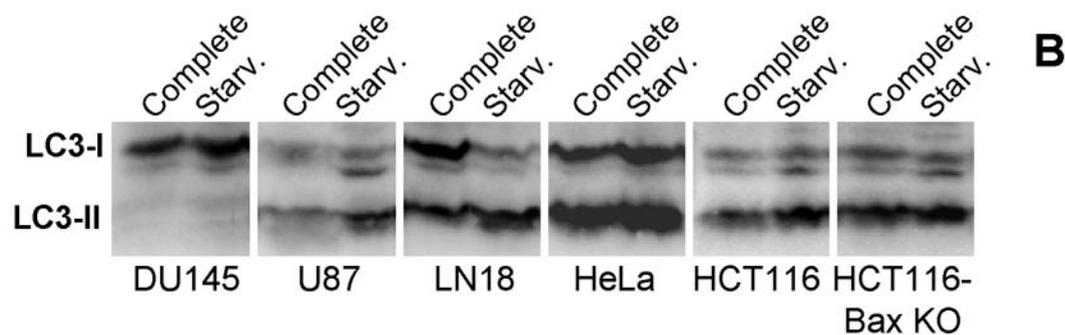
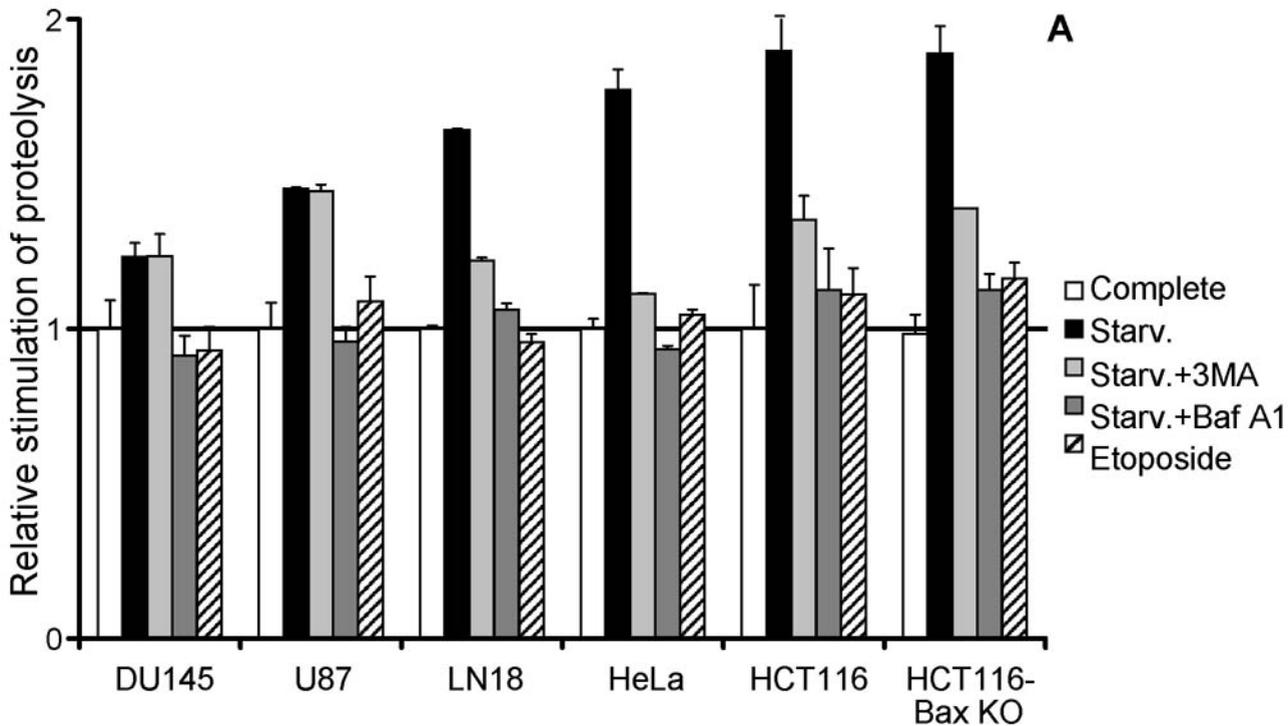
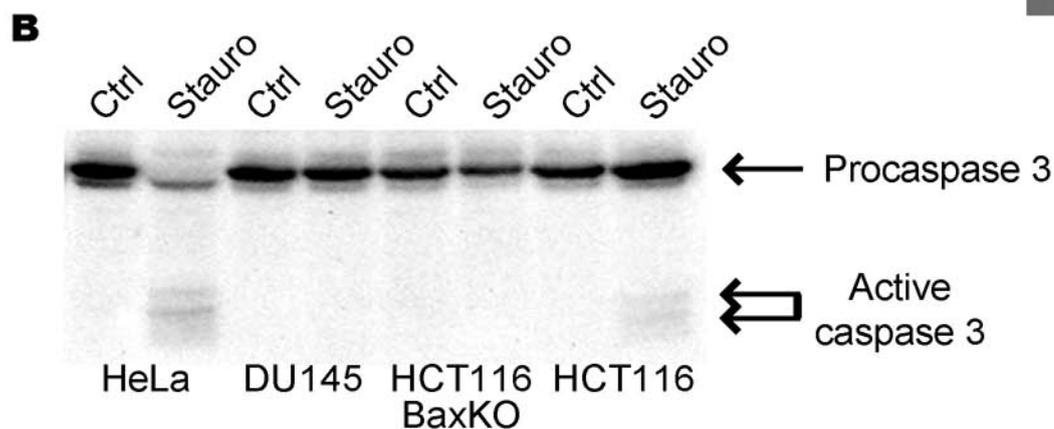
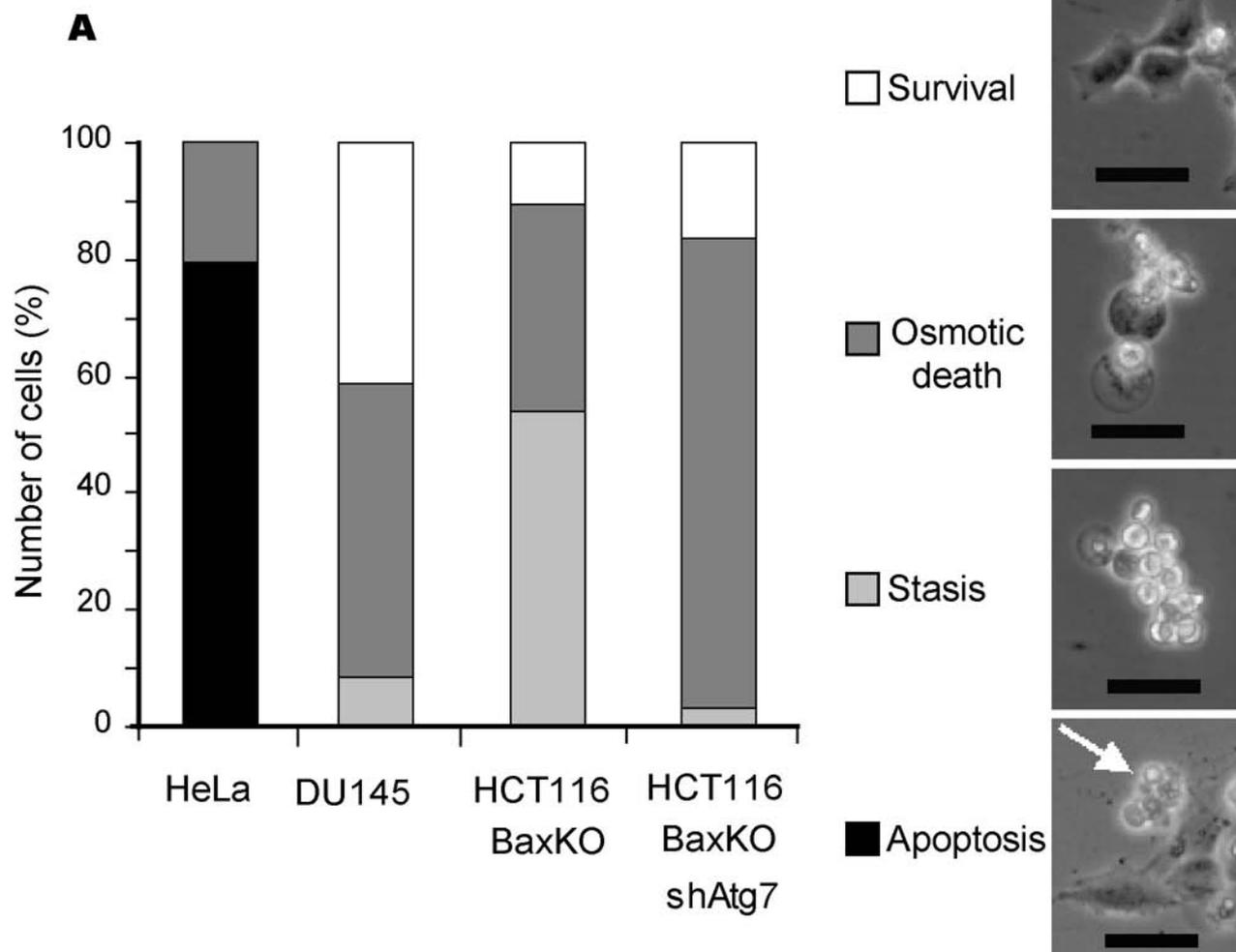


FIGURE 1



C

	% PI excluding cells		
	0h	24h	48h
Starv	100	95,4 ± 3,1	96,0 ± 1,4
Starv + 3-MA	100	92,5 ± 2,1	81,6 ± 1,5

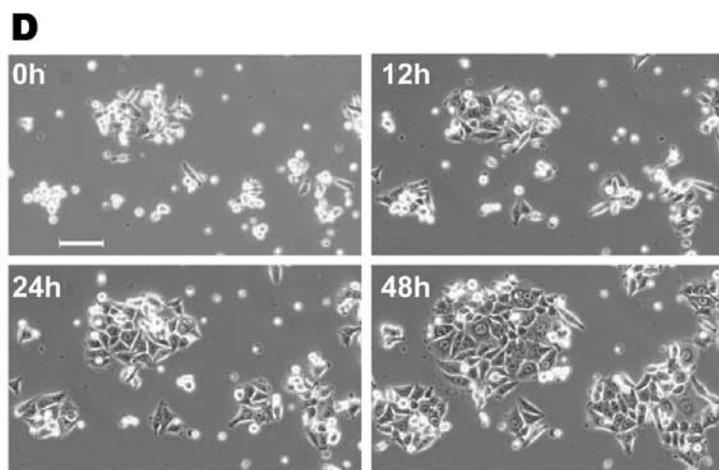


FIGURE 2

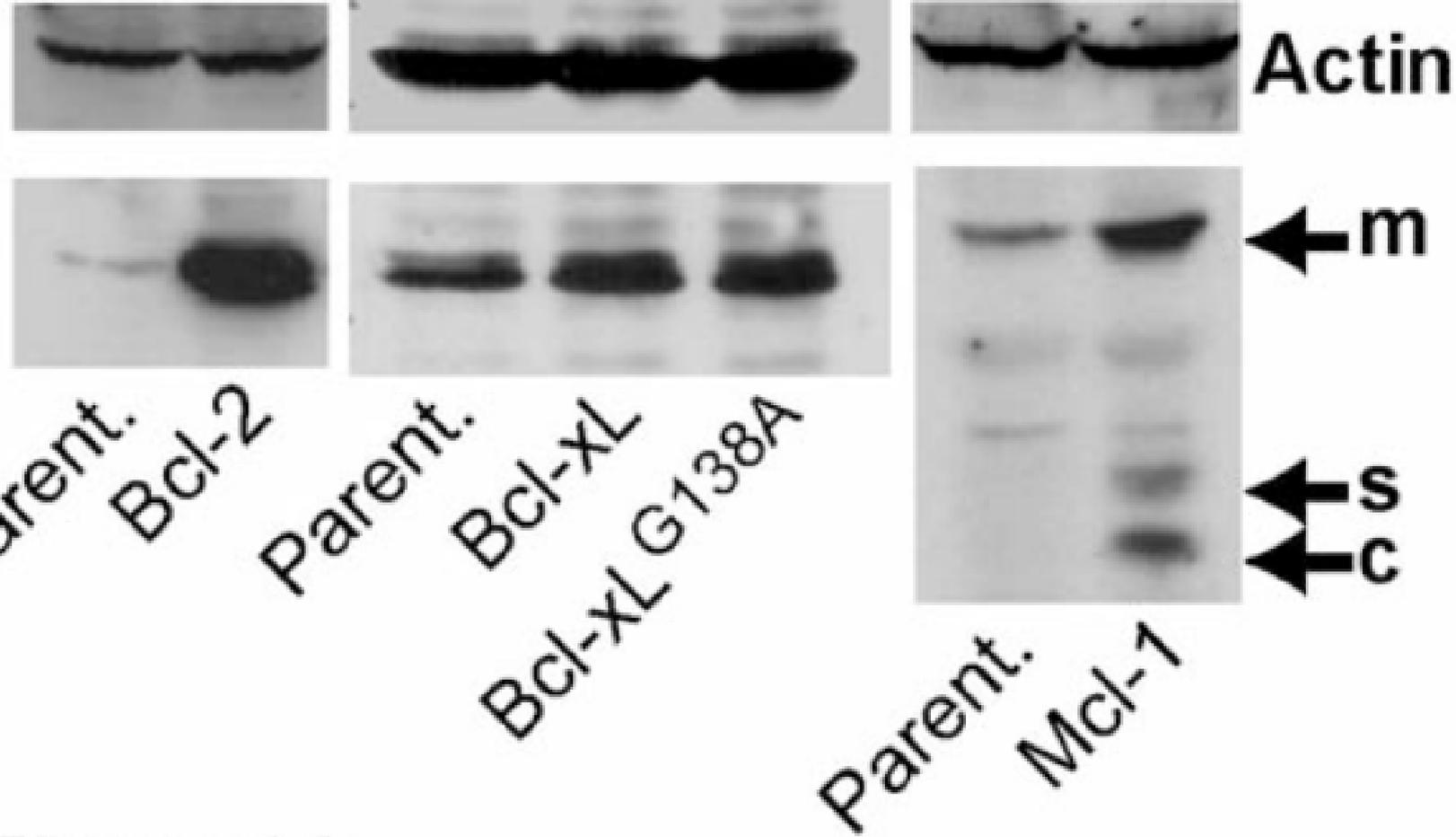


Figure 3A

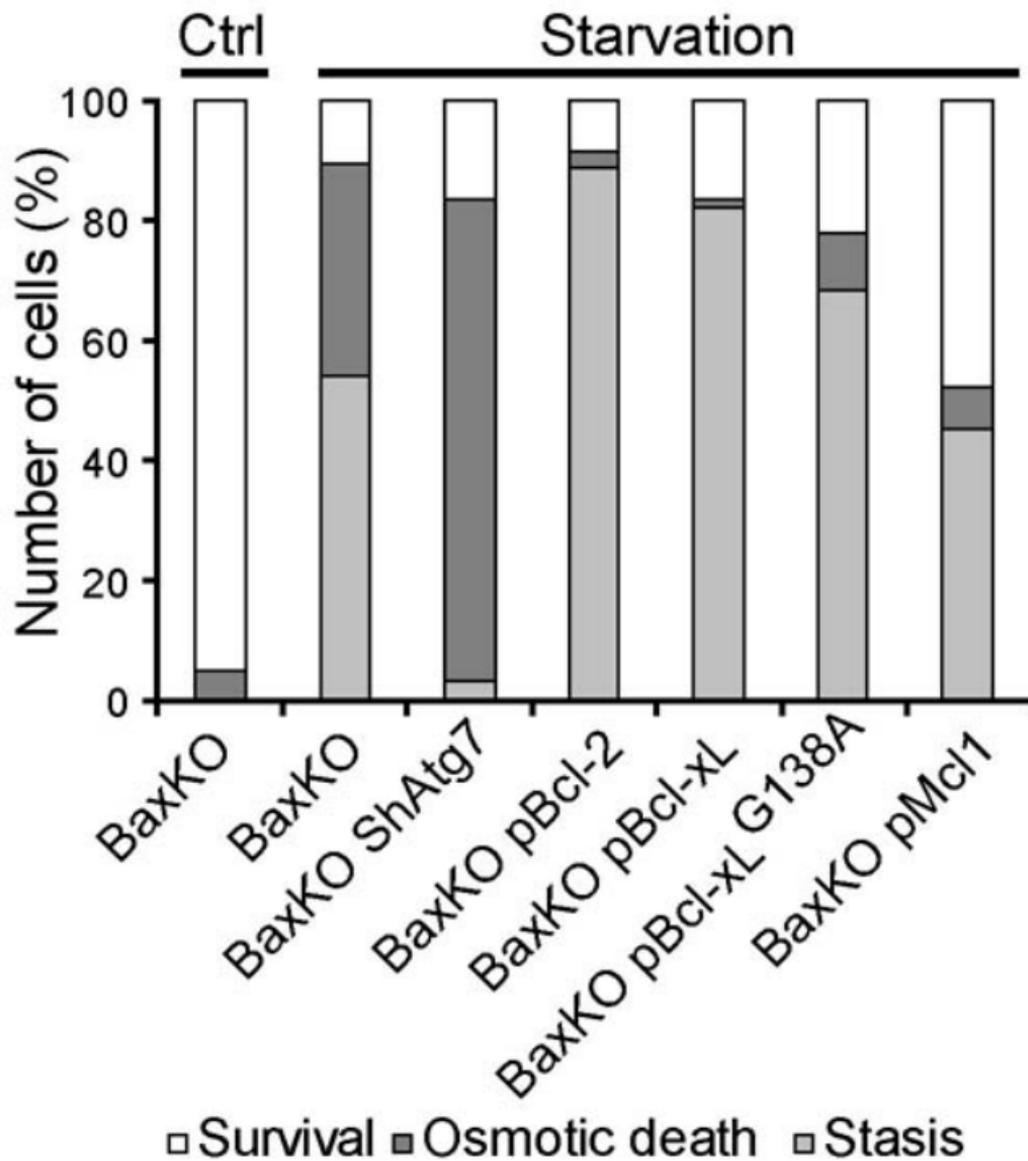


FIGURE 3B

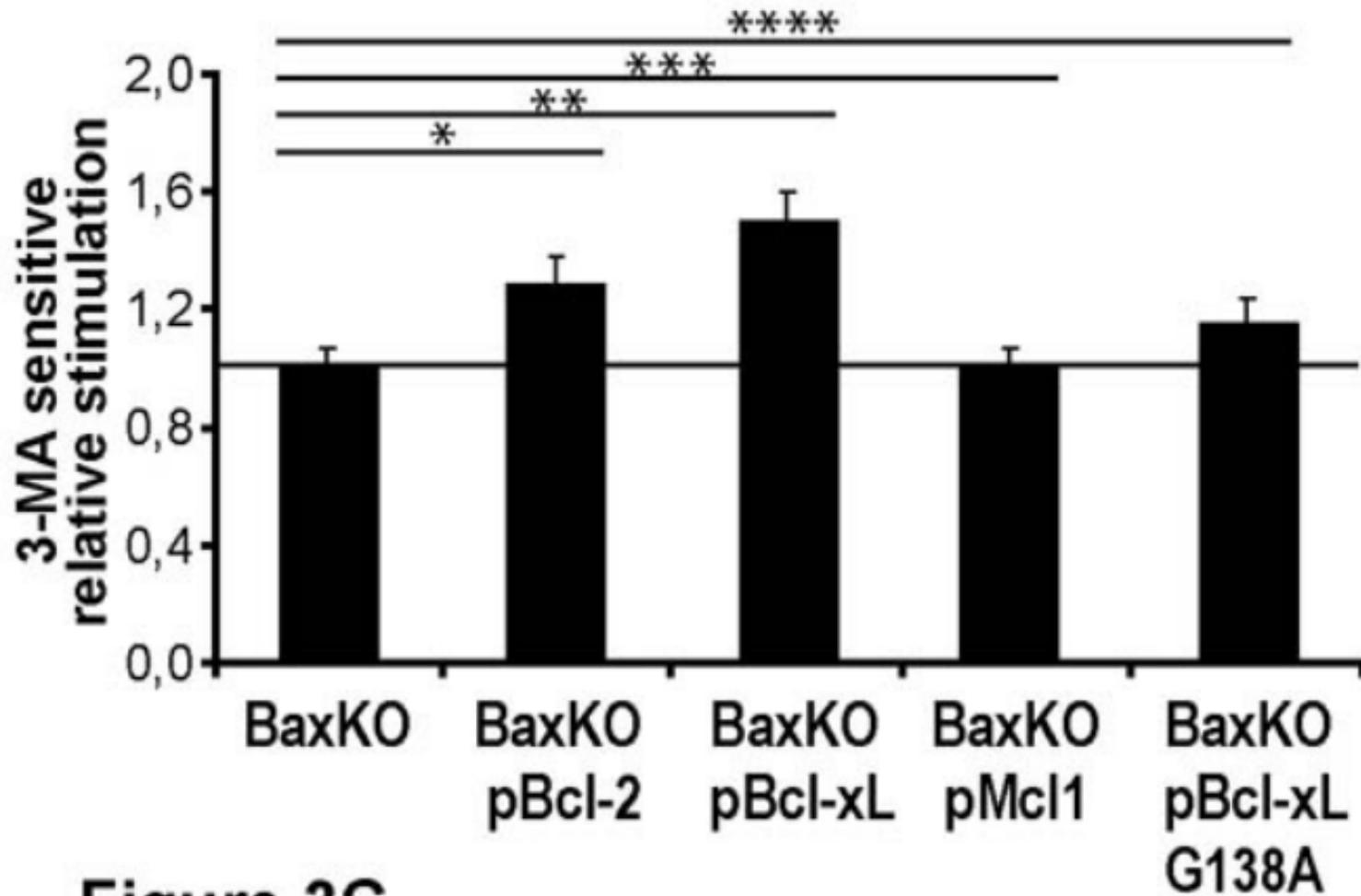


Figure 3C

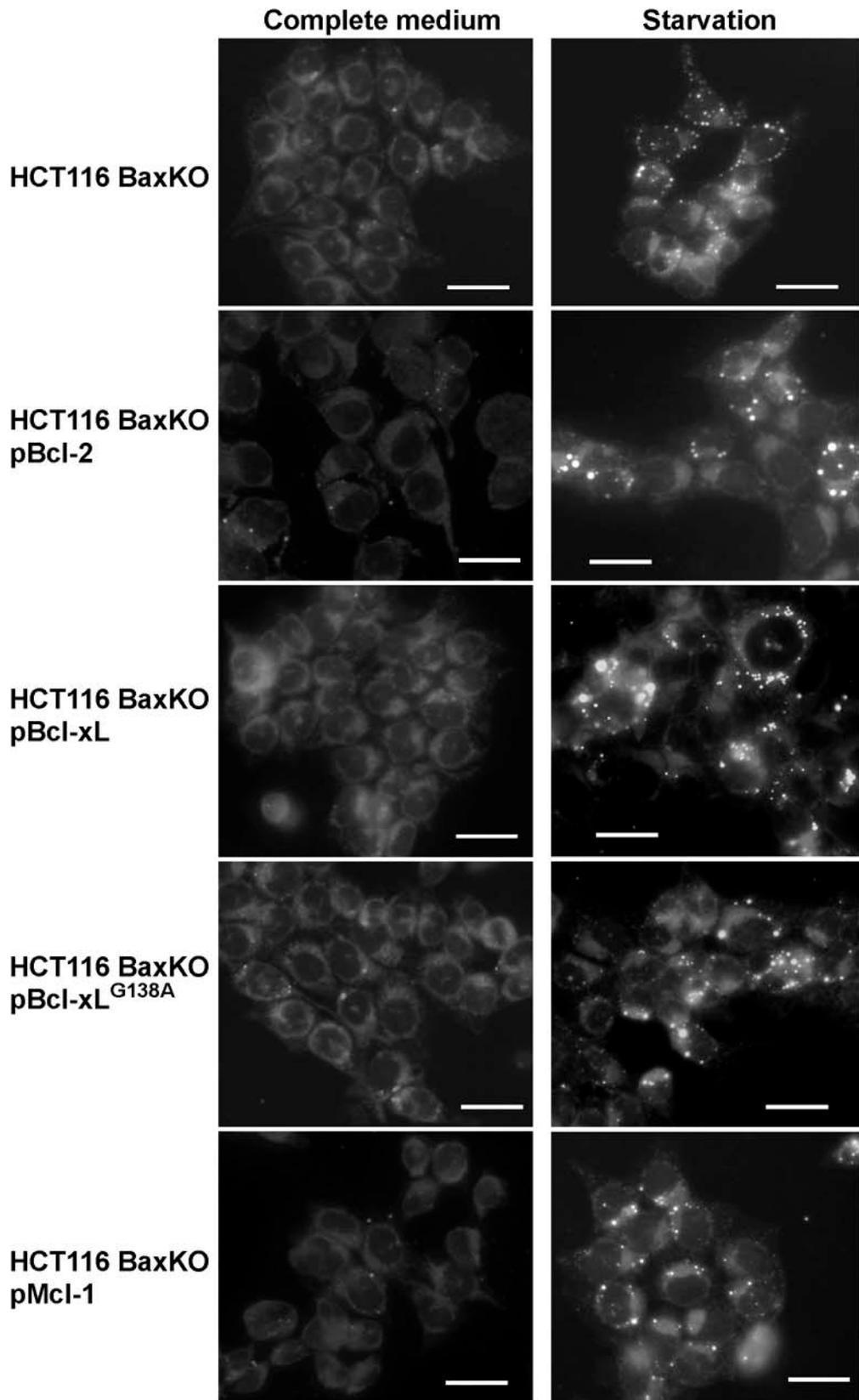
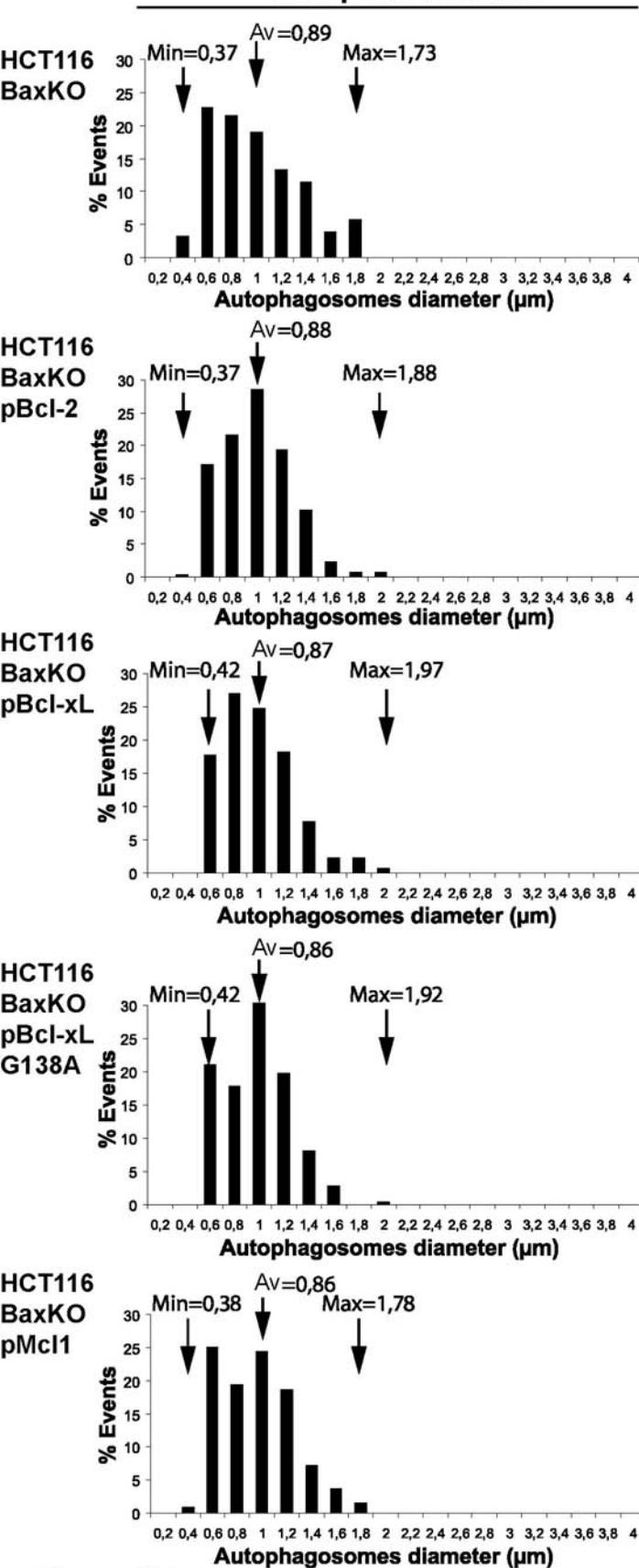


Figure 3D

Complete medium



Starvation

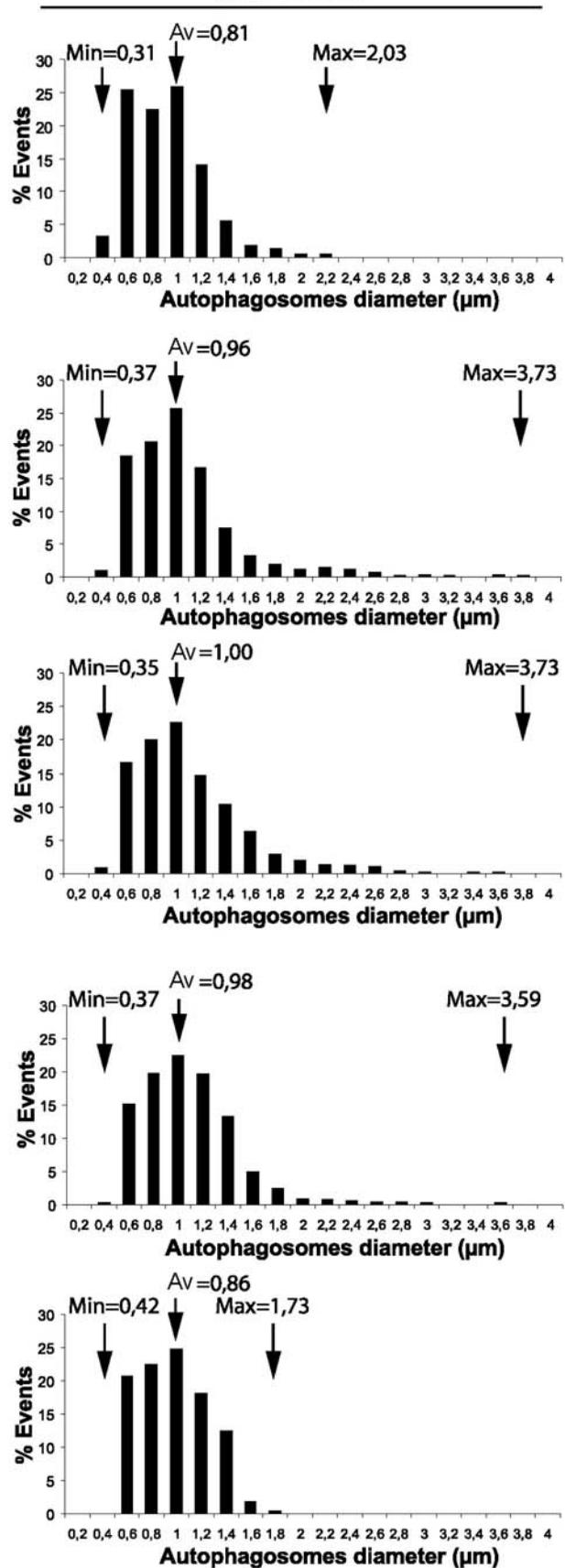


Figure 3E

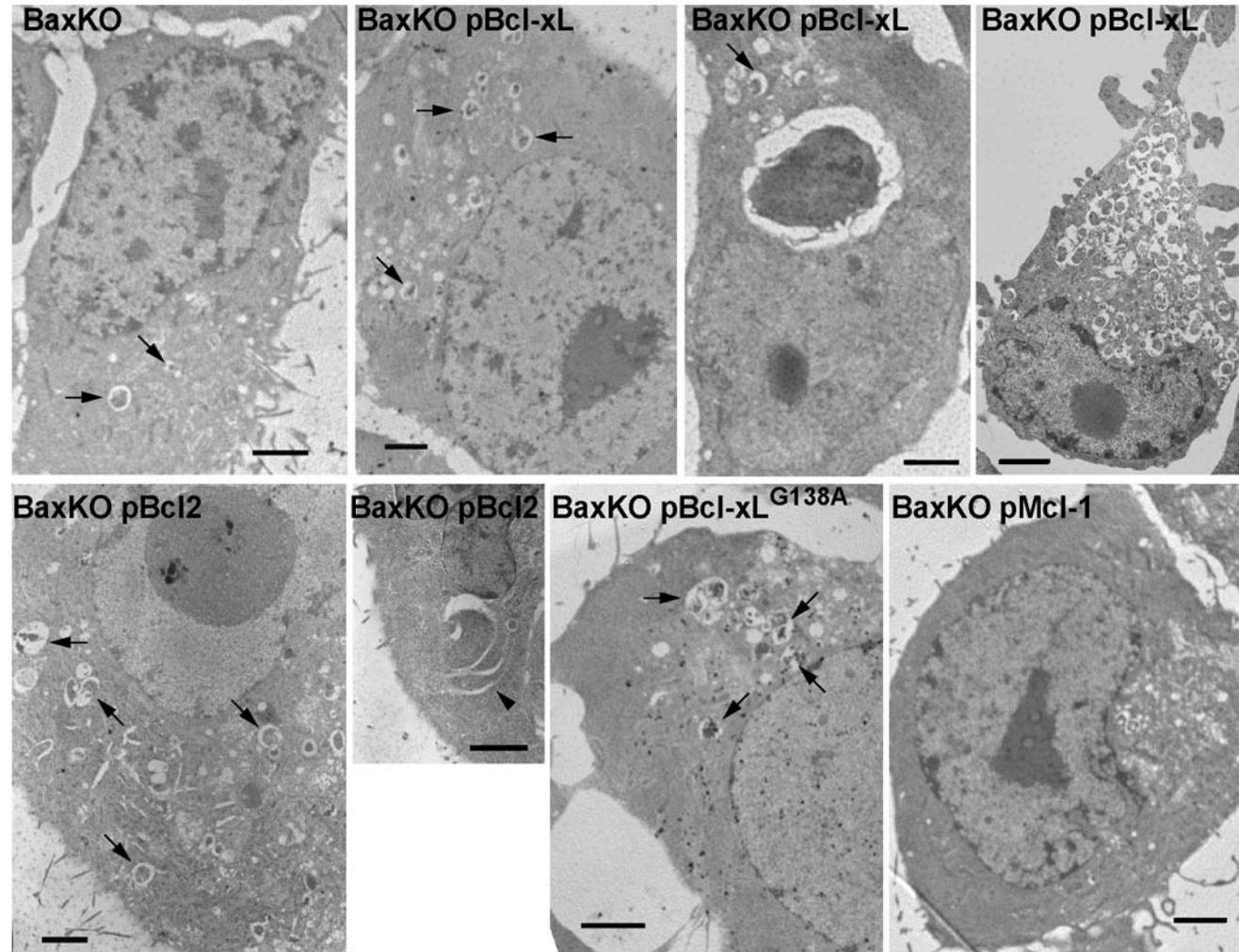


Figure 3F

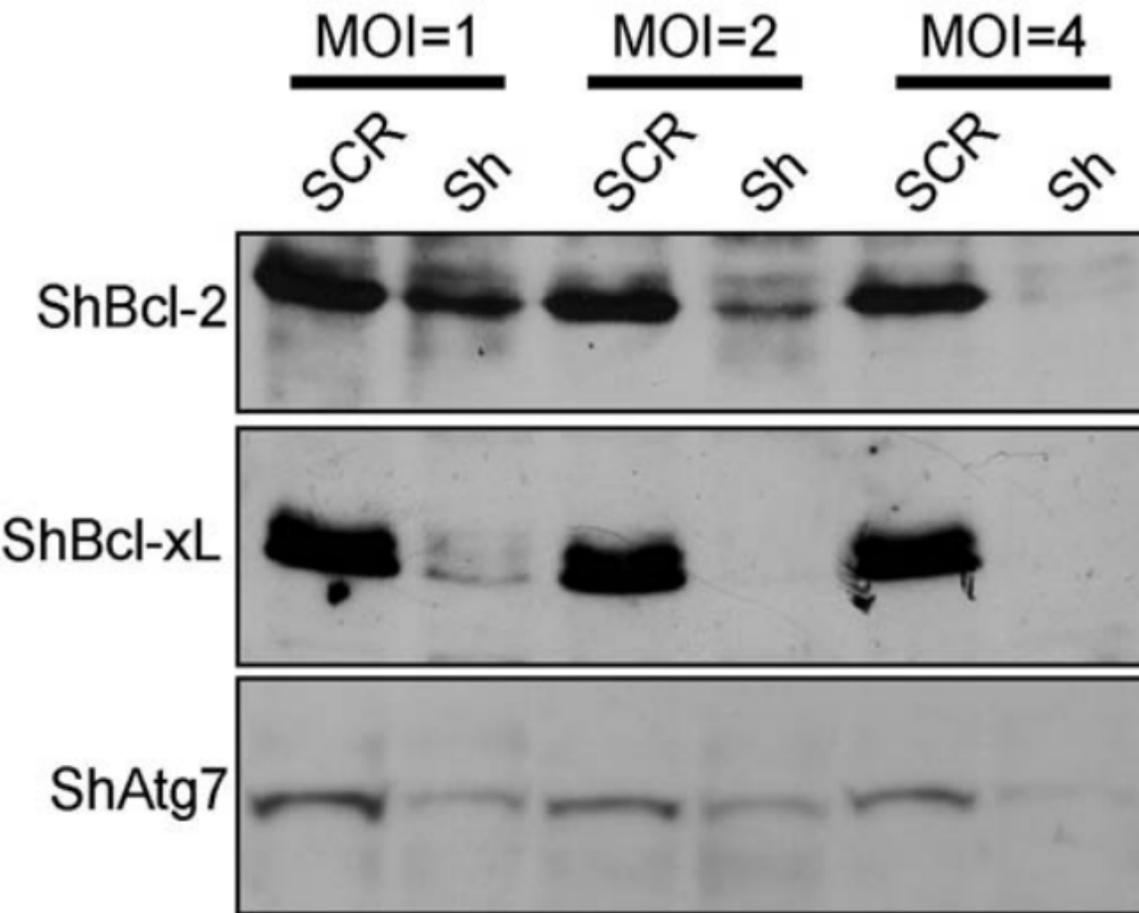


Figure 4A

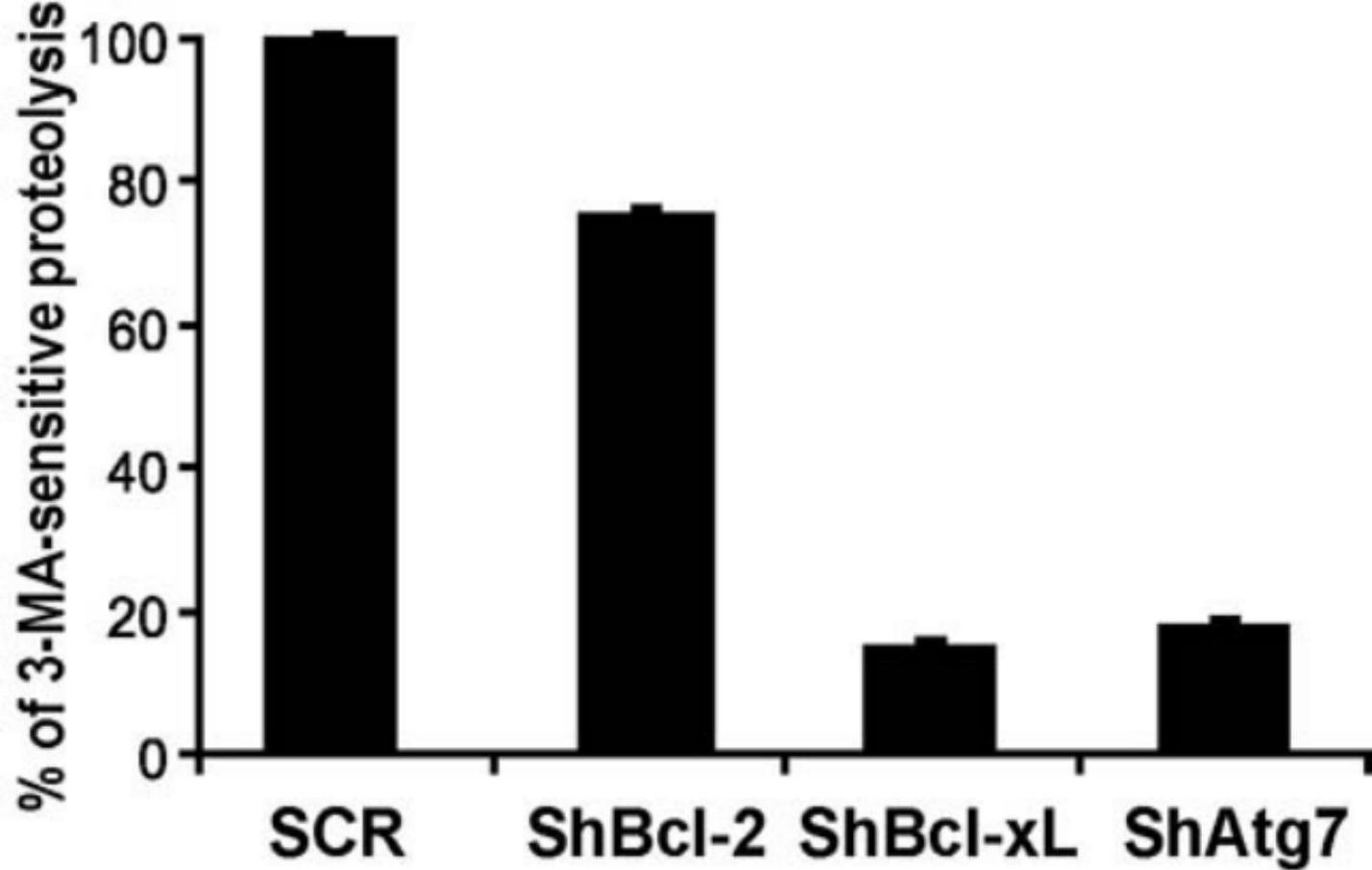
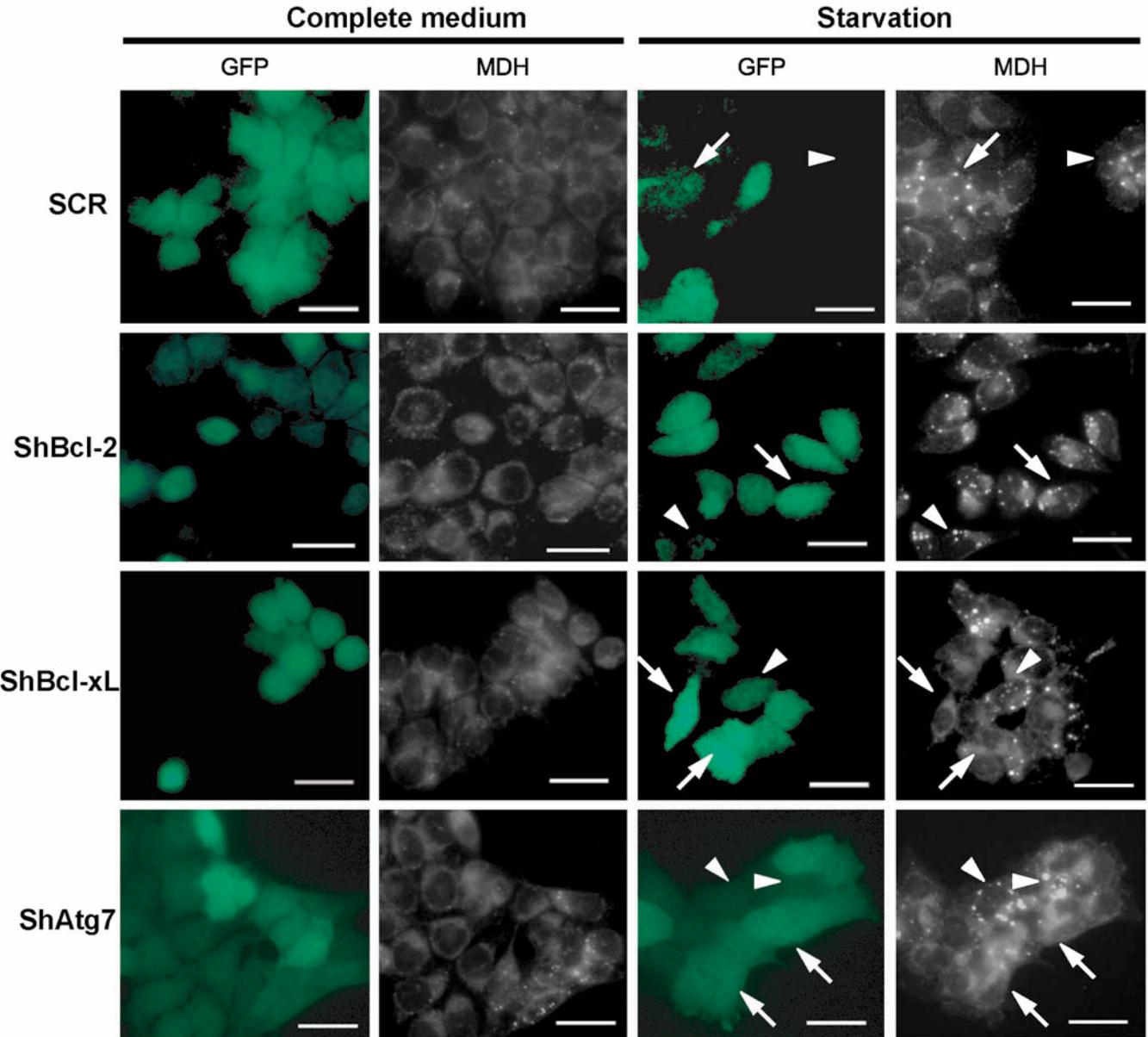


Figure 4B



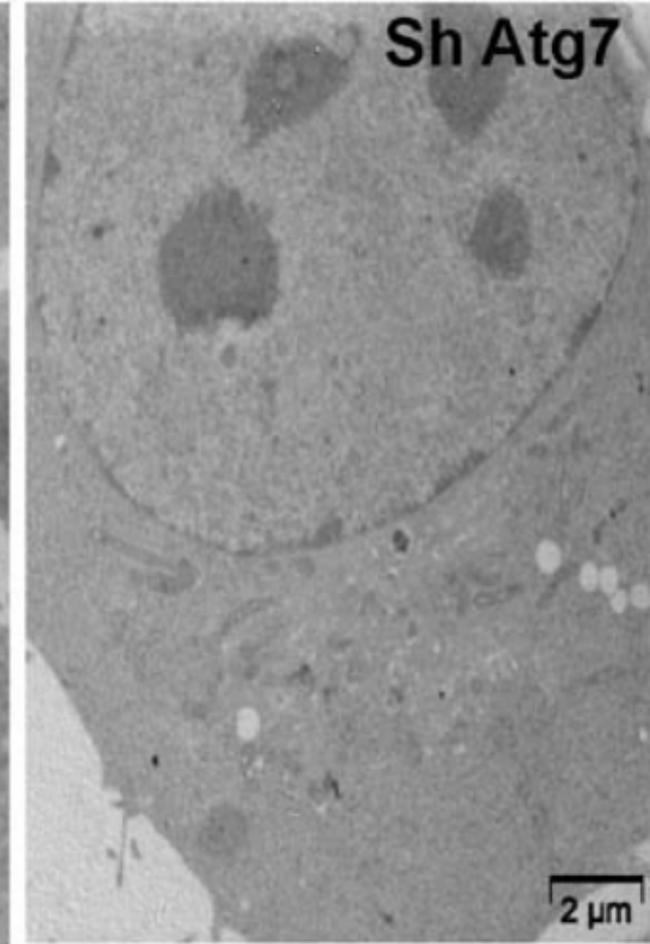
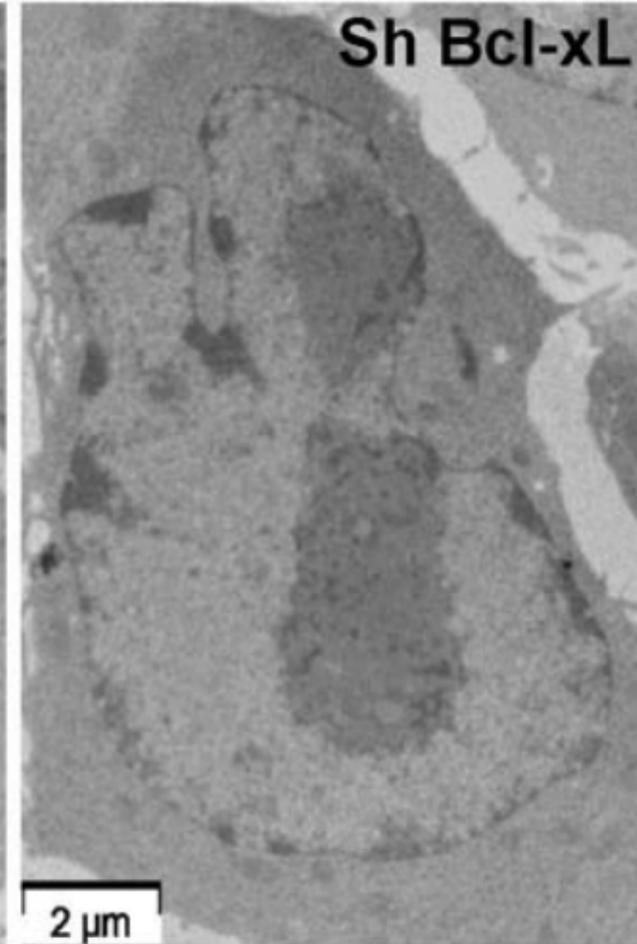
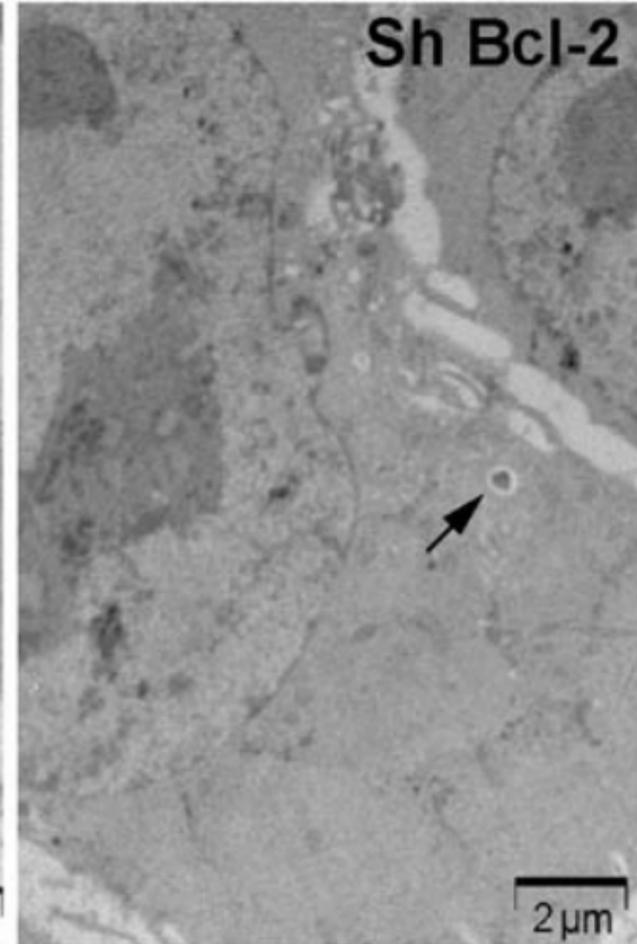
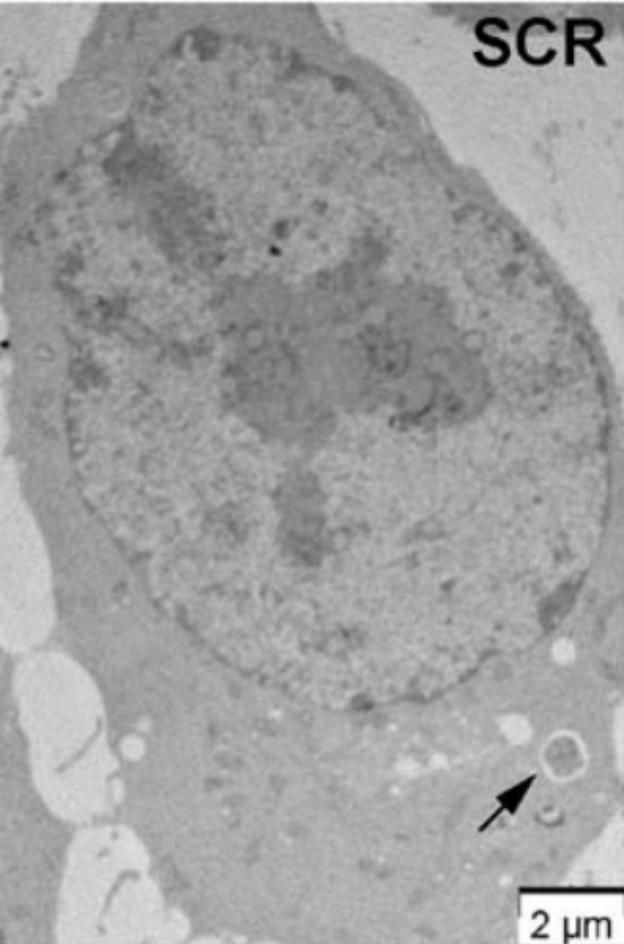


Figure 4D

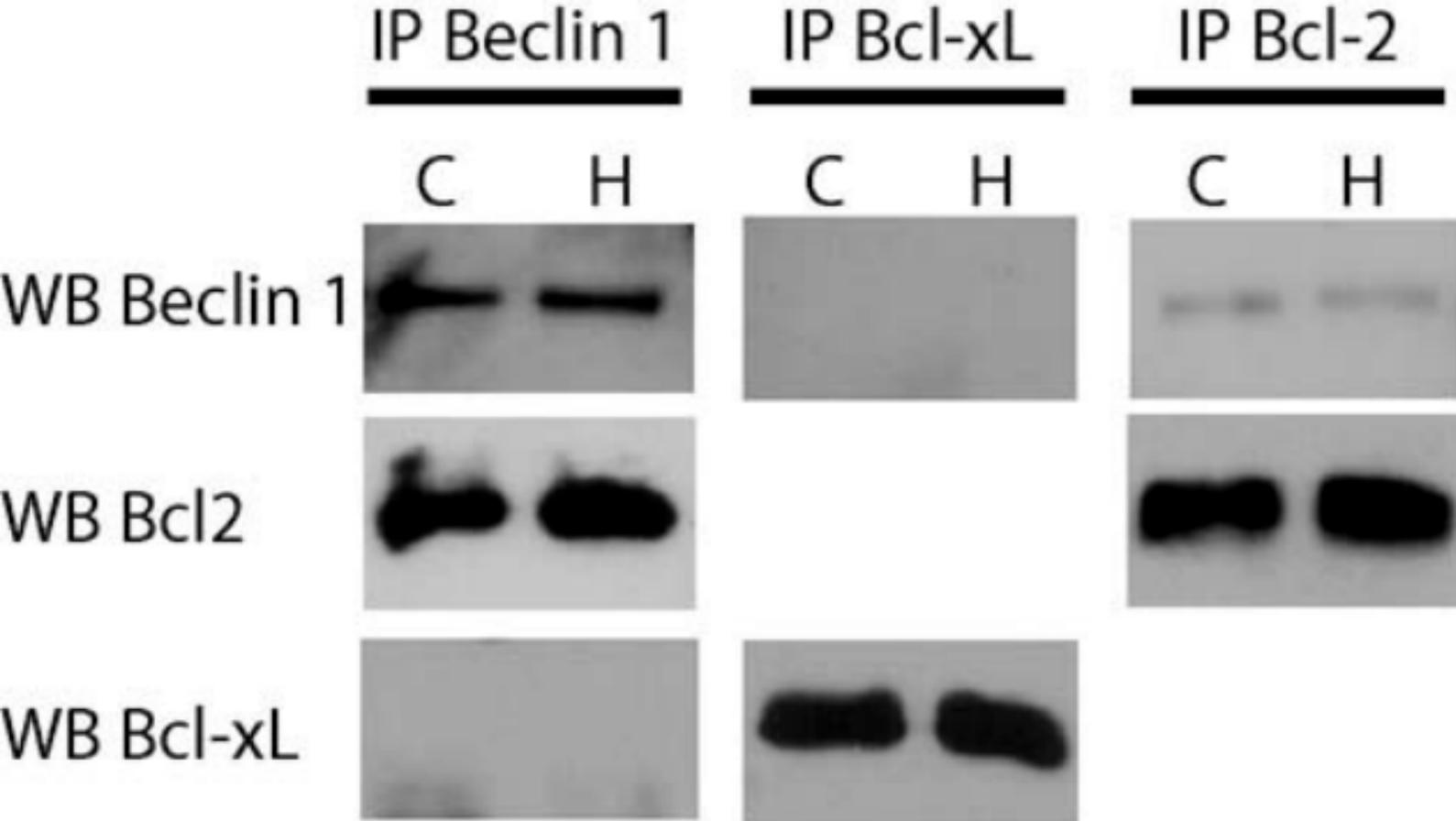


Figure 5A

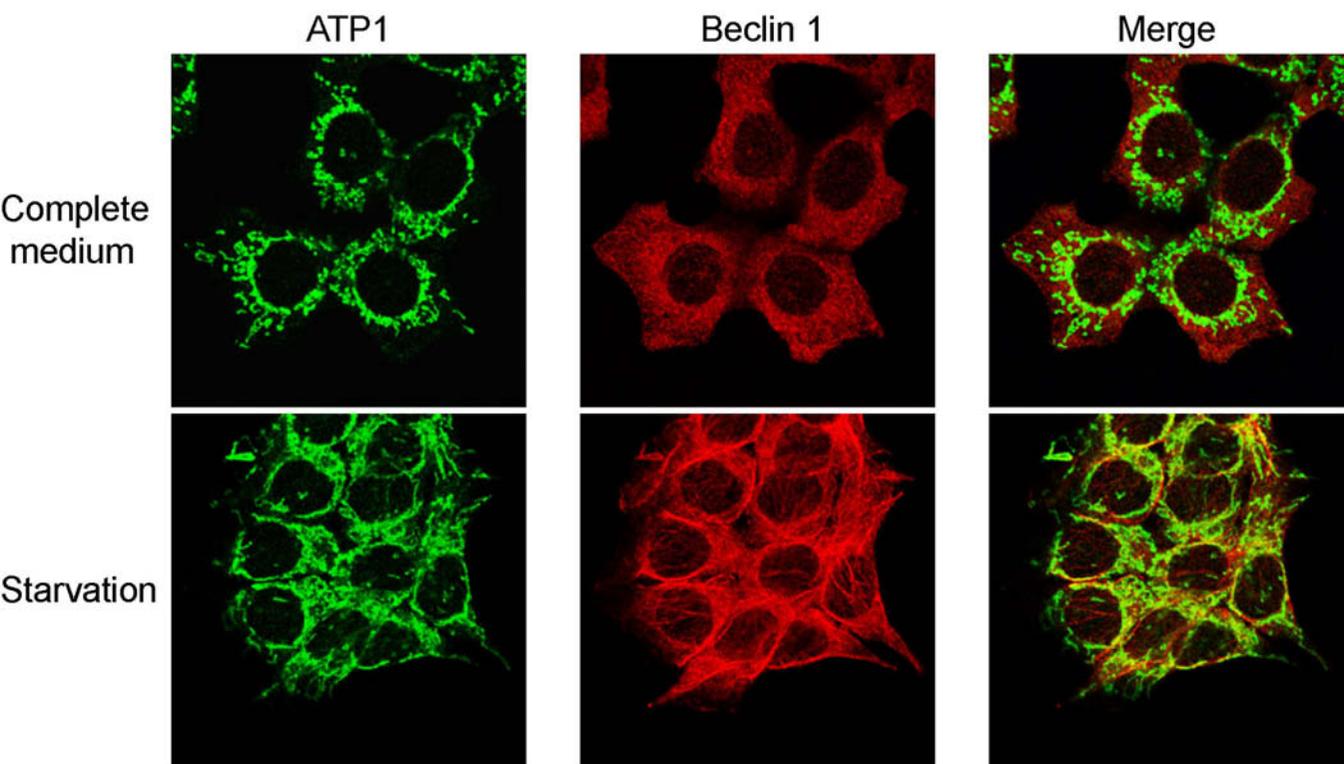
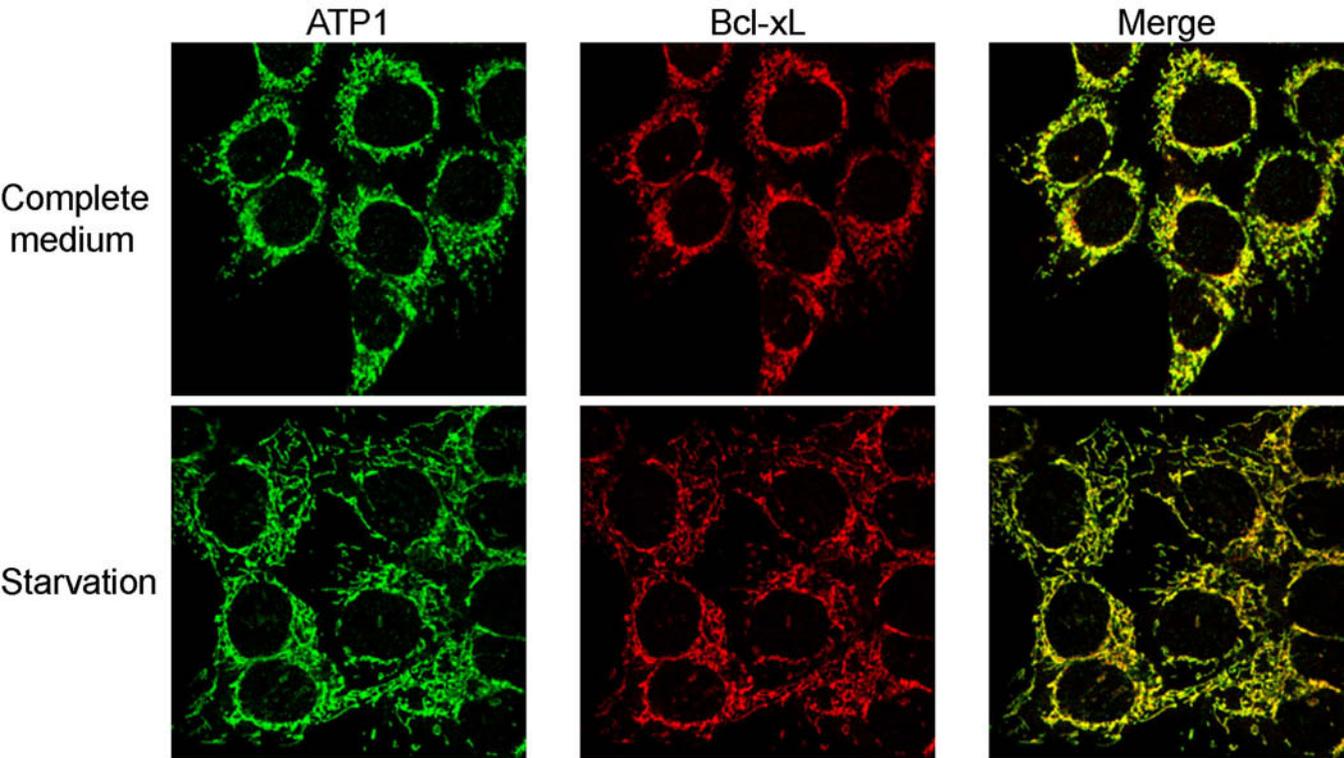


Figure 5B

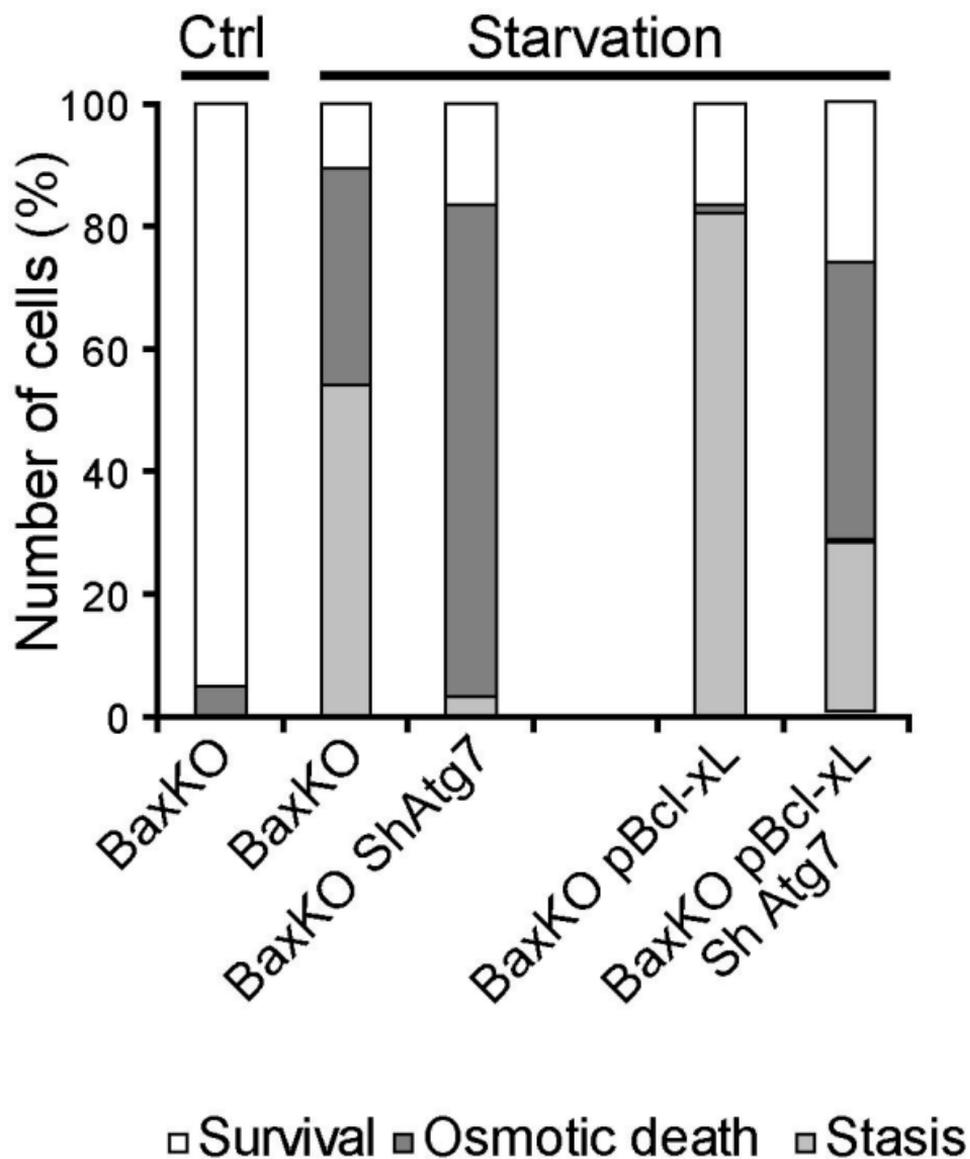


FIGURE S1

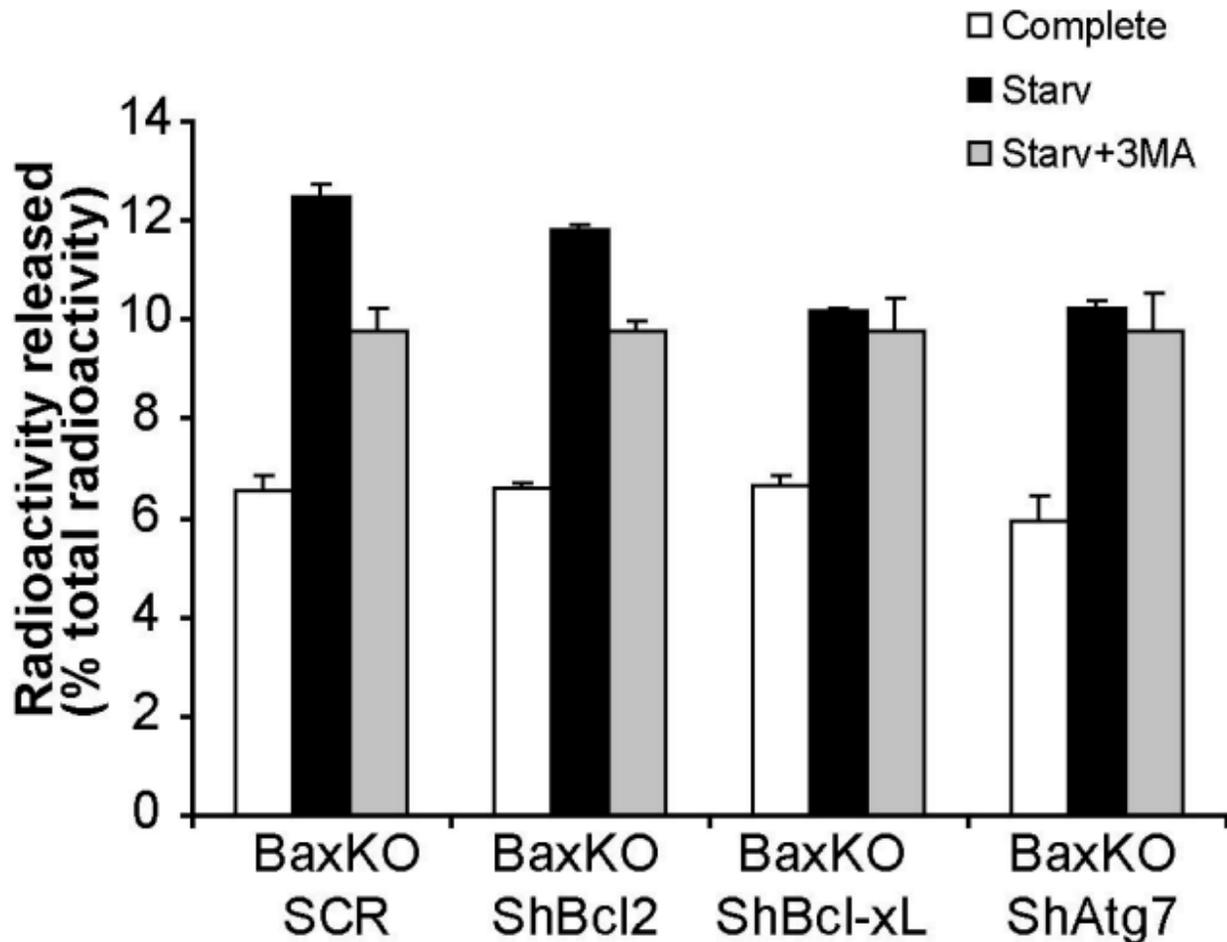


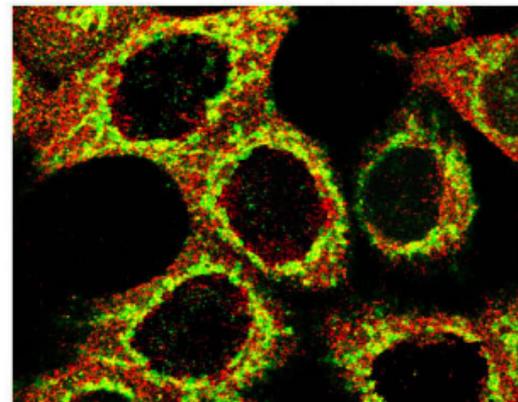
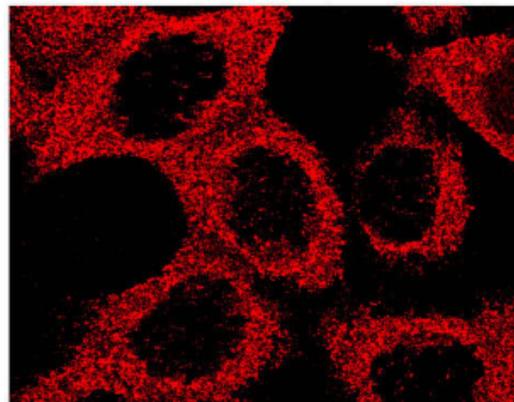
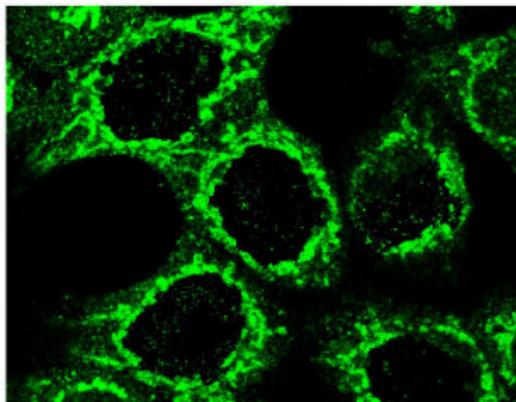
Figure S2

Bcl-xL

Beclin 1

Merge

Complete
medium



Starvation

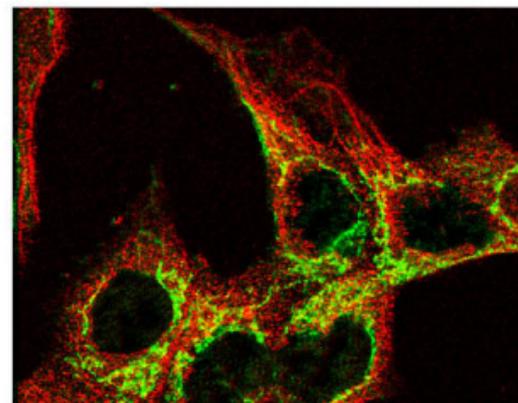
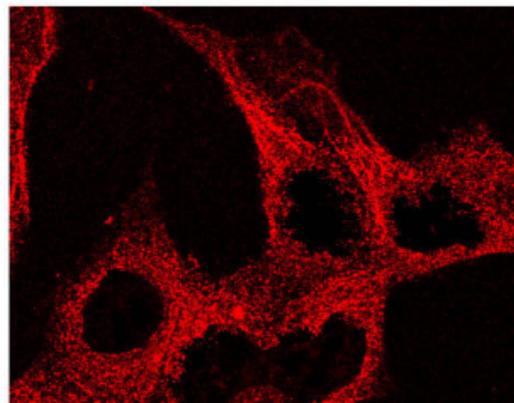
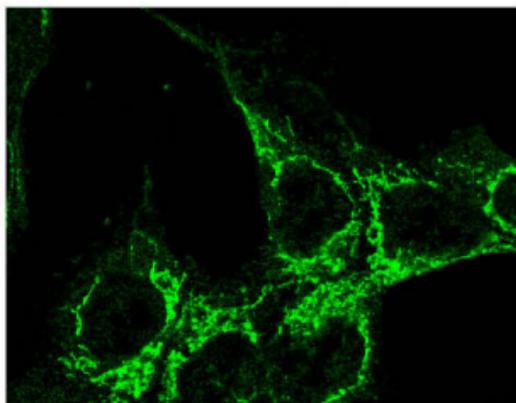


Figure S3

II. Régulation de l'autophagie induite par une carence nutritive par le facteur de transcription HIF-1 α et sa cible BNIP3

2.1. Etude transcriptionnelle de la réponse à une carence nutritive

2.1.1. La carence nutritive semble induire une réponse de type hypoxique en plus de la réponse autophagique

Afin d'identifier de nouveaux régulateurs de l'autophagie, nous avons soumis trois lignées cellulaires à deux traitements induisant l'autophagie : soit à une carence nutritive, soit à l'inhibition de mTOR par la rapamycine à 400 nM. Ces trois lignées présentent une réponse différente face à une carence nutritive : les HCT116 Bax^{-/-} et les U87-MG présentent une augmentation de leur capacité autophagique plus forte que les Du145 qui ne sont presque pas stimulables (cf. Priault *et al.*). Ces lignées ont été soumises à ces deux traitements pendant 9 h, temps au bout duquel le phénomène observé correspond exclusivement à de l'autophagie.

Après extraction des ARN totaux et marquage de l'ADNc par des nucléotides couplés à la fluorescéine, les ADNc ont été hybridés sur des cancéropuces (IFR 26). Les cancéropuces sont des puces à ADN qui ont été créées par rapport aux demandes des différents acteurs du cancérôpôle (cf. *Figure 24*).

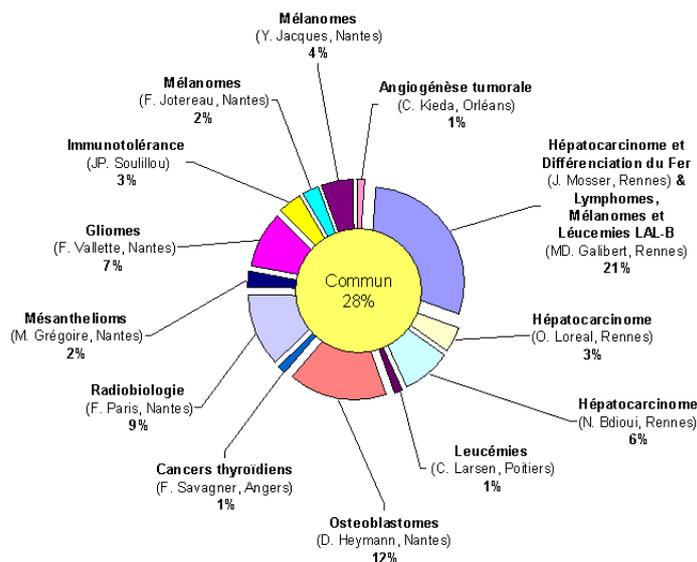


Figure 24 : Répartition des différents gènes représentés sur les cancéropuces de l'IFR 26.

Après analyse des données, sont indiqués dans le *tableau 7*, le nombre de gènes validés par rapport au total des gènes représentés sur les puces à ADN. A l'except des cellules HCT116 soumises à une carence nutritive, plus de 55 % des gènes présents ont pu être analysés par la suite (cf. *tableau 7*). Par ailleurs, il est intéressant de remarquer que les variations de transcriptome de la lignée HCT116 soumise à une carence nutritive sont les plus fortes par rapport aux autres lignées et au traitement à la rapamycine, les HCT116 présentant également la plus forte réponse autophagique.

Lignée et traitement	% de gènes validés	% de gènes sur-exprimés (>1)	% de gènes sous-exprimés (<-1)
HCT116 EBSS	48	2,32	5,07
HCT116 Rapamycine	55	0,33	2,08
U87-MG EBSS	58	0,44	4,51
U87-MG Rapamycine	56	0,09	0,88
DU145 EBSS	71	0,17	1,54

Tableau 7 : Pourcentage de gènes validés, de gènes sur- et sous-exprimés dans les cancéropuces selon la lignée et le traitement (seuils fixés arbitrairement).

La carence nutritive induit de plus fortes modifications de l'expression des gènes dans les lignées capables d'entrer en autophagie (HCT116 et U87-MG) par rapport à un traitement à la rapamycine (cf. *tableau 7*).

La représentation sous la forme d'un arbre (*Treeview*) classant les résultant selon des niveaux de hiérarchisation (traitement, famille de gènes) permet de mettre en évidence une réponse globale très spécifique de la lignée et très différente entre les HCT116 et les U87-MG. Il y a peu de différence en fonction du traitement suivi, EBSS ou rapamycine (cf. *Figure 25*).

1 2 3 4

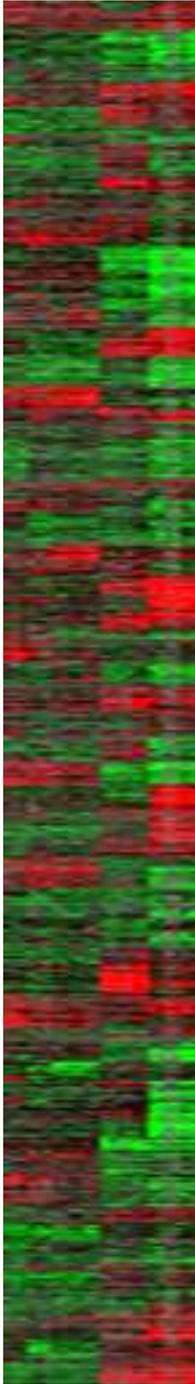


Figure 25 : Représentation schématique des résultats des puces à ADN.

En vert, sont représentés les gènes sous-exprimés ; en rouge, les gènes sur-exprimés. 1, U87-MG cultivées en présence de rapamycine ; 2, U87-MG en présence d'EBSS; 3, HCT116 Bax^{-/-} en présence de rapamycine ; 4, HCT116 Bax^{-/-} en présence d'EBSS.

➤ Etude des gènes impliqués dans l'autophagie

Une analyse par famille a également été réalisée. Comme déjà décrit chez la Levure (Kirisako *et al.*, 1999), une sur-expression d'*Atg8/LC3* est retrouvée uniquement lors de la carence nutritive dans les trois lignées étudiées (cf. *tableau 8*).

Bnip3 et *Bnip3l* sont également sur-exprimés respectivement dans les U87-MG et les D145 lors de la carence nutritive, *Bnip3* et *Bnip3l* ayant déjà été décrits comme sur-exprimés suite à un traitement à l'arsenic dans des cellules cancéreuses gliales, traitement induisant une autophagie de mort (Kanzawa *et al.*, 2005). *Pten* est sur-exprimé dans les HCT116 et les U87-MG, la phosphatase PTEN participant à l'inhibition de la voie d'Akt et des PI3-Kinases aboutissant à une inhibition de mTOR lors d'une carence en facteur de croissance. Par ailleurs, l'expression de *Rheb* est également augmentée, *Rheb* étant essentielle à la régulation de mTOR.

Les sur-expressions des gènes précédemment cités si elles aboutissent à la sur-expression et l'activation de la protéine correspondante participent à différents niveaux au déclenchement de l'autophagie.

Gènes	HCT116		U87-MG		DU145
	EBSS	Rapamycine	EBSS	Rapamycine	EBSS
TOR	-0,11	0,34	0,06	0,2	-0,12
TSC2	-0,545	-0,27	-0,21	-0,185	-0,16
RHEB	1,44		0,52		
PTEN	1,13		0,67		0,56
AMPK α 2					0,15
AMPK β 1			NaN		-0,07
AMPK β 2	0,4	0,47	0,22	0,22	0,01
AMPK α		-0,02	0,09	-0,05	-0,08
AMPK γ	-0,54	-0,18	0,01	-0,12	0,04
AMPK s.u. régulatrice 1 α	0,04	0,16	0,14	0,19	0,17
AMPK s.u. régulatrice 1 β	-0,5	-0,18	-0,27	-0,14	-0,14
AMPK s.u. régulatrice 2 α	0,28	0,63	0,09		0,08
AKT1	-0,33	-0,31	-0,19	-0,23	-0,22
AKT2	0,19	-0,05	-0,05	-0,02	-0,08
P101-PI3-Kinases	-0,22	-0,01	0,36	0,01	-0,14
APG12L	-0,32	0,33			
ATG4B	-0,3	-0,4	-0,13	-0,26	-0,1
ATG5L	-0,3				
LC3/Atg8	1,26	-0,13		0,04	1,22
BNIP3L					0,68
BNIP3			1,09	0,68	-0,11
LAMP1	0,06	-0,3	-0,25	-0,28	-0,14
LAMP2		-0,07		0,13	-0,25
LAMP3	-0,25	-0,16	0	0,06	0,07

Tableau 8 : Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la régulation ou le déroulement de l'autophagie. En rouge, sont indiquées les sur-expressions ; en grisé, absence de valeur statistiquement significative par manque de données analysables (NaN ou V) ou à cause d'un coefficient de variation trop fort (>20).

➤ Etude des gènes impliqués dans l'apoptose

Afin d'étudier les connexions entre autophagie et apoptose, en particulier le rôle des protéines de la famille de Bcl-2, les variations d'expression de ces partenaires ont été analysées (cf. *tableau 9*). Alors qu'aucune variation de l'expression de *Bcl-2* et *Bcl-xL* ne peut être mise en évidence, une forte sur-expression de l'ARNm codant la protéine anti-apoptotique Mcl-1 dans presque toutes les conditions (sauf U87-MG/EBSS) est observée. Ces résultats nous ont alors poussé à étudier le rôle de Mcl-1 dans l'autophagie. Elle ne semble pas directement impliquée dans la régulation de l'autophagie mais sa sur-expression permettrait de favoriser la survie cellulaire (Priault *et al.*).

La sur-expression de *Noxa* est forte dans les Du145 placées en carence nutritive ce qui pourrait sensibiliser davantage ces cellules à l'apoptose si elles possédaient la protéine Bax. Il est intéressant de noter que *Noxa*, comme *Bnip3* et *Bnip3l*, peut être induite par des conditions hypoxiques car ces gènes possèdent un élément de réponse à l'hypoxie (HRE) dans leur promoteur (Guo *et al.*, 2001; Kim *et al.*, 2004).

Aucune variation significative de l'expression des caspases et des autres protéines de la famille de Bcl-2 n'est à remarquer.

Gènes	HCT116 Bax-/-		U87-MG		DU145
	EBSS	Rapamycine	EBSS	Rapamycine	EBSS
Bcl2	0,155	0,035	0,1	0	0,215
Bcl-xL	0,18	0,28	0,08	0,16	0,12
Mcl-1	2,08	0,8	0,31	0,8	1,62
Bad	-0,61	-0,54	-0,27		0
Bak	-0,47	-0,08	0,15	0,17	0,07
Bik		-0,07	-0,06		-0,08
Bim	-0,08	-0,04	0,03	0,1	0,1
BMF	-0,06	0	-0,04	-0,12	-0,13
BOK	-0,57	-0,2	-0,28	-0,04	-0,14
Harakiri	-0,53	-0,54	-0,17	-0,29	-0,16
MOAP1	0,29	0,23	0,2	0,33	0,4
BCL2-like 10	-0,34	-0,26	-0,34	-0,27	-0,01
BCL2-like 12	-0,56	-0,25	0	0,12	-0,02
BCL2-like 13	0,04	-0,04	0,08	0,1	0,19
BCL2-like 14			-0,36		
BCL2-associated transcription factor 1		0,9		0,76	0,52
Noxa	0,49	-0,18		-0,11	2,17
Puma		-0,2	-0,34		-0,14
Caspase 1	-0,14	-0,1	0,2	0	0
Caspase 2		0,195			-0,38
Caspase 4	0,15	0,03	0,38	0,17	0,05
Caspase 5			-0,08		-0,08
Caspase 6					-0,49
Caspase 7		0,02			-0,35
Caspase8					-0,10667
Caspase 9					-0,05
Caspase 10	-0,16	0,03	-0,03	-0,09	-0,24
Caspase 13	-0,03		0,1		-0,02

Tableau 9 : Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la régulation ou le déroulement de l'apoptose. En rouge, sont indiquées les sur-expressions ; en grisé, absence de valeurs statistiquement significatives par manque de données analysables (NaN ou V) ou à cause d'un coefficient de variation trop fort (>20).

➤ Etude des gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie

Comme *Bnip3*, *Bnip3L* et *Noxa* sont sur-exprimées et que *Vegf* l'est également fortement dans nos différentes lignées lors d'une carence nutritive, nous nous sommes alors intéressés de plus près aux gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie (cf. *tableau 10*). Lors d'une carence en sérum et en acides aminés, on trouve une sur-expression d'*Hif-1 α* , de *Vegf*, de l'*Enolase*, du récepteur à l'EGF *Egfr*, du récepteur au glucose *Glut-1* ;gènes déjà décrits sur-exprimés lors de la réponse à l'hypoxie (Harris, 2002). A l'exception de l'*egfr* pour lequel cela n'a pas été démontré, tous ces gènes sont des cibles d'HIF-1 α possédant un HRE. Cette réponse de type hypoxique est plus marquée dans les HCT116 Bax^{-/-}.

Les gènes impliqués dans la régulation de la stabilité d'HIF-1 α (HIF-1 α sous-unité inhibitrice, PH-4, PSMA7, Elongine C et VBP) ne présentent pas de variation significative de leur expression (Harris, 2002).

Afin de valider la réponse de type hypoxique observée lors d'une carence nutritive, la sur-expression de ces gènes a été analysée par PCR quantitative en temps réel et comparée avec la réponse induite par l'hypoxie.

Gènes	HCT116 Bax-/-		U87-MG		Du145
	EBSS	RAPAMYCINE	EBSS	RAPAMYCINE	EBSS
HIF-1 α su inhibitrice	-0,33	0,33	0,45	0,5	0,32
HIF-1α	1,27	0,47	-0,35	0,27	0,105
HIF-1 β	-0,24	-0,06	0	0,06	-0,09
EP300	0	-0,12	-0,04	0,02	0,1
PH-4	-0,11	0,24	-0,04	0,22	0,05
PSMA7	0,06	0,09	-0,1	-0,14	-0,23
TXNDC5	-0,24	0,1		0,09	-0,12
Elongine C	0,47	0,44	0,02		0,14
VBP	-0,03	0,29			
VEGF-A	3,24	-0,46	1,36	0,15	0,96
BNIP3L					0,68
BNIP3			1,09	0,68	-0,11
Noxa	0,49	-0,18		-0,11	2,17
ENOLASE	1,185	0,5375	0,55	-0,355	-0,21
EGFR	1,29	0	0,055	-0,145	0,37
GLUT-1	1,77	-0,19	1,54	-0,64	-0,05

Tableau 10 : Analyse de l'expression de gènes impliqués dans la régulation ou le déroulement de l'autophagie. En rouge, sont indiquées les sur-expressions ; en grisé, absence de valeurs statistiquement significatives par manque de données analysables (NaN ou V) ou à cause d'un coefficient de variation trop fort (>20).

2.1.2. Etude comparative de l'effet d'une carence nutritive et d'une carence en oxygène sur certains gènes impliqués dans ces réponses

La réponse à l'hypoxie sévère et la réponse de type hypoxique induite lors d'une carence nutritive ont été étudiées en parallèle dans les HCT116 déficientes ou non pour Bax et dans les U87-MG suite aux résultats des puces à ADN.

➤ Etude de Atg8/LC3 dans des conditions de carence nutritive ou d'hypoxie sévère

Comme attendu et comme trouvé dans les cancéropuces, *Atg8* est sur-exprimé dans les trois lignées cellulaires soumises à une carence nutritive (cf. *Figure 27*). En effet, l'expression d'*Atg8* a déjà été montrée chez la Levure comme étant augmentée dans des conditions de stress nutritif, ATG8 participant à la formation des autophagosomes (Kirisako *et al.*, 1999). Cette sur-expression est très forte dans les U87-MG et est également présente dans des conditions d'hypoxie contrairement aux deux lignées d'HCT116. Cela pourrait s'expliquer grâce à la littérature récente qui relate qu'une diminution de la teneur en oxygène peut, *via* l'inhibition de mTOR, induire une réponse autophagique (Arsham *et al.*, 2003; Brugarolas *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006).

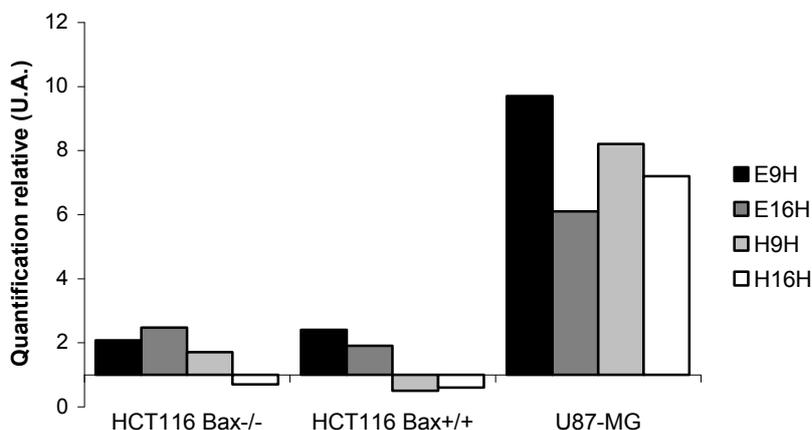


Figure 26 : Quantification relative de l'expression d'*Atg8/LC3* par Q-PCR.
(E, pour EBSS ; H, pour Hypoxie)

➤ Etude de *Hif-1α* dans des conditions de carence nutritive ou d'hypoxie

Une forte sur-expression d'*Hif-1α* est observée dans les HCT116 Bax^{-/-} soumises à une carence nutritive et à un stress hypoxique (à 9 h uniquement). L'induction est rapide et maximale à 9 h (facteur 6 dans des conditions de carence nutritive et facteur 3 dans des conditions d'hypoxie) puis a tendance à diminuer avec le temps de traitement (facteur 3 pour la carence nutritive à 16 h, plus de surexpression à H16h). Aucune variation significative de l'expression d'*Hif-1α* n'a pu être mise en évidence pour les HCT116 Bax^{+/+} et les U87-MG (cf. *Figure 27*). Ces résultats confirment ceux de puces à ADN.

Il nous a alors semblé intéressant de compléter l'analyse de la réponse à l'hypoxie en étudiant par Q-PCR de nombreuses cibles d'HIF-1 α (*Vegf*, *Bnip3*, *Enolase* ; *Glut-1*, *Noxa*, ...) connues pour participer activement à ce processus (Harris, 2002).

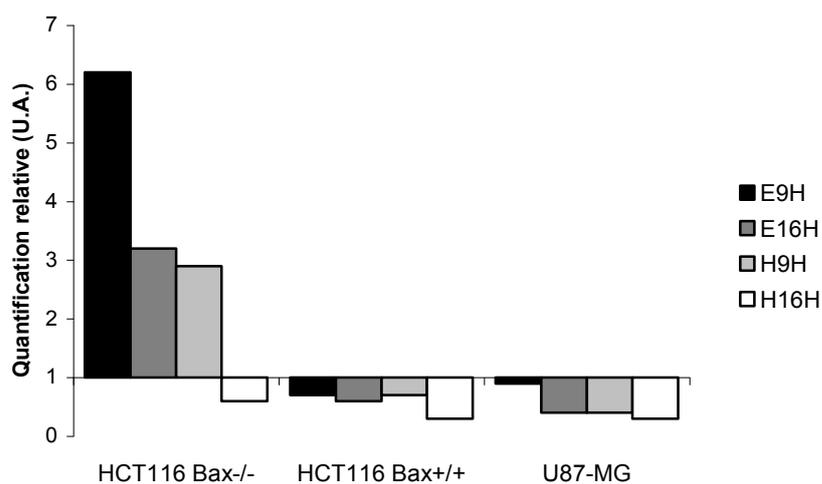


Figure 27 : Quantification relative de l'expression d'*Hif-1α* par Q-PCR.

(E, pour EBSS ; H, pour Hypoxie)

➤ Etude de gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie dans des conditions de carence nutritive ou d'hypoxie sévère

Vegf est sur-exprimé dans des conditions d'hypoxie dans les HCT116 Bax^{-/-} à 9h uniquement (facteur 4) et aux deux temps dans les U87-MG (facteur 7 et 10) (cf. *Figure 28*) ce qui est conforme à ce qui est décrit par la littérature, le promoteur du *vegf* possédant un HRE, sa transcription est activée dans des conditions d'hypoxie (Harris, 2002). Dans des conditions de carence nutritive, *Vegf* est augmenté d'un facteur 12 dans les HCT116 Bax^{-/-} à 9 h et dans les U87-MG à 9 h (facteur 8) et à 16 h (facteur 6). Il a déjà été décrit qu'une carence en glucose pouvait induire la sur-expression du *Vegf* dans des cellules ovariennes murines (Zhang *et al.*, 2002) et qu'une carence en acides aminés pouvait également provoquer l'augmentation de son expression dans des cellules épithéliales rétiniennes humaines (Abcouwer *et al.*, 2002).

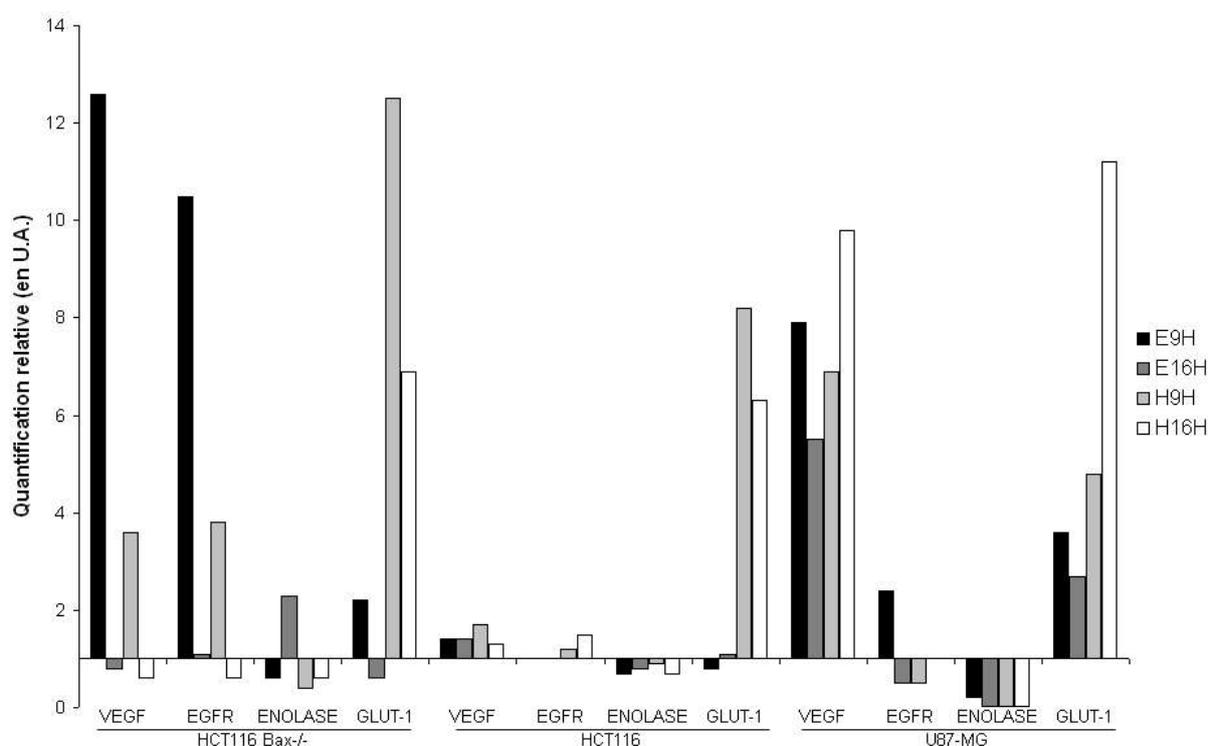


Figure 28 : Quantification relative de l'expression du *Vegf*, de l'*Egfr*, de l'*Enolase* et de *Glut-1* par Q-PCR (E, pour EBSS ; H, pour Hypoxie).

Des études ayant montré que l'expression du *Vegf* peut être régulée par l'EGFR (Pore *et al.*, 2006), nous nous sommes intéressés à ses variations d'expression. L'*Egfr* est sur-exprimé dans les HCT116 Bax^{-/-} à 9 h de carence nutritive (facteur 10) et d'hypoxie (facteur 4) et légèrement (facteur 2) dans les U87-MG à 9 h de carence nutritive.

Contrairement à ce qui est décrit dans la littérature (Semenza *et al.*, 1996), de manière surprenante, aucune sur-expression voire même une sous-expression de l'*Enolase* est observée dans les différentes lignées en hypoxie sévère. Une légère sur-expression (facteur 2) de l'*Enolase* est uniquement présente dans les HCT116 Bax^{-/-} à 16 h de carence nutritive.

Il est à remarquer qu'aucune variation de l'expression de *Vegf*, de l'*Egfr*, de l'*Enolase* n'est observée dans les HCT116 Bax^{+/+} contrairement aux HCT116 Bax^{-/-}. Ces différences peuvent s'expliquer en partie par leur capacité apoptotique différente. Cela soulève également le biais d'utiliser deux lignées qui *a priori* sont identiques si ce n'est la délétion d'un gène alors qu'en fait ces deux lignées cancéreuses peuvent évoluer de manière différente pendant leur établissement de manière d'autant plus éloignée qu'elles possèdent un phénotype mutateur.

Glut-1 est sur-exprimé dans les 3 lignées très fortement en hypoxie (facteur 6 à 12) ce qui est cohérent avec la littérature puisque *Glut-1* est un gène possédant un HRE qui a déjà été décrit comme étant sur-exprimé dans des conditions d'hypoxie (Harris, 2002). Il n'est sur-exprimé qu'à 9 h de carence nutritive dans les HCT116 Bax^{-/-} (environ d'un facteur 2) et à 9 et 16h de carence nutritive dans les U87-MG (facteur 3).

Vegf, *Egfr* et *Glut-1* sont donc sur-exprimés dans les HCT116 Bax^{-/-} et les U87-MG dans des conditions de carence nutritive ainsi que dans des conditions d'hypoxie sévère ce qui confirment les résultats de puces à ADN et qui tendraient à confirmer la réponse hypoxique

induite lors d'une carence en facteur de croissance et en acides aminés. Afin de confirmer cette réponse hypoxique, l'expression de certaines protéines de la famille de Bcl-2 qui sont connues pour être régulée par HIF-1 a également été analysée en hypoxie sévère et en condition de carence nutritive.

➤ Etude de l'expression de membres de la famille de Bcl-2 (*Bnip3*, *Noxa* et *Mcl-1*) dans des conditions de carence nutritive ou d'hypoxie sévère

Une forte sur-expression de *Bnip3* est observée lors de la carence nutritive et à 9h d'hypoxie pour les HCT116 Bax^{-/-} (cf. *Figure 29*). Comme *Hif-1α* et *Vegf*, la sur-expression de *Bnip3* est rapide dans les deux conditions (dès 9h, augmentation d'un facteur 7). En outre, elle s'amplifie à 16h de carence nutritive (facteur 20). Dans les HCT116 Bax^{+/+}, la sur-expression de *bnip3* est retrouvée dans les conditions hypoxiques (facteur 3). Pour les U87-MG, l'augmentation n'est plus observée (facteur 2 à 3) que pour des temps de 16h quelque soit le traitement ce qui était différent des résultats de puce à ADN qui indiquait une sur-expression plus précoce dès 9h. Il est déjà connu que l'expression de *bnip3* est activée dans des conditions hypoxiques ou suite à différents traitements induisant l'autophagie (Daido *et al.*, 2004; Kanzawa *et al.*, 2005)).

Noxa est faiblement sur-exprimé dans des conditions de carence nutritive à 9h pour les HCT116 Bax^{+/+} et les U87-MG et à 16h pour les HCT116 Bax^{-/-}. Il n'est pas sur-exprimé en hypoxie dans les HCT116. Il serait même sous-exprimé dans les U87-MG dans des conditions hypoxiques ce qui est différent de ce qui est décrit dans la littérature. En effet, l'hypoxie *via* l'activation d'HIF-1 α provoquerait la sur-expression de *Noxa* qui participe à la mort cellulaire (Kim *et al.*, 2004). Dans nos lignées, *Noxa* n'est pas surexprimé à la différence des autres

cibles d'HIF-1 α étudiées ce qui pourrait peut-être s'expliquer par le fait que son promoteur ne soit pas accessible aux facteurs de transcription HIF-1 α ou p53. *Noxa* n'est pas connu pour être induit lors d'une carence nutritive.

Une forte sur-expression de *Mcl-1* est observée uniquement dans les HCT116 *Bax*^{-/-} suite à une carence nutritive de 16h. Cela diffère également des résultats de puces à ADN. L'expression de *Mcl-1* n'est pas connue pour être régulée directement par HIF-1 α mais par VEGF (Le Gouill *et al.*, 2004). Comme *Mcl-1* est une protéine anti-apoptotique de la famille de *Bcl-2*, son rôle dans l'autophagie a été étudié par Priaul *et al.* qui ont montré que *Mcl-1* ne semblait pas impliquée dans la régulation de l'autophagie.

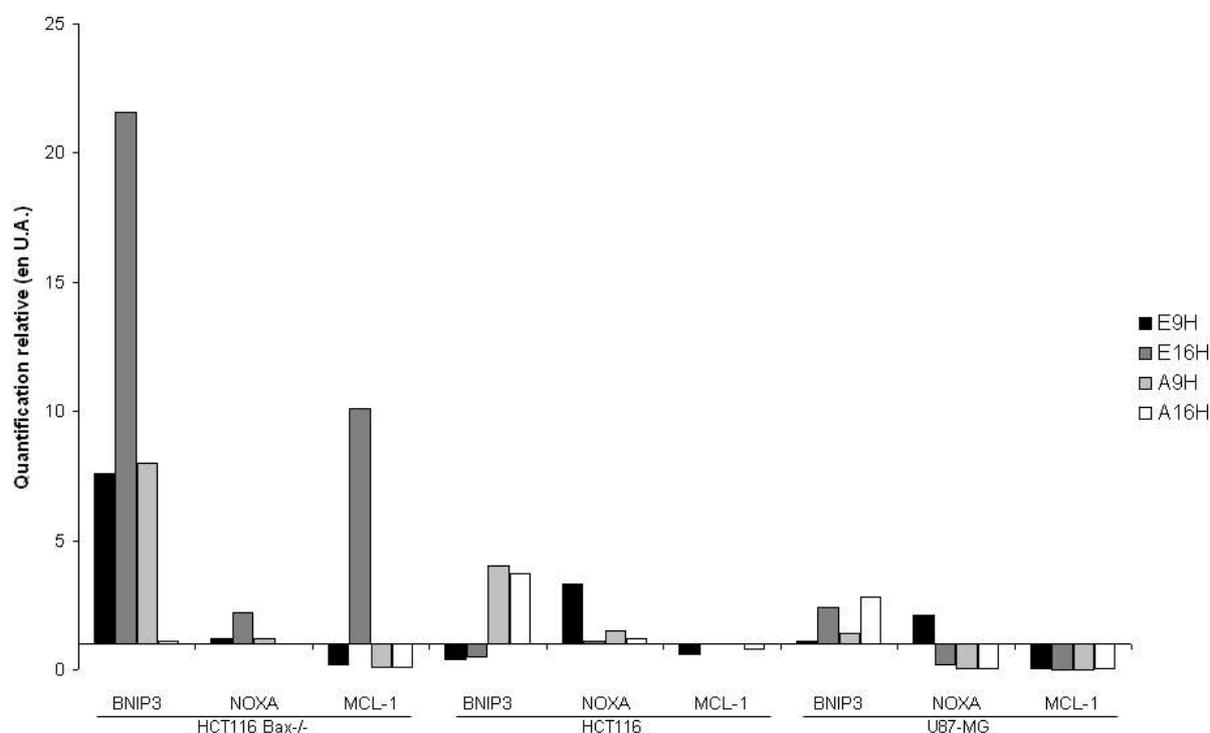


Figure 29 : Quantification relative de l'expression de *Bnip3*, de *Noxa* et de *Mcl-1* par Q-PCR. (E, pour EBSS ; H, pour Hypoxie)

En conclusion, dans des conditions de carence nutritive, la sur-expression de nombreux gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie (*Hif-1 α* , *Vegf*, *Bnip3*, *Glut1*, ...) est observée ce qui suggèrerait que la carence nutritive induirait l'activation d'HIF-1 α . Cela provoquerait alors une réponse de type hypoxique en parallèle de celle autophagique. Cette réponse semble plus forte que celle induite par des conditions d'hypoxie sévère puisque pour la majorité des gènes analysés, leur sur-expression est plus forte lors de la carence nutritive. La réponse de type hypoxique est plus marquée dans les HCT116 Bax^{-/-} que dans les deux autres lignées. Par ailleurs, dans cette lignée, les processus apoptotiques sont court-circuités suite à l'absence de Bax (Priaul *et al.*). Cette lignée est donc la seule qui a été utilisée pour la suite des expériences.

Il était alors nécessaire de valider que lors de la carence nutritive HIF-1 α est effectivement responsable de la sur-expression de ses cibles et de cette réponse de type hypoxique.

2.1.3. HIF-1 α est effectivement responsable de la sur-expression de ses cibles

Afin de confirmer qu'HIF-1 α est impliquée dans la sur-expression des différents gènes précédemment étudiés, sa sous-expression a été réalisée par ARN interférence et validée par Q-PCR et par mesure de la prolifération cellulaire en milieu complet. En effet, il a été décrit que l'absence d'HIF-1 α diminue la vitesse de prolifération cellulaire (Dang *et al.*, 2006).

La plus forte diminution de la vitesse de prolifération cellulaire est observée pour le shHIF-1 α n°1 dans les HCT116 Bax^{-/-} par rapport aux cellules contrôle (cf. *Figure 30*). Pour les cellules contenant ce shHIF-1 α , la Q-PCR a été réalisée pour confirmer sa sous-expression.

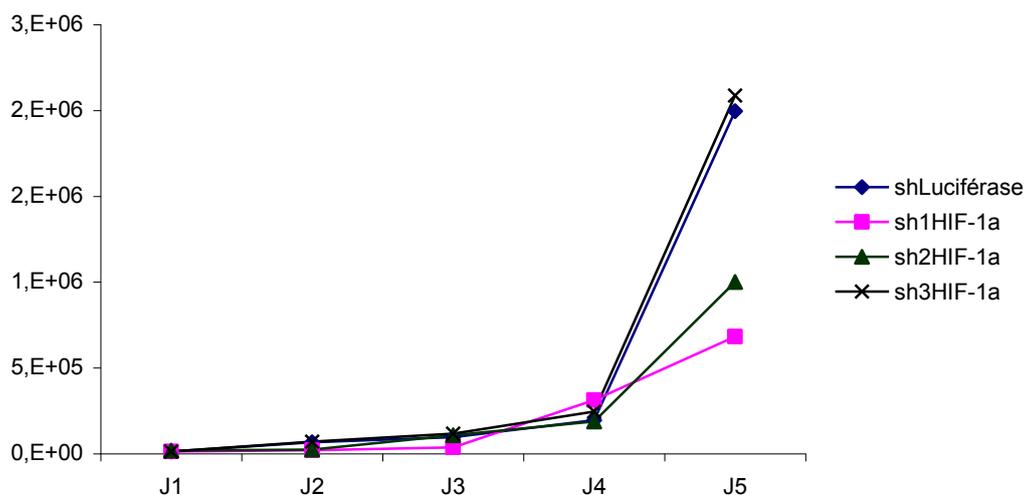


Figure 30 : Mesure de la prolifération des HCT116 Bax^{-/-} shHIF-1 α

L'effet de son extinction sur trois gènes impliqués dans la réponse à l'hypoxie (*bnip3*, *vegfr* et *egfr*) a également été analysé. L'analyse par Q-PCR indique que la sous-expression d'*Hif-1 α* est effective (cf. *Figure 31*). Le sh1 HIF-1 α a été utilisé pour la suite des expériences puisqu'il présente la meilleure diminution de la vitesse de prolifération corrélée à une bonne extinction validée par Q-PCR. Afin de pouvoir confirmer les résultats obtenus avec ce shARN, deux nouveaux shARNs ont été réalisés mais sans permettre une bonne extinction (données non montrées).

Par ailleurs, dans les cellules shHIF-1 α , on ne retrouve plus la sur-expression des trois gènes étudiés lors de la carence nutritive ou dans des conditions d'hypoxie. Il a été démontré que *Vegfr* et *Bnip3* possèdent un HRE dans leur promoteur ce qui en font des cibles transcriptionnelles directes d'HIF-1 α . Par contre, aucun HRE spécifique d'HIF-1 α n'a pu être mis en évidence pour l'*Egfr* et il est même décrit que la stimulation par l'EGF puisse dans certaines lignées cellulaires induire la sur-expression d'*Hif-1 α* . Par ailleurs, Franovic *et al.* ont démontré que l'expression de l'*Egfr* puisse être activée par HIF-2 α (Franovic *et al.*, 2007).

De manière intéressante, la sous-expression d'*Hif-1 α* suffit dans les cellules HCT116

à inhiber l'expression de l'*Egfr* ce qui suggère qu'HIF-1 α puisse être impliquée directement ou non dans la régulation de son expression éventuellement par une boucle de rétrocontrôle.

Il est intéressant de remarquer qu'à 16 h de carence nutritive ainsi que dans les conditions hypoxiques, l'expression de *Vegf* est soit plus faible mais pas totalement inhibée (H9H), soit de manière intéressante augmentée dans les cellules shHIF-1 α (E16h et H16h) ce qui semble indiquer qu'un ou plusieurs autres facteurs de transcription puisse(nt) induire sa sur-expression en l'absence d'HIF-1 α . Il a déjà été montré que l'expression de *Vegf* puisse être indépendante d'HIF-1 et diminuée par des inhibiteurs des histones déacétylases (Brugarolas *et al.*, 2003).

En conclusion, *Hif-1 α* est surexprimé et la protéine est transcriptionnellement active lors d'une carence nutritive et dans des conditions hypoxiques de 9 h et 16 h. HIF-1 α est responsable de l'induction des différentes cibles étudiées connues pour posséder un HRE dont *Vegf* et *Bnip3* mais également de l'expression de l'*Egfr*.

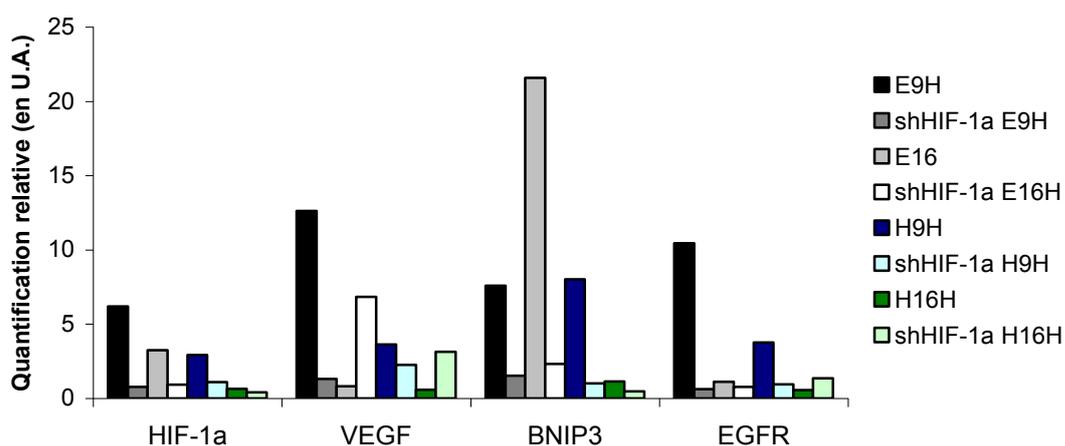


Figure 31: Effet de la sous-expression d'*Hif-1 α* sur la régulation de l'expression de *Vegf*, *Bnip3* et *Egfr* par Q-PCR. (E, pour EBSS ; H, Hypoxie, shHIF-1 α , shARN contre HIF-1 α)

2.2. Comparaison de la réponse autophagique induite par la carence nutritive et par l'hypoxie sévère

2.2.1. Comparaison de l'autophagie induite par une carence nutritive et par l'hypoxie dans les HCT116 Bax^{-/-}

L'hypoxie ayant déjà été décrite comme pouvant déclencher de l'autophagie, nous avons voulu vérifier si, dans les HCT116 Bax^{-/-}, l'hypoxie sévère provoquait effectivement une réponse autophagique. Nous avons également voulu comparer cette autophagie à celle induite par une carence nutritive. Pour cela, des coupes de cellules soumises à une carence nutritive ou placées dans des conditions hypoxiques ont été observées au microscope électronique à transmission afin de visualiser la présence ou non de vacuoles autophagiques (cf. *Figure 32*).

Dans des conditions de carence nutritive, les cellules HCT116 Bax^{-/-} présentent des vacuoles autophagiques rondes, contenant ou non des organelles à dégrader, regroupées dans une portion limitée du cytoplasme. Par ailleurs, les mitochondries semblent intactes. Dans des conditions d'hypoxie, ces petites vacuoles sont également présentes mais en nombre plus restreint. On peut observer un autre type de structures beaucoup plus grandes, spécifiques de l'hypoxie, qui semblent posséder une double membrane (flèche blanche) qui pourraient être des vacuoles autophagiques contenant éventuellement des mitochondries en cours de dégradation (cf. *Figure 32*).

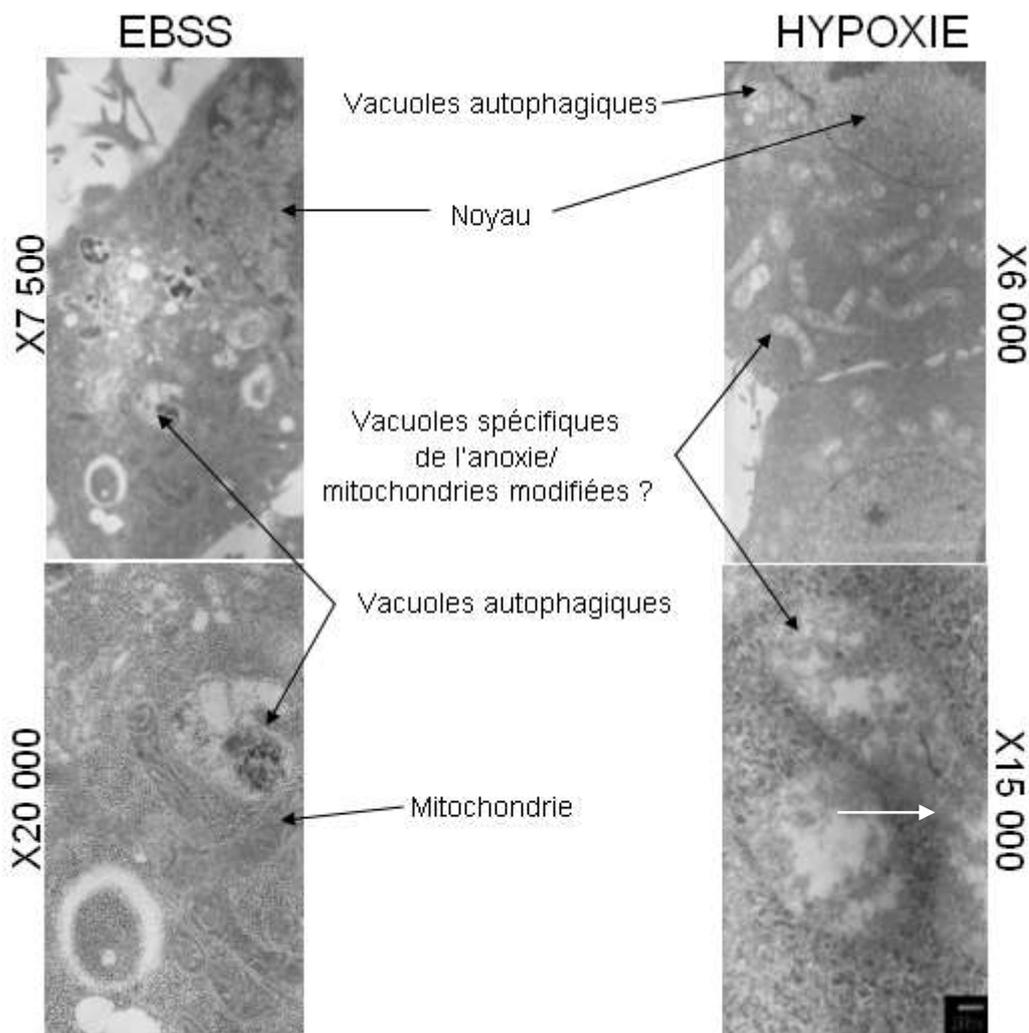


Figure 32: MET de cellules HCT116 Bax^{-/-} soumises à des conditions de carence nutritive ou d'hypoxie sévère.

Par ailleurs, un autre moyen pour visualiser les vacuoles autophagiques est de les marquer avec le MDH (Priault *et al.*). Cette technique, beaucoup moins lourde que la MET, permet d'analyser un nombre conséquent de cellules et donc de quantifier l'autophagie dans les cellules (cf. *Figure 33*). Par ailleurs, les cellules infectées exprimant la GFP, l'outil LC3-GFP classiquement utilisé pour évaluer la capacité autophagique des cellules ne peut être utilisé dans nos conditions.

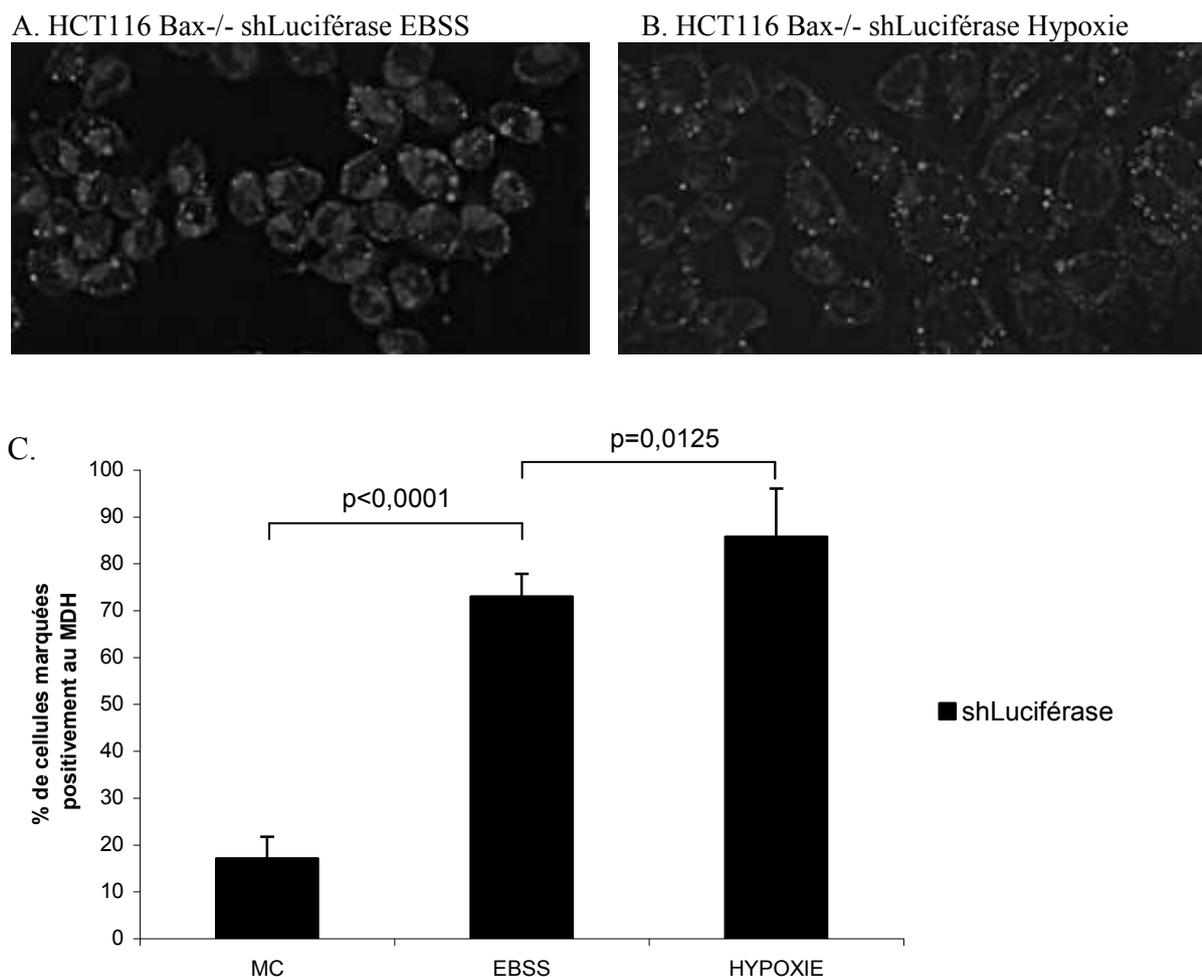


Figure 33 : Marquage par le MDH des cellules HCT116 Bax^{-/-} en conditions de carence nutritive (EBSS) ou en conditions hypoxiques. A et B. Photos des cellules dans les conditions de carence nutritive ou hypoxique. C. Quantification du marquage par le MDH (n=8 en milieu complet (MC) et EBSS; n=3 en hypoxie).

Une autophagie basale, entre 20-30 % de cellules marquées par le MDH, est présente dans les cellules en milieu complet. Lors d'une carence nutritive, le taux de cellules marquées augmente fortement (environ 70 % des cellules). Dans des conditions hypoxiques, plus de 80 % des cellules sont marquées par le MDH ce qui confirme que l'hypoxie sévère provoque également une réponse de type autophagique très forte.

2.2.2. Comparaison de l'expression et de la localisation d'HIF-1 α lors d'une carence nutritive et dans des conditions hypoxiques

L'hypoxie est connue pour provoquer la stabilisation d'HIF-1 α ce qui aboutit à son accumulation et à sa translocation nucléaire. Après avoir observé qu'à la différence de l'hypoxie, l'ARNm d'*Hif-1 α* est sur-exprimé lors d'une carence nutritive, nous voulions savoir si la protéine était également stabilisée.

Alors que l'accumulation d'HIF-1 α est observée après 24 h de condition hypoxique, aucune accumulation d'HIF-1 α n'est visible pendant la carence nutritive (cf. *Figure 34*). Par contre, la protéine est présente à faible concentration pendant ce traitement voire peut-être même diminuerait à 24 h.

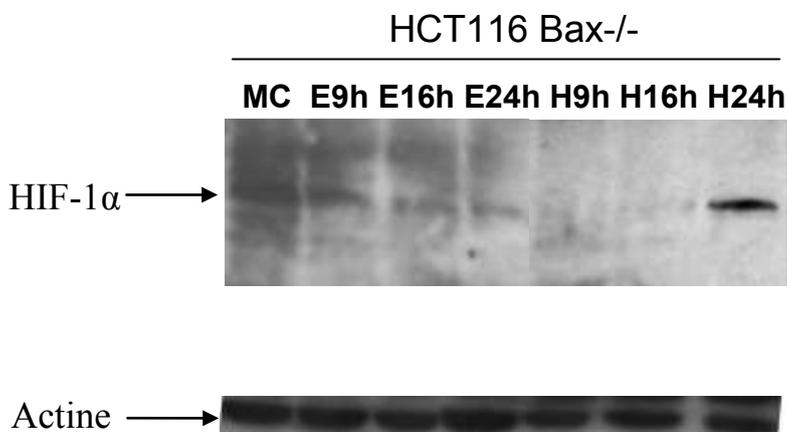


Figure 34: Immuno-empreinte dirigée contre HIF-1 α dans des HCT116 Bax^{-/-} en milieu complet (MC), soumises à une carence nutritive (E) et soumises à des conditions d'hypoxie (H) pendant 9, 16 et 24 h.

Nous voulions également étudier la localisation d'HIF-1 α lors d'une carence nutritive en comparaison avec celle observée dans des conditions hypoxiques. Dans les cellules en conditions normales de culture, HIF-1 α est localisée uniformément dans tout le cytoplasme (cf. *Figure 35*). En hypoxie, à 16 h de traitement, HIF-1 α est nucléaire ou périnucléaire, HIF-1 α étant en train de se transloquer vers le noyau. Dans les cellules en carence nutritive, HIF-1 α est essentiellement cytoplasmique mais relocalisée à certaines zones particulières du cytoplasme et présente dans le noyau. Mais aucune accumulation d'HIF-1 α n'est visible dans le noyau en condition de carence nutritive, ce qui tend à confirmer les résultats d'immunoprecipitation. L'absence d'accumulation pourrait s'expliquer par la présence de VHL et des prolyl ou asparagyl-hydroxylases actives dans le noyau ou par un fort export nucléaire. Le renouvellement d'HIF-1 α assuré par une augmentation de son expression semble cependant être suffisant pour permettre d'assurer son rôle de facteur de transcription et d'activer le promoteur de certaines de ses cibles, peut-être ceux présentant la plus forte affinité pour HIF-1 α dans des conditions de carence nutritive.

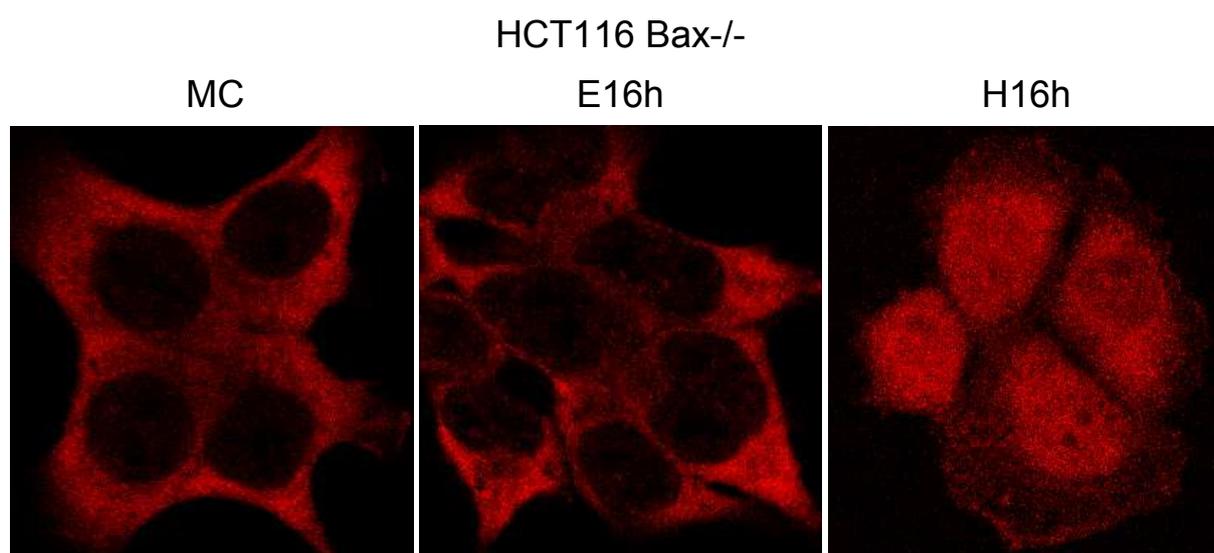


Figure 35 : Immuno-cytologie contre HIF-1 α dans les cellules HCT116 Bax^{-/-}.

En conclusion, la carence nutritive induit la sur-expression d'HIF-1 α mais n'assure pas sa stabilisation. HIF-1 α ne s'accumule pas dans le noyau, cependant, elle est transcriptionnellement active. Comme la carence nutritive déclenche une réponse autophagique dans les HCT116 Bax $^{-/-}$, HIF-1 α est-elle impliquée dans cette réponse ?

2.2.3. La sous-expression d'HIF-1 α semble diminuer la capacité autophagique des HCT116 Bax $^{-/-}$ lors d'une carence nutritive uniquement

Etant donné que la réponse à l'hypoxie est gouvernée par le facteur HIF-1 α et que la carence nutritive induit une réponse de type hypoxique, il était intéressant d'étudier le rôle de ce facteur dans l'autophagie.

Une fois le shARN validé, afin de déterminer si HIF-1 α jouait un rôle dans l'autophagie, des marquages des vacuoles autophagiques par le MDH ont été réalisés en carence nutritive ainsi qu'en condition hypoxique (cf. *Figure 36*). Afin de pouvoir comparer le rôle d'HIF-1 α avec le rôle d'une protéine connue pour être impliquée dans la régulation de la formation des autophagosomes, des shARNS ont également été construits contre Beclin-1.

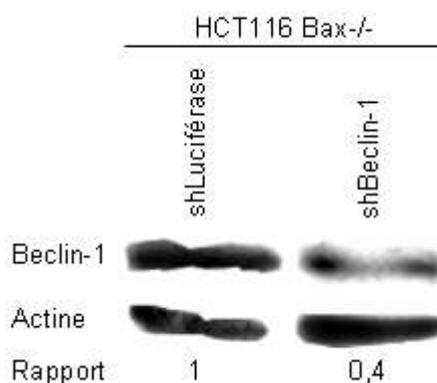


Figure 36 : Immuno-empreinte dirigée contre Beclin-1 dans les cellules HCT116 Bax $^{-/-}$ shLuciférase et shBeclin-1.

Un seul shARN a pu être validé par immuno-empreinte (cf. *Figure 36*).

Une légère diminution du marquage par le MDH est observée dans les cellules shHIF-1 α (environ 20 %) en EBSS ; cette diminution est similaire à celle observée dans les shBeclin-1 (cf. *Figure 37*). Par contre, dans des conditions hypoxiques, aucune diminution de l'activité autophagique n'est détectable. L'autophagie induite par une carence nutritive semble donc être régulée par HIF-1 α alors que l'autophagie induite par l'hypoxie sévère ne semble pas régulée par HIF-1 α . Il a déjà été décrit que mTOR puisse être inactivée de façon indépendante d'HIF-1 α dans des conditions d'hypoxie (Arsham *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006). Dans les conditions d'hypoxie, la présence de Beclin-1 semblerait ne pas être essentielle au développement de l'autophagie à moins que le peu de Beclin-1 restant soit suffisant à l'induction totale de l'autophagie induite par l'anoxie.

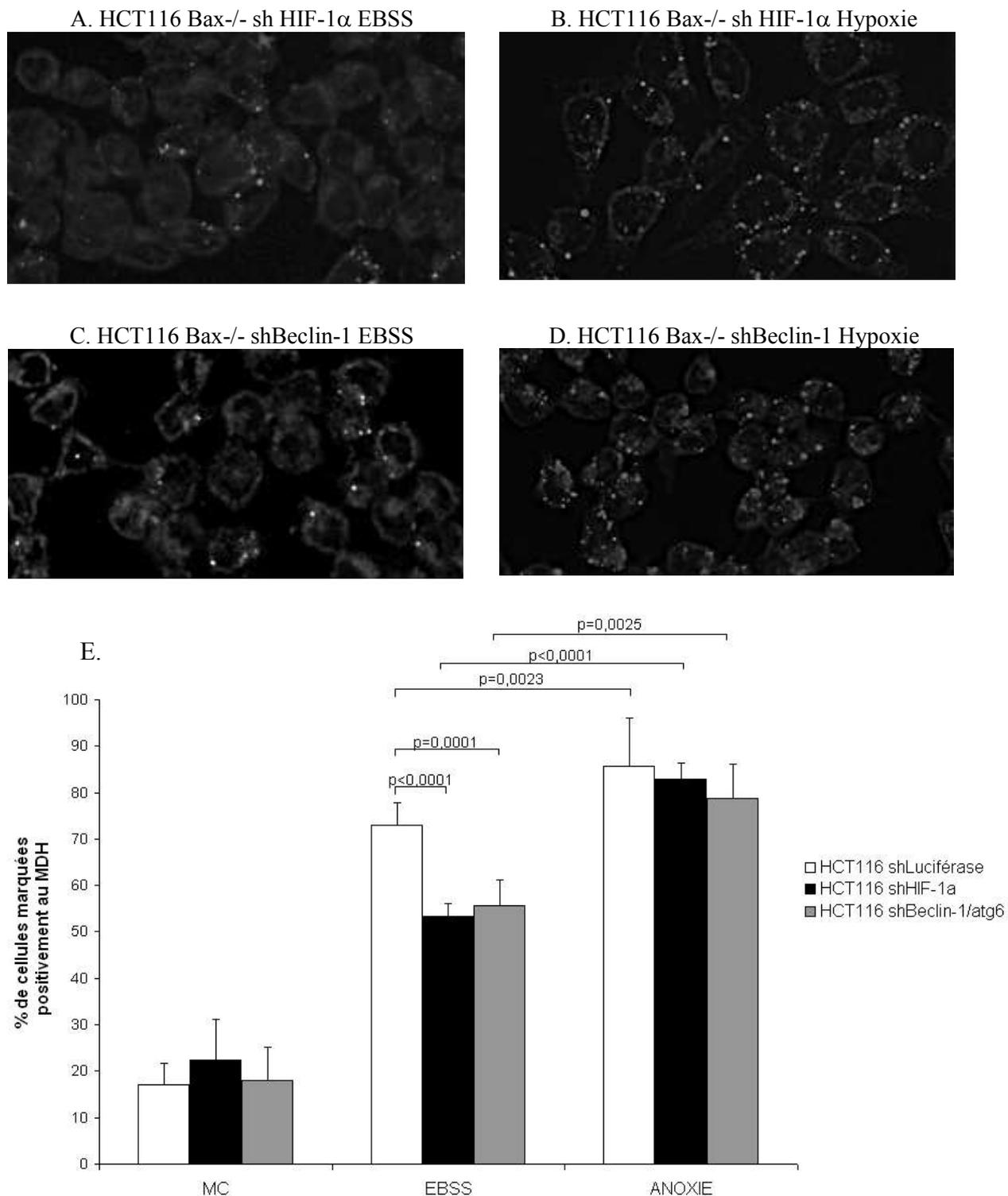


Figure 37: Marquage par le MDH des cellules HCT116 Bax-/- en conditions de carence nutritive (A/C) ou en conditions hypoxiques (B/D). E. Quantification du marquage par le MDH (n=4).

Afin de confirmer le rôle potentiel d'HIF-1 α dans l'autophagie, les cellules HCT116 Bax $^{-/-}$ shHIF-1 α soumises à une carence nutritive ou en oxygène sont analysées par microscopie électronique à transmission (cf. *Figure 38*). Les cellules HCT116 shHIF-1 α présentent les mêmes caractéristiques que les cellules shLuciférase. On peut observer l'apparition de vacuoles autophagiques plus nombreuses lors d'une carence nutritive qu'en hypoxie. On retrouve également des mitochondries intactes en EBSS. En hypoxie sévère, apparaissent également ces structures très allongées qui pourraient être des vacuoles autophagiques spécifiques de l'anoxie dégradant potentiellement des mitochondries ou des mitochondries modifiées.

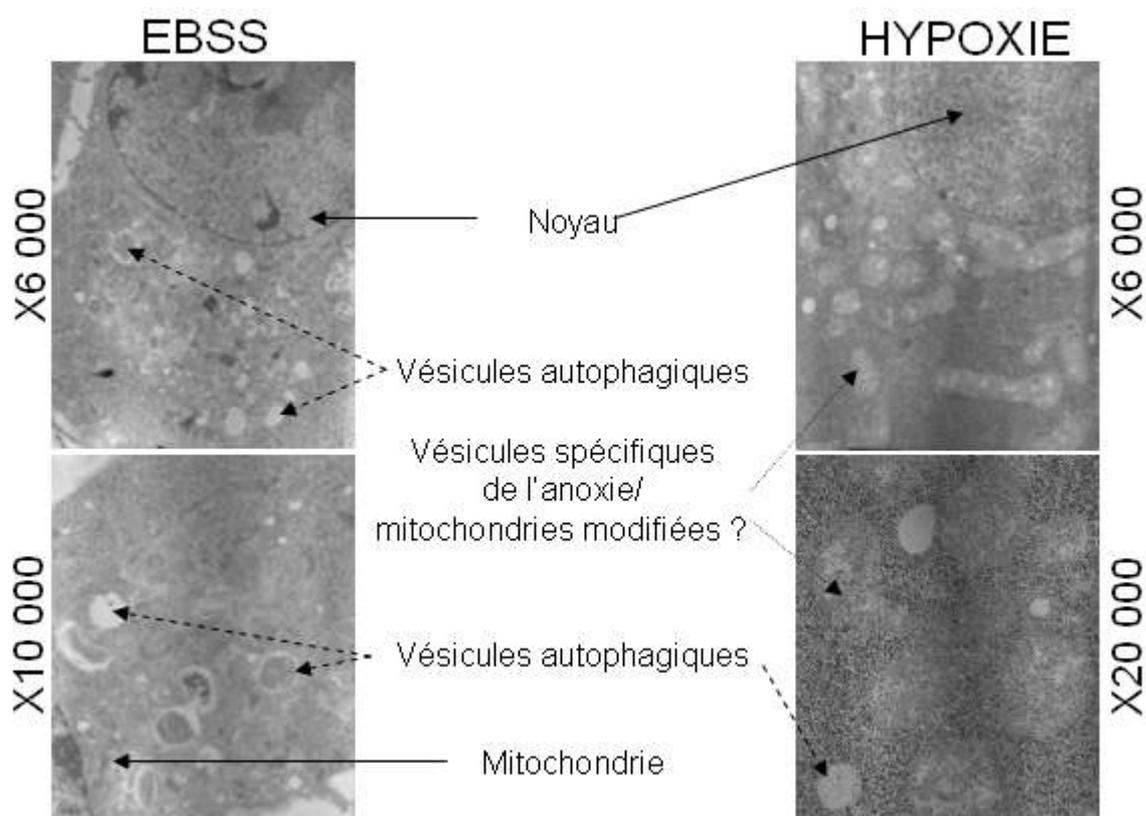


Figure 38 : MET de cellules HCT116 Bax $^{-/-}$ shHIF-1 α en conditions de carence nutritive ou d'hypoxie.

Etant donné que dans les cellules HCT116 shHIF-1 α , nous avons pu observer la présence d'autophagosomes dans des conditions de carence nutritive, il est nécessaire de réaliser une quantification assistée par ordinateur pour pouvoir conclure quant au rôle d'HIF-1 α dans l'autophagie (cf. *Figure 39*). Dans les cellules HCT116 shHIF-1 α , on observe une diminution de la taille moyenne des vacuoles d'environ 25 % (198 contre 151 pixel²) et de 25 % du nombre des autophagosomes par rapport aux cellules HCT116 shLuciférase (24 contre 18 en moyenne). 70 % des cellules shHIF-1 α possèdent moins de 20 vacuoles par cellules alors que 60 % des cellules shLuciférase possèdent entre 20 et 30 vacuoles. Par ailleurs, la surface des vacuoles ne dépasse pas 5 000 pixel² dans les cellules shHIF-1 α alors qu'elle peut atteindre 10 000 pixel² dans les cellules shLuciférase. Il est important de noter que l'effet de la sous-expression d'HIF-1 α est légèrement sous-estimé puisque seules 89 % des cellules sont infectées le jour de l'ensemencement des cellules.

HIF-1 α semble donc effectivement participer à la régulation de l'autophagie en intervenant au niveau de la formation et de l'élongation des autophagosomes.

A	Surface totale moyenne des vacuoles/cellule (pixel ²)	Nombre moyen de vacuoles/cellule	Surface moyenne des vacuoles (pixel ²)
shHIF-1 α	2690,5	17,9	150,5
shLuciférase	4810,0	24,3	198,0

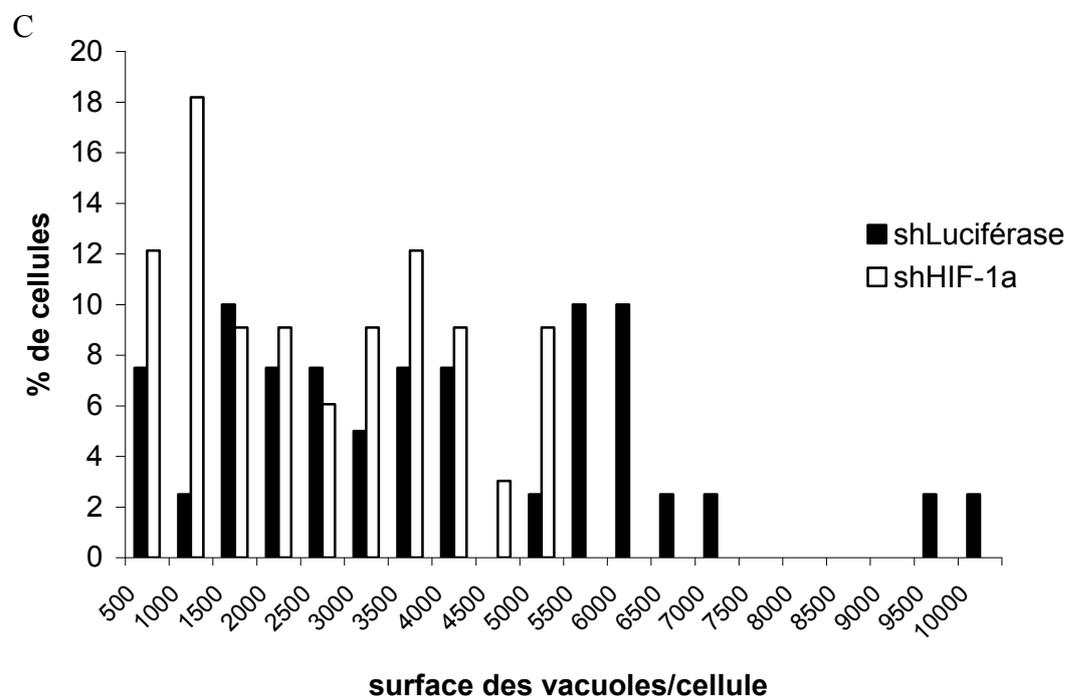
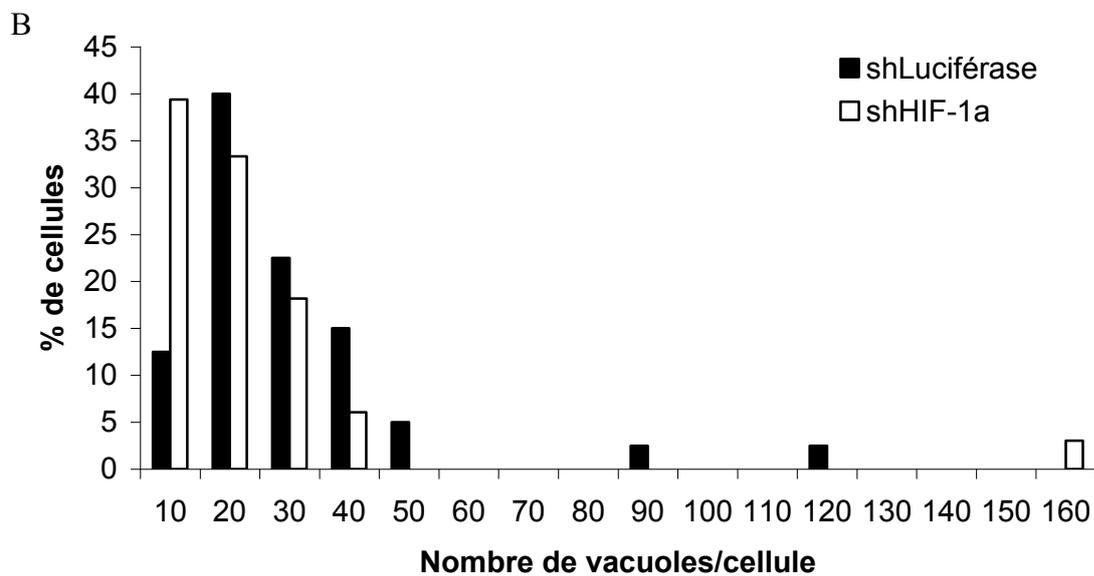


Figure 39: Analyse des images de MET des HCT116 Bax^{-/-} soumises à une carence nutritive. A. Bilan des données concernant le nombre et la taille des vacuoles autophagiques. Répartition du nombre (B) et de la surface (C) des vacuoles par cellule.

2.2.4. La diminution de la capacité autophagique dans les cellules déficientes en HIF-1 α n'est pas due à une ré-activation de mTOR

Etant donné que l'activation de HIF-1 α peut induire l'inhibition de mTOR, la diminution d'HIF-1 α dans les cellules shHIF-1 α , en n'inhibant plus mTOR, est-elle responsable de la diminution de l'activité autophagique ?

Pour cela, le niveau de phosphorylation d'une des cibles de mTOR, 4EBP1, est étudié par immuno-empreinte. 4EBP1 existe sous trois formes selon son degré de phosphorylation : la forme hyperphosphorylée γ , la forme intermédiaire β et la forme hypophosphorylée α (cf. *Figure 40*).

Dans les HCT116 Bax $^{-/-}$, lors d'une carence nutritive et dans des conditions anoxiques, on observe une diminution de la phosphorylation de 4EBP1 de la forme hyperphosphorylée vers la forme hypophosphorylée, ce qui signifie une diminution de l'activité de mTOR. Dans les cellules shHIF-1 α , cette même diminution du niveau de phosphorylation de 4EBP1 est retrouvée ce qui indique que mTOR est bien inhibée et n'est pas responsable de la diminution de l'activité autophagique.

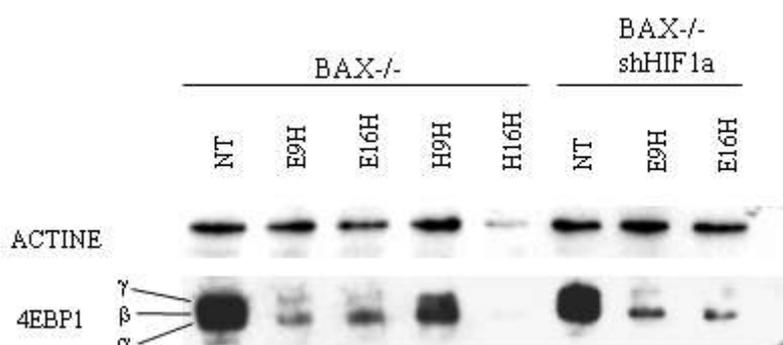


Figure 40: Phosphorylation de 4EBP1, cible de mTOR par immuno-empreinte (MC, pour milieu complet, E, pour EBSS, H, pour Hypoxie)

2.3. Etude de deux cibles de HIF-1 α dans la réponse autophagique induite par une carence nutritive : VEGF et BNIP3

Afin de comprendre par quel mécanisme le facteur de transcription HIF-1 α pouvait réguler l'autophagie, nous nous sommes intéressés à deux de ses cibles majeures, VEGF connu pour son rôle pro-angiogénique et donc pro-tumoral (Baek *et al.*, 2000) et BNIP3 déjà connue pour son rôle dans la mort autophagique des U87-MG suite à différents traitements (Daido *et al.*, 2004; Kanzawa *et al.*, 2005).

2.3.1. VEGF ne semble pas impliqué dans la régulation de l'autophagie

Afin d'étudier le rôle de VEGF dans la régulation de l'autophagie, trois shARNs (2 ciblant la partie codante et le troisième ciblant le 3'UTR) ont été construits et validés par Q-PCR (cf. *Figure 41*). La meilleure extinction est présente dans les cellules contenant le sh1VEGF qui sera donc utilisé par la suite. La capacité autophagique est mesurée par marquage des vacuoles autophagiques par le MDH (cf. *Figure 42*).

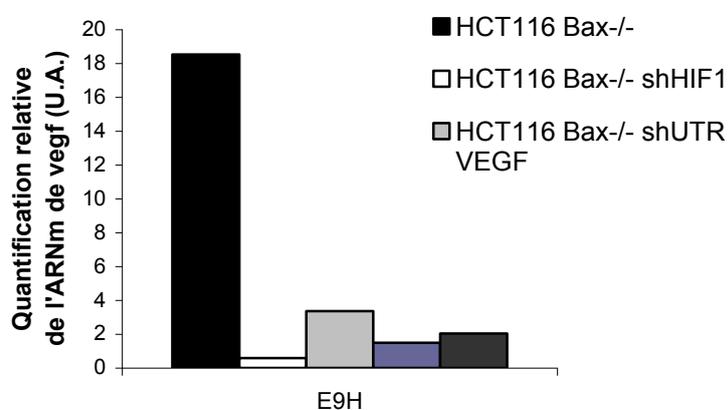


Figure 41 : Validation par Q-PCR de l'extinction de VEGF par les shARNs

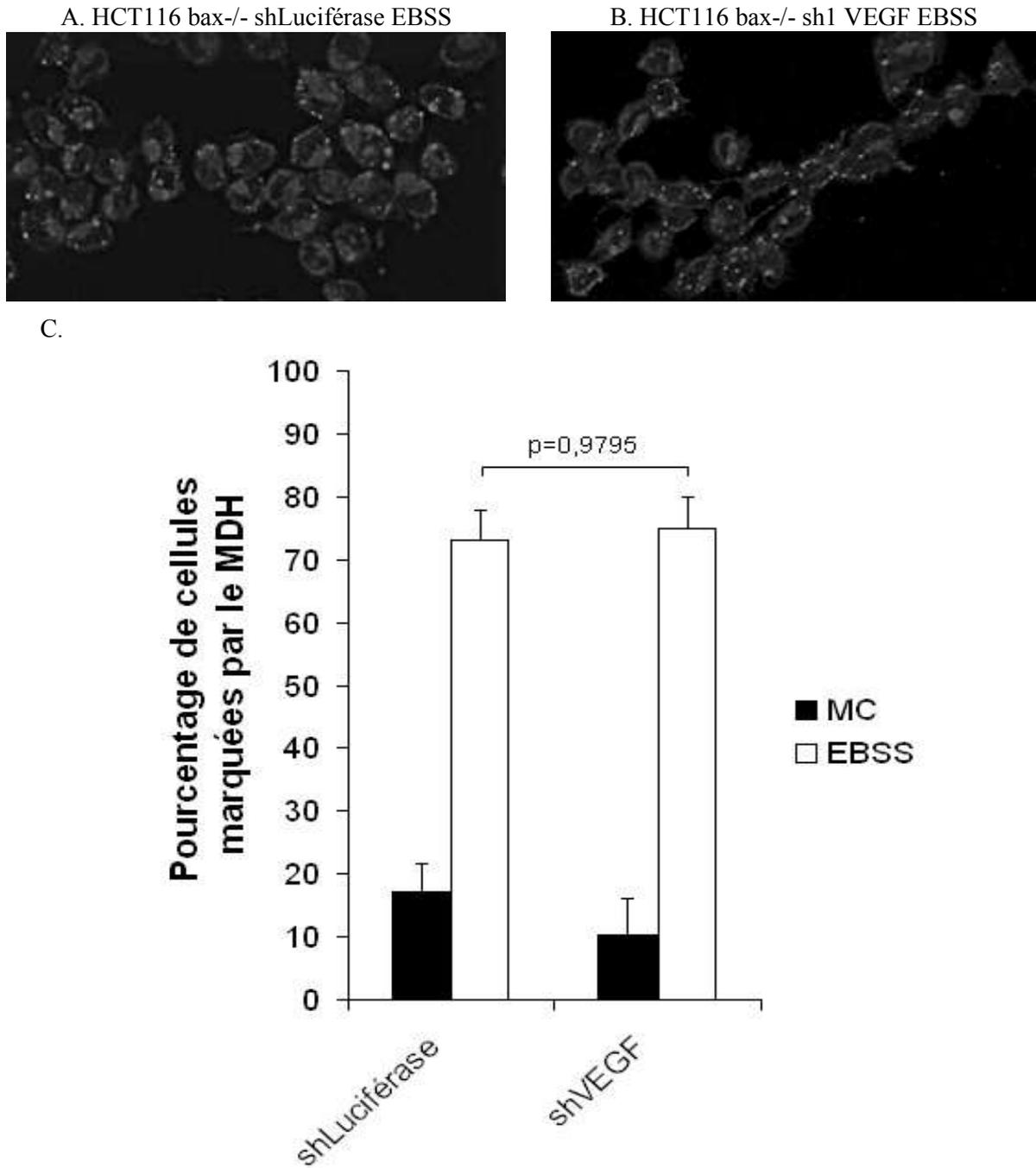


Figure 42 : Mesure de l'activité autophagique des cellules HCT116 shVEGF. A. et B. Photos des cellules shLuciférase et shVEGF lors d'une carence nutritive. C. Quantification du nombre de cellules possédant des autophagosomes (n=3).

Aucune différence de marquage par le MDH n'a pu être observée dans les cellules

shVEGF par rapport aux cellules shLuciférase (cf. *Figure 42*).

VEGF ne semble pas être la cible d'HIF-1 α impliquée dans la régulation de l'autophagie.

2.3.2. BNIP3 semble impliquée dans la régulation de l'autophagie

Afin d'étudier le rôle de BNIP3 dans la régulation de l'autophagie, trois shARNs ont été construits : 2 ciblant la partie codante (1 et 2) et un ciblant le 3'UTR, et validés par Q-PCR (cf. *Figure 43*). La meilleure extinction est présente dans les cellules contenant le sh1 BNIP3 qui sera donc utilisé par la suite.

La capacité autophagique des cellules dans lesquelles BNIP3 est éteint est mesurée par marquage des vacuoles autophagiques par le MDH (cf. *Figure 44*). On observe une légère mais significative diminution du marquage des autophagosomes dans les cellules HCT116 Bax $^{-/-}$ shBNIP3 en milieu complet (diminution de 50 %) et lors de la carence nutritive (diminution de 20 %), diminution similaire à celle mesurée dans les HCT116 shHIF-1 α lors de la carence nutritive.

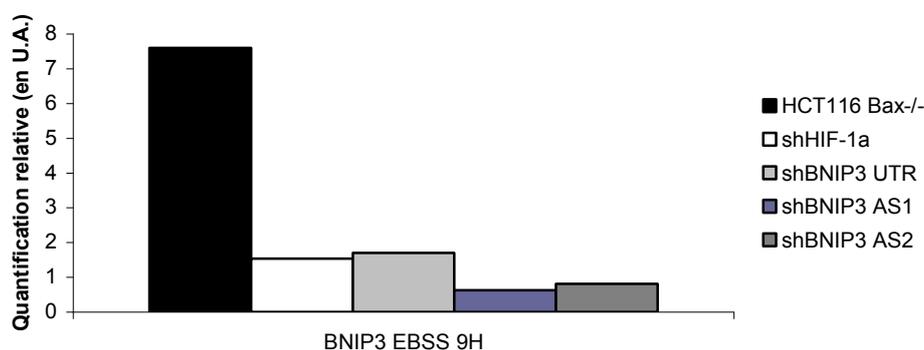


Figure 43 : Validation par Q-PCR de l'extinction de BNIP3 par les shARNs

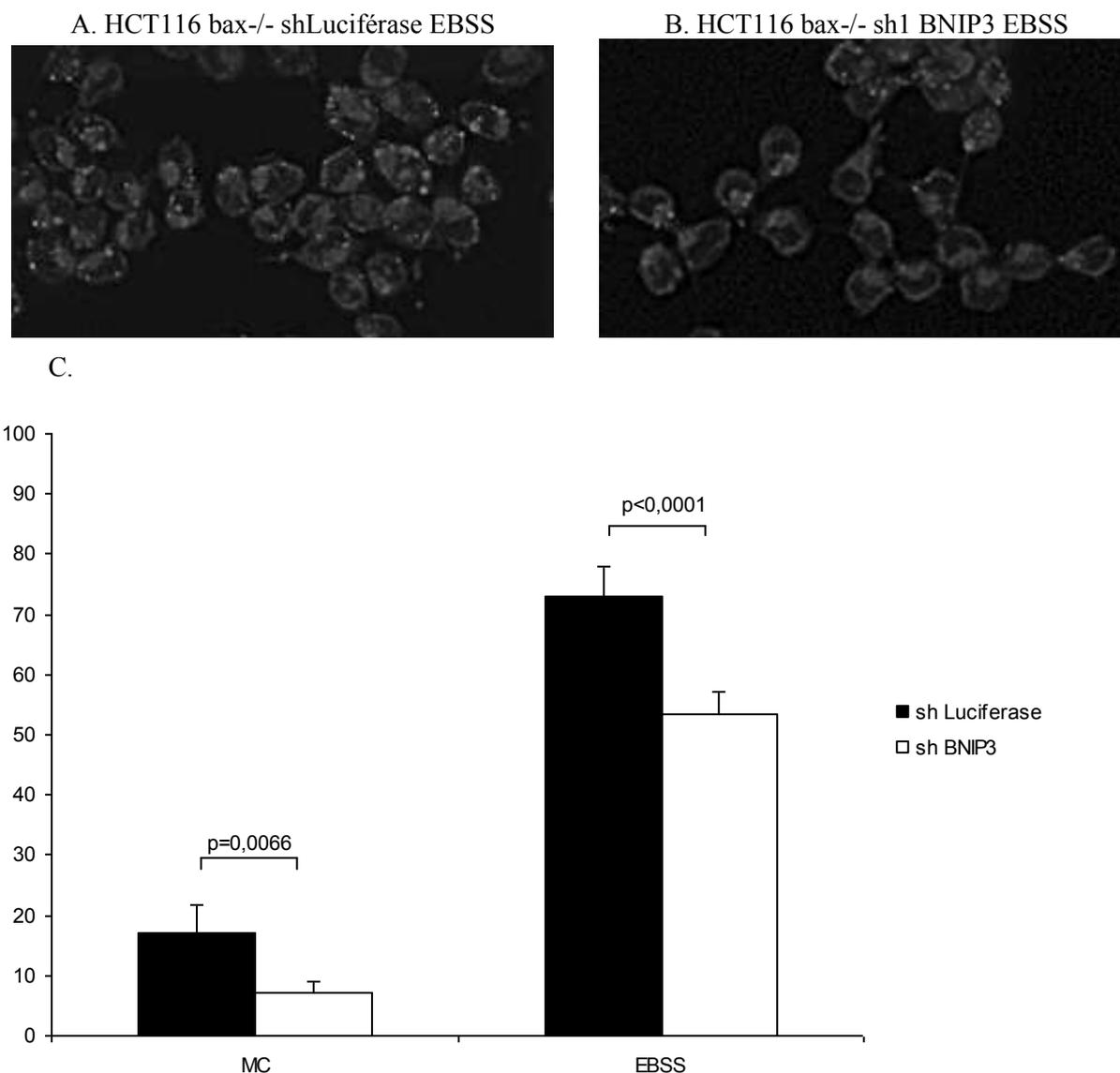


Figure 44 : Mesure de l'activité autophagique des cellules HCT116 Bax-/- shBNIP3. A. et B. Photos des cellules shLuciférase et shBNIP3 lors d'une carence nutritive. C. Quantification du nombre de cellules possédant des autophagosomes (n=4).

La forte diminution de BNIP3 dans les HCT116 Bax-/- shHIF-1 α serait peut-être responsable de la diminution de la capacité autophagique. Afin de confirmer cette hypothèse, la réintroduction de BNIP3 est réalisée dans les HCT116 shHIF-1 α . Etant donné que les cellules shBNIP3 expriment un shARN ciblant la partie codante de BNIP3 et non son 3'UTR, nous n'avons pas pu confirmer dans les cellules HCT116 shBNIP3 l'effet de la réintroduction de BNIP3.

2.3.3. La réintroduction de BNIP3 restaurerait la capacité autophagique des cellules déficientes en HIF-1 α

Afin de confirmer le rôle de BNIP3 dans la réponse autophagique des HCT116Bax^{-/-} soumises à une carence nutritive, la sur-expression ectopique de BNIP3 et de son mutant délété de sa partie transmembranaire (BNIP3 Δ TM) est réalisée. La sur-expression transitoire de BNIP3 et de BNIP3 Δ TM est validée par immuno-empreinte dirigée contre l'épitope V5 (cf. *Figure 45*). Nous pouvons remarquer que BNIP3 existe sous différentes formes dans notre lignée cellulaire : une forme clivée qui a la taille du mutant BNIP3 Δ TM, une forme monomérique et une forme dimérique. Il est connu que BNIP3 puisse s'homodimériser ; par contre, la forme clivée *in vivo* n'est pas évoquée. Les cellules ont été co-transfectées avec le vecteur permettant l'expression de BNIP3 et de son mutant et avec un vecteur codant pour une protéine fluorescente : DsRed (ratio 10 :1). La capacité autophagique des cellules est mesurée par marquage avec le MDH uniquement dans les cellules co-marquées par la GFP (présence du shARN) et par le dsRed (présence de BNIP3 ou de son mutant) (cf. *Figure 45*).

Dans des conditions normales de culture, dans les deux lignées cellulaires, la sur-expression de BNIP3 et de BNIP3 Δ TM augmente le marquage correspondant à l'autophagie basale de 10-20 % à 30-40 % ce qui est conforme à ce qui est décrit dans la littérature. Dans des conditions de carence nutritive, dans la lignée contrôle HCT116 Bax^{-/-} shLuciférase, aucune augmentation du marquage par le MDH n'est visible. En revanche, dans la lignée HCT116 Bax^{-/-} shHIF-1 α , l'expression de BNIP3 et de BNIP3 Δ TM semble restaurer la capacité autophagique des cellules déficientes pour HIF-1 α .

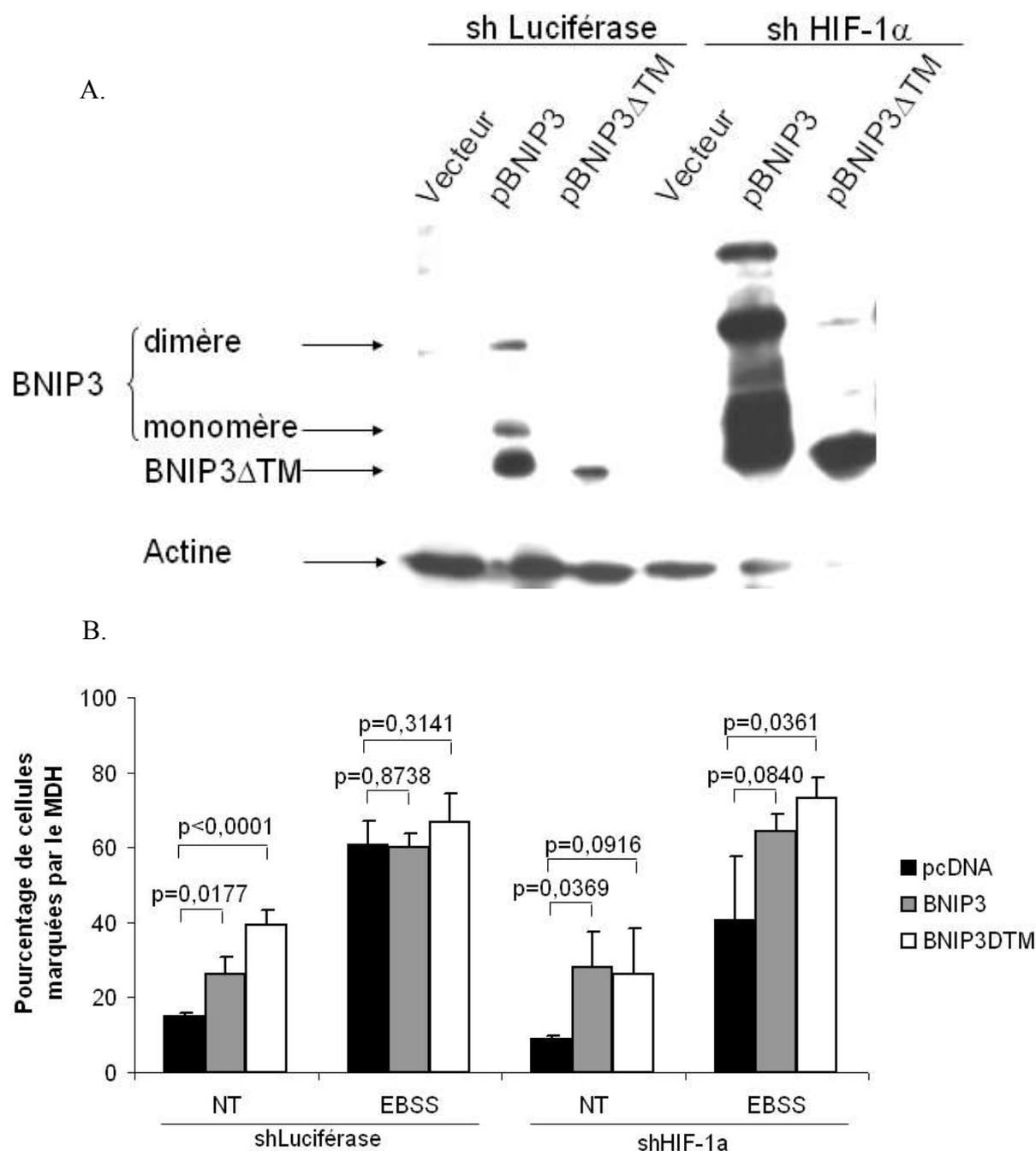


Figure 45 : Mesure de l'activité autophagique des cellules HCT116 shLuciférase et shHIF-1 α transfectées par un vecteur vide, un plasmide codant pour BNIP3 et pour BNIP3 Δ TM. A. Validation de la sur-expression de BNIP3 et de BNIP3 Δ TM par immuno-empreinte anti-V5. B. Quantification du nombre de cellules possédant des autophagosomes dans des conditions contrôle (MC) ou en milieu carencé (EBSS) (n=3).

Le domaine transmembranaire ne semble donc pas impliqué dans la réponse autophagique de BNIP3. Il a été précédemment décrit que l'absence du domaine transmembranaire de BNIP3 inhibe la mort autophagique suite à différents traitements (Kanzawa *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2007). Le rôle de BNIP3 dans une autophagie de survie n'est pas documenté.

Afin de confirmer que BNIP3 serait bien la cible principale d'HIF-1 α responsable de la réponse autophagique des HCT116 Bax^{-/-} soumises à une carence nutritive, les cellules HCT116 Bax^{-/-} sont co-infectées avec des particules virales contenant le shARN ciblant HIF-1 α et des particules virales contenant le shARN ciblant BNIP3. En parallèle, de simples infections sont réalisées pour valider le pourcentage d'infection. La sous-expression de BNIP3 et d'HIF-1 α a été validée par Q-PCR (cf. *Figure 46*). La capacité autophagique de ces cellules co-infectées est mesurée par marquage avec le MDH (cf. *Figure 47*).

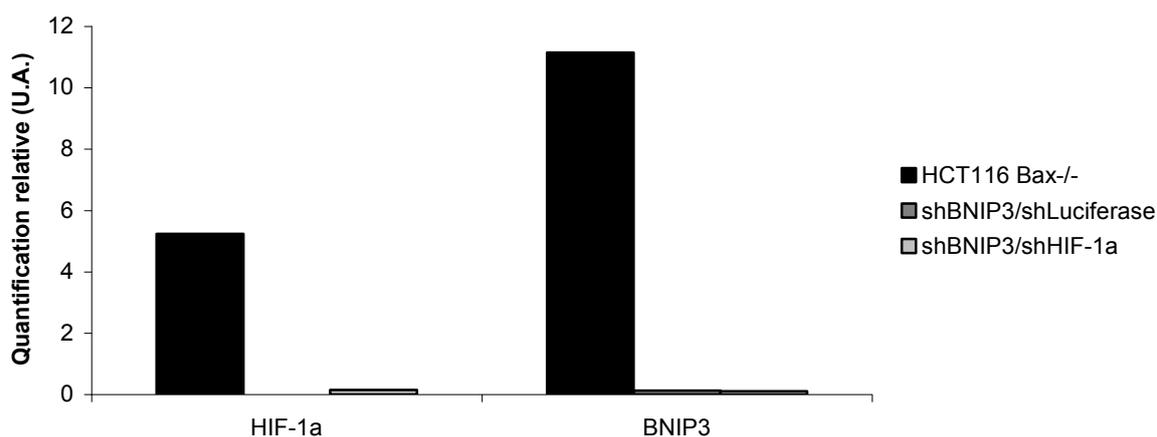


Figure 46. Validation par Q-PCR de l'extinction de HIF-1 α et BNIP3 par les shARNs

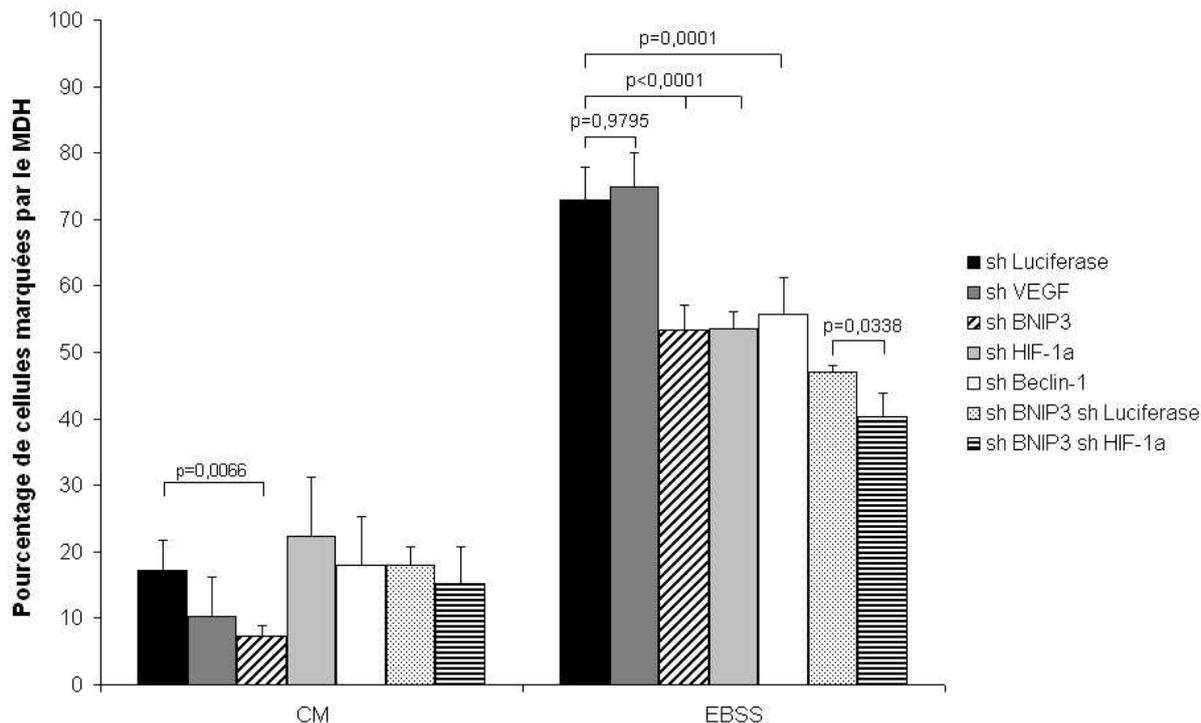


Figure 47 : Effet de la sous-expression de BNIP3 et d'HIF-1 α sur la capacité autophagique des HCT116 Bax $^{-/-}$ analysé par marquage par le MDH

Une légère mais significative diminution du marquage par le MDH est observée dans les cellules possédant le shHIF-1 α et le shBNIP3 ce qui confirme que ces deux protéines participent à la même voie de signalisation aboutissant à l'activation de l'autophagie. BNIP3 serait donc le principal acteur impliqué dans la régulation de l'autophagie par HIF-1 α . Il peut cependant exister une cible participant également à cette régulation mais de façon moindre ce qui expliquerait la légère diminution observée dans les cellules contenant les deux shARNs par rapport aux cellules n'en contenant qu'un seul. Récemment une nouvelle cible d'HIF-1 α a été identifiée comme étant impliquée dans l'autophagie de survie induite suite à un dommage à l'ADN protégeant différentes lignées cellulaires contre une mort caspase indépendante : la GAPDH (glycéraldéhyde 3 phosphate déshydrogénase) (Colell *et al.*, 2007). Il pourrait être intéressant de regarder son rôle dans notre lignée cellulaire.

Article 2 : HIF-1 α and BNIP3 are involved in autophagy process in response to serum-nutrient starvation

Fanny B. MARHUENDA, Marie-Therese LECABELLEC, François PEDELABORDE,
Julie MILLOUR, François M. VALLETTE and Frédérique BRAUN.

Article en préparation.

HIF-1 α and BNIP3 are involved in autophagy process in response to serum-nutrient starvation

Fanny B Marhuenda, Marie-Thérèse LeCabellec, François Pedelaborde, Julie Millour, François M Vallette and Frédérique Braun*

Université de Nantes, INSERM U601, 9 quai Moncouso, 44093 Nantes Cedex 1, France

Abstract

Hypoxia and nutrient deprivation are environmental stresses that could govern the survival and/or adaptation of tumor cells *in vivo*. Here, we report that nutrient-serum and oxygen depletion both induced the formation of autophagosomes and inhibited the phosphorylation of the mTOR target 4EBP-1, thereby promoting autophagy. Moreover, we show that the mRNA levels of the Bcl-2/adenovirus E1B 19kDa-interacting protein 3 (BNIP3) and the antigenic factor Vascular Endothelium Growth factor (VEGF), two transcriptional targets of the Hypoxia-Inducible Factor-1 α (HIF-1 α) are increased during serum-nutrient starvation. Silencing of HIF-1 α and BNIP3 but not VEGF, induced a similar decrease in autophagy as observed under serum-nutrient starvation. Thus, HIF-1 α is not only involved in the hypoxic response but also in the positive regulation of starvation-induced autophagy via its target BNIP3. Serum-starvation and hypoxia may, therefore, both contribute to cancer cell growth by enhancing autophagy, which under these conditions promote cell survival. In addition, by increasing the transcription of the angiogenic factor VEGF, as well as HIF-1 α , could contribute to the poor prognosis detected in certain solid tumors.

Keywords: autophagy, HIF-1 α , BNIP3, hypoxia, serum-nutrient starvation

*Corresponding author. Université de Nantes, INSERM U601, 9 quai Moncouso, 44093 Nantes Cedex 1, France

Tel: +33 2 40 08 40 83; Fax: +33 2 40 08 40 82

Email: frederique.braun@univ-nantes.fr

Introduction

The central region of solid tumors is characterized by a low-oxygen and low-nutrient environment, thus adaptive responses to these conditions may represent crucial steps in tumor progression. Both hypoxia and nutrient deprivation have been shown to induce macroautophagic responses (hereafter referred to as autophagy) (Pattingre *et al.*, 2007; Pouyssegur *et al.*, 2006). Autophagy is a genetically programmed and evolutionary conserved process found in eukaryotes from yeast to mammal (Yorimitsu & Klionsky, 2005). During autophagy, cytoplasmic material is sequestered and delivered to the lysosome, resulting in the degradation of long-lived cellular proteins and organelles. Autophagy helps cells to eliminate damaged organelles, toxic metabolites and intracellular pathogens thereby, playing an important role in various developmental processes and diseases including cancer and neurodegenerative pathologies such as Huntington's disease (Mizushima, 2005). In addition, autophagy was shown to enhance cell survival and to delay type I programmed cell death (apoptosis) (Abedin *et al.*, 2007; Ding *et al.*, 2007; Lavieu *et al.*, 2006). Recently, evidence has suggested that in some cases, autophagy can induce a type II programmed cell death (Daido *et al.*, 2004; Kanzawa *et al.*, 2005; Maiuri *et al.*, 2007a).

In yeast and in higher eukaryotes, nutrient starvation greatly increases the autophagic **level** response, which in turn would promote cell survival by recycling amino acids and other intracellular nutrients in the cell (Lum *et al.*, 2005; Yorimitsu & Klionsky, 2005). The autophagic response induced by serum-nutrient starvation is negatively regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) (Nobukuni *et al.*, 2007; Pattingre *et al.*, 2007a). mTOR is a protein kinase that is a central controller of protein synthesis and cell cycle progression (Fingar *et al.*, 2004; Gingras *et al.*, 2004). Hypoxia (low oxygen) was also shown to inhibit mTOR (Brugarolas *et al.*, 2004; Liu *et al.*, 2006) and BNIP3, a BH3 only member

of the Bcl-2 family of cell death regulators, was recently found to be essential for hypoxia-induced autophagy (Li *et al.*, 2007; Tracy *et al.*, 2007).

Low oxygen and nutrient depletion play critical roles in tumorigenesis but little is known about how they interact to induce tumor survival and increased malignancy. Our results show that both these stresses induce an autophagic response but with distinct characteristics. Moreover, a strong increase in the HIF-1 α transcriptional activity was observed during serum-nutrient starvation. In addition, we found that HIF-1 α is involved in autophagy in response to serum-nutrient starvation, via its target BNIP3. Altogether, these data suggest that hypoxia and nutrient starvation may both contribute to tumor growth by increasing HIF-1 α transcriptional activity and autophagy.

Results

Hypoxia and serum-nutrient starvation induce a distinct autophagy response.

Recent data indicate that autophagy is functionally activated in a series of cultured colorectal cancer cells and contributes to tumor cell survival in colorectal cancers *in vitro* and *in vivo* (Sato *et al.*, 2007). We thus analyzed the autophagic response induced by nutrient depletion and under low oxygen conditions in a colorectal carcinoma cell line HCT116. We have previously shown that starvation induced an autophagic response leading to cell survival in HCT116 cells (Priault *et al.*, in preparation). As Bax did not modify the autophagic activity in HCT116 cells in response to starvation (Priault *et al.*, in preparation) or to ER stress (Ding *et al.*, 2007), we used the HCT116-BaxKO cells that are deficient in apoptosis favoring the study of autophagy independent of apoptosis.

To compare the intracellular events that occur during serum-nutrient starvation to those activated during oxygen depletion, autophagosomes that are sequestering vacuoles formed during the autophagy process were visualized by transmission electron microscopy

(TEM) in HCT116-BaxKO cells under normoxic (21% O₂) condition in Earle's Balanced Salt Solution (EBSS), an amino acid and serum-free medium or under hypoxia (~0.1 % O₂) in complete media over 6 h (Fig 1A). Serum-nutrient starvation or oxygen depletion both induce the formation of autophagosomes in the cytoplasm of the cells (Fig 1A). Mitochondria observed in EBSS-treated cells appeared mostly intact and were absent from the autophagosomes. In contrast, under hypoxic conditions mitochondria appeared to be altered and the presence of a double membrane vesicle around some mitochondria suggest that these might be internalized into autophagosomes (Fig 1A). The autophagic activity was also measured by labeling of the autophagosomes with monodansyl-pentane (MDH; a lipophile specific dye). The number of autophagosomes present under hypoxia (70% MDH positive cells) and in EBSS condition (68% MDH positive cells) suggesting a similar level of autophagic activity compared to basal autophagic activity observed (26% MDH positive cells) (Fig 1B).

These results indicate that oxygen and serum-nutrient depletion induced a similar autophagic activity as depicted by the MDH staining but with different profiles as defined by TEM analyses.

HIF-1 α transcriptional activity is increased in serum-nutrient starvation

Inhibition of mTOR in response to hypoxia was recently shown to involve at least the BNIP3 and Redd1 proteins, two targets of the transcriptional factor HIF-1 α , a key regulator of the cellular response to hypoxia (Li *et al.*, 2007; Tracy *et al.*, 2007). To determine if HIF-1 α was also involved in autophagy in response to hypoxia or to serum-nutrient deprivation, the transcriptional activity of HIF-1 α was monitored by Q-PCR, by quantification of the mRNA level of several HIF-1 α targets, in HCT116-BaxKO cells cultured under hypoxia or in EBSS medium over 9 or 16 h. HIF-1 α targets implicated in different processes were chosen: i) a key

angiogenic factor: VEGF, ii) three Bcl-2 family members: BNIP3, Mcl-1 (Myeloid Cell Factor-1; an anti-apoptotic protein) and Noxa (a BH3 only pro-apoptotic protein) and iii) the glucose transporter 1 (Glut-1) (Semenza, 2003). As expected, the expression of Glut-1 augmented 12.5-fold and 6.9-fold after 9 h and 16 h of hypoxia, respectively (Fig 2A). Under serum-nutrient starvation, the mRNA level of Glut-1 increased 2.2-fold at 9 h but showed a marked decrease at 16 h. The mRNA level of the three Bcl-2 family members, BNIP3, Mcl-1 and Noxa were all augmented after 16 h of EBSS treatment, showing a 21.6-fold, 10.1-fold and 2.2-fold increase respectively (Fig 2A). BNIP3 was also up-regulated under hypoxic condition but only at 9 h (Fig 2A). The mRNA level of VEGF was increased 4-fold under serum-nutrient starvation and under hypoxia after 9 h while at 16 h, its expression was not modified under either conditions (Fig 2A). Previous data have shown that serum starvation induced an increase in the mRNA level of VEGF in another colorectal cell line, HT29 (Jung *et al.*, 1999). The mRNA level of HIF-1 α was also up-regulated 6.2-fold and 3.2-fold under serum-nutrient starvation at 9 h and 16 h respectively and 3.2-fold under hypoxia at 9 h (Fig 2A).

Regulation of the expression of the HIF-1 α protein was described to be linked to the stabilization of the protein in hypoxia and not to a regulation at the transcriptional level (Semenza, 2003). We then analyzed the expression of the HIF-1 α protein by immunolabeling experiments with an antibody against HIF-1 α performed in HCT116-BaxKO after 16 h of EBSS culture or under Low oxygen. As expected, oxygen depletion induced a nuclear localization of HIF-1 α while in cells cultured in EBSS, its localization remained mainly cytoplasmic (Fig 2B). This result lead us to wonder if HIF-1 α is indeed the transcription factor that regulates at least the mRNA level of BNIP3 in HCT116-BaxKO in response to serum-nutrient starvation. HIF-1 α was silenced by shRNAs in HCT116-BaxKO cells. As previously described (Dang *et al.*, 2006), the proliferation of the HCT116-BaxKO shRNA-

HIF-1 α cells was significantly affected indicating that the shRNA-HIF-1 α efficiently silenced HIF-1 α expression in HCT116-BaxKO (Fig 2C). Quantification by Q-PCR of the mRNA levels of HIF-1 α confirmed the extinction of its expression in HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α cells (Fig 2D). The mRNA level of BNIP3 is strongly reduced in HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α cells after 9 h and 16 h of EBSS treatment (Fig 2D).

These data demonstrate that HIF-1 α transcriptional activity was increased in HCT116-BaxKO not only by hypoxia but also in response to serum-nutrient starvation and that HIF-1 α was responsible for the up-regulation of at least BNIP3 in serum-nutrient starvation.

Silencing of HIF-1 α affects the autophagy response in serum-nutrient starvation

In order to determine if an increase in the transcriptional activity of HIF-1 α was required for autophagy in response to serum-nutrient starvation, the autophagic response was analyzed in the HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α cells. The number of autophagic vesicles, labeled with MDH, was quantified in GFP-positive cells representing shRNA-HIF-1 α infected HCT116-BaxKO cells or control shRNA-luciferase infected HCT116-BaxKO cells. Silencing of HIF-1 α induced an 1.3-fold decrease in autophagic activity in response to serum-nutrient starvation (Fig 3A). No decrease in MDH labeling was observed in HCT116-BaxKO shRNAHIF-1 α cells cultured under hypoxia in agreement with previous results indicating that inactivation of mTOR induced by hypoxia might not require HIF-1 α (Arsham *et al.*, 2003; Liu *et al.*, 2006).

The effect of a knockdown of HIF-1 α on autophagy in response to serum-nutrient starvation was then analyzed by TEM experiments in HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α and in HCT116-BaxKO shRNA-luciferase cells. The number of infected cells was determined by flow cytometry to be at least 80% before being used (data not shown). TEM indicated that the vacuoles presented a slight different distribution in those cells cultured in EBSS medium (Fig

3B). Most of HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α cells contained an average 10 to 20 vacuoles per cell with a maximum of 40 vacuoles per cells, while the HCT116-BaxKO shRNA-luciferase cells contained more than 20 vacuoles per cell and a maximum of 50 vacuoles per cells. In addition, analysis of the average vacuole area showed that the vacuoles seemed larger in HCT116-BaxKO shRNA-luciferase cells than in HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α cells (Fig 3C).

In hypoxia, HIF-1 α was described to induce an autophagy response in part by inhibition of mTOR via its target BNIP3 and the Rheb protein (Li *et al.*, 2007). So we wonder if the reduction of the autophagy response induced by silencing of HIF-1 α might be due to a change in mTOR activity. To test this hypothesis, mTOR activity was determined by detection of the phosphorylation status of its target, 4EBP-1 (eukaryotic translation initiation factor 4E binding protein 1). In complete medium, Western blots probed with an antibody against 4EBP-1 revealed two strong bands, β and γ , which represent the phosphorylated forms of 4EBP-1 and a weaker band, the non-phosphorylated α form in HCT116-BaxKO and in HCT116Bax-KO shRNA-HIF-1 α cells (Fig 3D). Oxygen and serum-nutrient depletion both caused a decrease in the phosphorylation of 4EBP-1 reflected by the accumulation of the α form and the disappearance of the γ form in HCT116-BaxKO cells (Fig 4D). No decrease of the phosphorylation was observed when 1 μ M wortmannin, an inhibitor of the PI(3) kinase class III used to inhibit autophagy, was added to the serum-nutrient depleted cultures while the addition of 20 μ M LY294002 in complete medium, an inhibitor of the PI(3) kinase class I used to inhibit AKT, blocked the phosphorylation of 4EBP-1 by mTOR (Fig 3D) (Petiot *et al.*, 2000).

In HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α , serum-nutrient starvation induced a dephosphorylation of 4EBP-1 isoforms quite similar to that observed in parental cell line (Fig 3D).

These results indicate that both serum-nutrient and oxygen depletion induced inactivation of mTOR and that the decrease in the autophagic activity measured in HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α cells in response to serum-nutrient starvation was not linked to a change in mTOR activity.

Silencing of BNIP3 diminishes the autophagic activity in response to serum-nutrient starvation in HCT116-BaxKO cells

It has been reported that BNIP3 regulates the hypoxia-induced autophagic process (Li *et al.*, 2007; Tracy *et al.*, 2007) and that BNIP3 triggers autophagy in malignant glioma cells treated with ceramide or arsenic trioxide (Daido *et al.*, 2004; Kanzawa *et al.*, 2005). The results presented thus far suggest that the transcription of BNIP3 was strongly activated in response to serum-nutrient starvation. The augmentation of BNIP3 was 7.6-fold and 21.6-fold after 9 h (Fig 2A) and 16 h starvation respectively and was under the control of HIF-1 α (Fig 2D). So BNIP3 appeared to be a good candidate to be one of the HIF-1 α targets involved in the autophagic process in HCT116-BaxKO cells cultured in EBSS. To test this hypothesis, a knockdown of BNIP3 by shRNA in HCT116-BaxKO cells was done. In comparison, the expression of the autophagic protein Beclin-1 and the expression of VEGF, another HIF-1 α target markedly increased under EBSS condition (Fig 2A), were also subjected to knockdown by shRNAs. The VEGF and BNIP3 shRNAs were validated by Q-PCR experiment (Fig 4A) while efficacy of the knockdown of Beclin-1 was determined by Western blot (Fig 4B). No modification of the autophagic response was detected in HCT116-BaxKO shRNA-VEGF cells (Fig 4C). In contrast, the knockdown of BNIP3 induced a decrease of 1.3-fold in the labeling of autophagosomes with MDH in cells cultured in EBSS, similar to that triggered by the knockdown of HIF-1 α (Fig 3A) or Beclin-1 (Fig 4C). We then wondered if the knockdown of HIF-1 α in HCT116-BaxKO shRNA-BNIP3 cells would have a cumulative

effect on the autophagic activity. In fact, the level of autophagy in the double knockdown was comparable to that measured in HCT116-BaxKO shRNA-BNIP3 or HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α (Fig 4C).

These data indicate that BNIP3 is involved in the autophagy process induced by serum-nutrient starvation and that BNIP3 and HIF-1 α may participate in the same signaling pathway.

BNIP3 rescues the autophagic activity in response to serum-nutrient starvation in HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α cells

As our results shown that BNIP3 was involved in the autophagy process induced by serum-nutrient starvation, we investigate if the weak autophagic activity in HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α may be rescued by over-expression of BNIP3 protein. HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α cells were transiently transfected with the wild-type BNIP3 vector (pBNIP3), with the mutant BNIP3 deleted of its transmembrane domain (pBNIP3 Δ TM) or as control, with the corresponding empty vector. The BNIP3 protein deleted of its transmembrane domain was no more able to dimerize and to localize to the mitochondria while it appeared still able to bind to at least Bcl 2 and Bcl-x_L (Ray et al, 2000). Moreover, BNIP3 Δ TM was shown unable to induce autophagy in contrast to the full-length BNIP3 protein (Kanzawa *et al*, 2005; Li *et al*, 2007).

The BNIP3 proteins cloned were tagged with the V5 epitope allowing the detection of their expression by Western blot with an antibody against the V5 sequence. In cells transfected with the mutant pBNIP3 Δ TM, as expected only one band was detected corresponding to the monomeric form, while in cells transfected with the wild-type pBNIP3, the homodimer that migrated at 60 kDa and the monomer that migrated at 30 kDa were both observed (Fig 5A). It has to be noted that the monomeric form appeared to be predominant in

cells transfected with pBNIP3. Quantification of MDH labeling indicated that over-expression of BNIP3 and of BNIP3 Δ TM in HCT116-BaxKO shRNAHIF-1 α cells increased the autophagy level in complete medium and in EBSS medium suggesting that both BNIP3 proteins may trigger basal and stimulated autophagic activity (Fig 5B). Moreover, the autophagy activity in HCT116-BaxKO shRNAHIF-1 α cells transfected with pBNIP3 or either pBNIP3 Δ TM was similar to those measured in HCT116-BaxKO shRNA Luciferase transfected cells (Fig 5B).

All together, these results suggest that the lack of activation of the transcription of BNIP3, observed in the presence of a knockdown of HIF-1 α , may participate in the decrease in autophagy induced under serum-nutrient starvation.

Discussion

Tumor cells can be subjected to oxygen and serum-nutrient deprivation in the tumor environment. Autophagy and hypoxia response were shown to promote cell survival in HCT116-BaxKO and HCT116 cells, respectively (Priault et al, in preparation)(Dang *et al.*, 2006). Here, we investigate the response of the colorectal carcinoma HCT116-BaxKO cells apoptosis-deficient cells cultured under low oxygen or serum-nutrient starvation conditions. We found that both oxygen or serum-nutrient depletion induced formation of autophagosomes and impeded the phosphorylation of the mTOR target, 4EBP-1, indicating that autophagy was activated under these two conditions. However, our data also show that serum-nutrient starvation increases the transcriptional activity of HIF-1 α , as under hypoxia, while a knockdown of HIF-1 α only affects the autophagic response induced by serum-nutrient starvation.

In support of our results, inhibition of mTOR under hypoxia was shown to occur independently of HIF-1 α and to be suppressed by AMPK inhibition, Tuberous Sclerosis

Complex 2 (TSC2) null mutation or over-expression of the small G protein Rheb (Arsham *et al.*, 2003; Brugarolas *et al.*, 2004). These results suggest that the inhibition of mTOR under hypoxia involves the AMPK/Tsc2/Rheb pathway. AMPK was shown to positively regulate autophagy via the activation TSC2, which impedes the accumulation of Rheb-GTP and thereby leads to mTOR inhibition (Sarbasov *et al.*, 2005; Meley *et al.*, 2006). However, inhibition of mTOR under hypoxia is believed to involve multiple pathways and to be mediated by at least two HIF-1 α targets : BNIP3 and Redd1 (Brugarolas *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2007; Tracy *et al.*, 2007). The Redd1 protein was shown to inhibit mTOR independently of the activity of AMPK and to act upstream of the Tsc1/Tsc2 complex (Brugarolas *et al.*, 2004). The role of BNIP3 in autophagy was previously described in the glioma cell line, U87-MG, where an induction of an autophagy cell death in response to ceramide or arsenic trioxide was observed (Daido *et al.*, 2004; Kanzawa *et al.*, 2005). More recently, BNIP3 was shown to be activated under hypoxia and to play a critical role in mTOR inhibition in response to hypoxia (Li *et al.*, 2007; Tracy *et al.*, 2007). Li *et al.* demonstrated that BNIP3 negatively regulates the mTOR activity by interacting with the direct downstream target of TSC2, the small G protein Rheb (Li *et al.*, 2007).

So BNIP3 might regulate the autophagic activity via its binding to the Rheb protein but at least two other mechanisms seemed to be involved in the induction of the autophagy by BNIP3. BNIP3 could stimulate autophagic cell death by inducing mitochondrial dysfunction (Daido *et al.*, 2004; Kanzawa *et al.*, 2005) or might modulate the autophagy response due to its ability to bind Bcl-2/Bcl-X_L proteins. These two proteins was shown to regulate positively, or negatively, the autophagy response to different stimuli via their interaction with Beclin-1 (Shimizu *et al.*, 2004; Pattingre *et al.*, 2005; Priault *et al.*, in preparation). Our results indicate that the regulation of autophagy by HIF-1 α in response to serum-nutrient starvation involved the BNIP3 protein. Thus, BNIP3 may not only mediate the inhibition of mTOR under hypoxia

but also the autophagy response triggered when cells are cultured under serum-nutrient starvation conditions. However, in contrast to published results (Li *et al.*, 2007; Kanzawa *et al.*, 2005), the ectopic expression of the BNIP3 Δ TM did rescue the autophagic activity in HCT1116 BaxKO shRNA HIF-1 α . The BNIP3 Δ TM mutant was shown to act as a dominant negative, to localize in cytoplasm but not at the mitochondria, as unable to dimerize and to interact with the Rheb protein but still able to bind Bcl-2/Bcl-X_L proteins (Ray *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2007; Mellor *et al.*, 2007). So the induction of autophagy by BNIP3 in response to starvation might not be linked to its interaction with Rheb, neither by inducing mitochondrial dysfunction. One can postulate that BNIP3 modulate the autophagic activity via its interaction with cytoplasmic regulators of the Beclin-1-hVps34 complex, consistent with the fact that nutrient starvation is thought to inhibit mTOR by a pathway parallel to the TSC2/Rheb axis involving the class III phosphatidylinositol-3- kinase, hVps34 (Nobukuni *et al.*, 2007).

Several regulators of the Beclin-1-hVps34 complex have been recently discovered. Liang *et al.*, have shown that the over-expression of the UV irradiation resistance-associated gene (UVRAG), a tumor suppressor that interacts directly with Beclin-1, promotes autophagy in HCT116 cells under starvation condition (Liang *et al.*, 2006). It has been hypothesize that binding of UVRAG to Beclin-1 is required to initiate the autophagic response since a mutant of UVRAG failed to interact with Beclin-1 and thus could not stimulate autophagy (Liang *et al.*, 2006). Another protein, Bif-1, was found to interact with Beclin-1 through UVRAG and to also act as a positive mediator of the hVps34 complex (Takahashi *et al.*, 2007). As UVRAG protein has a very low expression in HCT116 cells, one can imagine that UVRAG might not be present in Beclin-1-hVps34 complex in these cells (Liang *et al.*, 2006). The anti-apoptotic Bcl-2 was shown to inhibit the autophagic activity in MCF-7 Human Breast Carcinoma cells under starvation via its binding to Beclin-1 (Pattingre *et al.*, 2005). In agreement, the Bad BH3-only protein and the BH3 mimetic compound ABT737, were shown

to stimulate autophagy by competitively disrupting the interaction of Beclin-1 with Bcl-2 or Bcl-X_L proteins (Maiuri *et al.*, 2007b). Another BH3-only protein, BIK, was involved in the caspase-independent cell death with autophagic features in BCL-2 null MEFs cells (Rashmi *et al.*, 2007). One hypothesis might be that BNIP3 could stimulate the autophagic activity in HCT116 BaxKO in response to serum-nutrient starvation by releasing Beclin-1 from negative regulators. However, it remains to identify the proteins involved as Bcl-2 and Bcl-X_L do not appear as good candidates as they were both found to stimulate the pro-survival autophagy response of the HCT116-BaxKO cells under serum-nutrient starvation (Priault *et al.*, in preparation).

In conclusion, our data indicate that serum-nutrient starvation increased the transcriptional activity of HIF-1 α and demonstrate that HIF-1 α regulates the autophagic process in response to serum-nutrient starvation, involving at least the BNIP3 protein. Thus, serum-nutrient starvation and hypoxia probably contribute to cancer cell growth and survival by activating HIF-1 α , the level of expression of which was correlated with patient mortality.

Materials and methods

Cell lines and cell culture

HCT116 Bax deficient cells (colorectal carcinoma cells, HCT116-BaxKO) were provided from Dr B. Vogelstein (Baltimore, USA). HEK293FT (Human embryonaire kidney cells) was obtained from by Dr R. Breathnach (Nantes, France). All growth media are supplemented with 2mM L-glutamine, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin and 10% fetal calf serum (FCS), unless otherwise stated. HCT116 cells were grown in McCoy's 5A. HEK293FT were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) containing 4.5 g/L glucose and 0.5 g/L neomycin. All cell lines were incubated at 37°C and humidified 5% CO₂-95% air.

When autophagy was induced by amino acids and serum starvation, cells were washed twice in PBS and incubated in Earle's Balanced Salt Solution (EBSS) supplemented with 0.1% BSA, 0.1 g/L MgCl₂, 0.185 g/L CaCl₂ and 97 mg/L MgSO₄. When specified, wortmannin was added at 1 µM in EBSS medium and LY294002 at 20 µM in complete medium. Hypoxia was created by placing Petri dish in a sealed pouch containing a system able to produce an anaerocult atmosphere (Anaerocult P, Merck or BD Gas Pak EZ Gas generating pouch system, BD). Complete medium was buffered by 25mM Hepes to avoid medium acidification. Anoxic condition was validated by a color indicator. Oxygen concentration decreased continuously during the first 2 h until ~0.1% O₂ (Dang *et al.*, 2006)

HCT116-BaxKO cells were co-transfected using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) with pcDNA3 encoding or not BNIP3 and with a vector encoding for the fluorescent protein DsRed (co-transfection ratio of 10:1). This protein allows the identification of transfected cells for MDH experiments.

For cell proliferation studies, HCT116-BaxKO cells were plated in 6-wells plate and then harvested daily for 5 days and cell number and viability were measured by using blue trypan exclusion dye.

Construction of shRNAs and of vector expression BNIP3:

The shRNA-expressing cells were established using the pSIH HIV-based single promoter shRNA cloning and expression lentivectors (System Biosciences, USA) following manufacturer's protocol. Briefly, three pairs of oligonucleotides per target were synthesized by Sigma-Genosys to construct shRNAs expression vector. Oligonucleotides were annealed, phosphorylated and ligated into BamH1- and EcoRI- cut pSIH1-copGFP shRNA vector. The sequences of gene shRNA and scrambled shRNA were as follow: Beclin-1/atg6 (5'-GCATGCTCTGGCCAATAAGA-3'), HIF-1 α (5'-GCGCTGGAGACACAATCATA-3'), and BNIP3 (5'-GCCTCGGTTTCTATTTATAA-3'), VEGF (5'-GGGCAGAATCATCACGAAG-3') and as non-silencing gene control luciferase (5'-GTGCGTTGTTAGTACTAATCCTATTT-3') given by the manufacturer. HEK293FT were used as packaging cells, and virus production was done as previously described (Priault et al, in preparation). Briefly, HEK293FT cells were transfected using calcium phosphate transfection method. The culture medium containing the virus was collected 48 h after transfection and concentrated by ultracentrifugation. Titration was performed by measuring percent of infected HEK293FT cells (GFP positive cells) by flow cytometry. MOI between 2 and 4 was used for infection and experiments were performed with at least 70% infected cells. Q-PCR was performed to validate which shRNA allows the best down-regulation.

The BNIP3 gene was amplified by PCR using for BNIP3, the upstream probe 5'-ATGTCGCAGAACGGAGCGCCC-3' and the downstream probe 5'-AAAGGTGCTGGTGGAGGTTGTC-3' and for BNIP3 Δ TM, the upstream probe 5'-

ATGTCGCAGAACGGAGCGCCC-3' and the downstream probe 5'-TTTCAGAAATTCTGCAGAGAATATGCC-3'. The two amplified fragments were cloned in phase with the V5 epitope into the Topo pcDNA3-TA vector according to the manufacturer's protocol (Invitrogen). The plasmids, named pBNIP3 and pBNIP3 Δ TM were sequenced and the expression of the proteins in the transfected HCT116 BaxKO cells were checked by western blot analysis with an antibody against the V5 epitope.

Autophagy Assays

The autophagy activity was measured by labeling the autophagic vacuoles with monodansyl-pentane (MDH) as described (Niemann *et al.*, 2001). This method allows determining the autophagy activity under hypoxia and in cells that expressed the green fluorescent protein (GFP) protein due to their lentiviral shRNAs infection. Briefly, cells were grown on gelatin-coated glass cover-slips to approximately 70% confluence, transferred into EBSS for 6 h or placed under hypoxia, washed 3 times with PBS, and incubated for 30 min with 200 μ M of MDH at 37°C, 5% CO₂ in the dark. After incubation, cells were washed twice with PBS, and mounted with mowiol for immediate observation under UV (λ_{ex} =359 nm) on a Leica DMLB microscope. Digital pictures were acquired with a Leica DC 300-F camera. MDH staining is evaluated by counting at least 100 cells for six different fields for each experiment. At least three independent experiments were performed for each cell line.

Transmission Electron Microscopy (TEM) analyses of autophagy were done on fixed cells with 4% glutaraldehyde in PBS (pH 7.4), followed by 2% OsO₄ post fixation. After dehydration in a graded series of ethanol, adherent cells were embedded in Epoxy resin, and thin sections (60 to 70 nm) were cut on a Reichert Ultracut E microtome and stained with uranyl acetate and lead citrate for observation at 80 KV under a JEM-1010 transmission electron microscope (JEOL, Tokyo, Japan). Autophagic vesicles number and area were

analyzed with home-made software in order to compare autophagic capacity of HCT116-BaxKO shRNA-luciferase cells (41 cells analyzed) and HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α (33 cells analyzed).

Western Blot:

Total proteins were extracted in 1% NP-40, 0.5% sodium-deoxycholate, 0.1% SDS supplemented with protease inhibitor Mini[®] from Roche. Protein concentration was determined with Bradford kit (Biorad). Protein extracts were separated by SDS-PAGE, transferred onto a PVDF membrane (Millipore) and revealed with a chemiluminescence kit (Millipore). Primary antibodies were: mouse monoclonal anti-actin (Chemicon), rabbit polyclonal anti-4EBP-1 (Transduction laboratories), mouse monoclonal anti-Beclin-1 (BD Bioscience) and mouse monoclonal anti-V5 (Millipore). HRP-conjugated secondary antibodies were from Biorad.

Immunocytochemistry:

Cells were grown on gelatin-coated cover-slips, and placed under oxygen or serum-nutrient depletion during 16 h. Cells were then fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min, permeabilized with 0.1% SDS for 10 min, blocked with 5% gelatin for 15 min, and then incubated with the primary antibody rabbit polyclonal anti-HIF-1 α (Precision antibody) for 1h and then with the secondary Alexa-Fluor 568 nm antibody (Molecular probes) for 1h. Cells were mounted with mowiol and observed under a confocal microscope (LEICA TCS-SP1).

RNA extraction and quantitative real-time PCR:

Total RNA was extracted with RNAeasy mini kit (Qiagen) following the manufacturer's instruction (including DNase treatment to avoid possible DNA contaminations). The quality of the RNAs was assessed by analysis the 28S:18S rRNA ratio using the RNA 6000 Nano Assay kit and the Agilent 2100 bioanalyser (Agilent Biotechnologies). One microgram of RNA was retro-transcribed using Superscript transcriptase (Superscript II, Invitrogen) following the manufacturer's instruction.

Primers were designed using Amplifx software to detect mRNA coding for HIF1 α : (forward 5'-GATGACCAGCAACTTGAGGA-3' and reverse 5'-TGCAGGGTCAGCACTACTTC-3'), VEGF: (forward 5'-GGAGGGCAGAATCATCACGAAG-3' and reverse 5'-CACACAGGATGGCTTGAAGATG-3'), BNIP3: (forward 5'-CTGCAGGGCTCCTGGGTAG-3' and reverse 5'-TAGAAACCGAGGCTGGAACG-3'), for Mcl-1: (forward 5'-GCATCGAACCATTAGCAGAA-3' and reverse 5'-TGCCACCTTCTAGGTCCTCT-3'), Noxa: (forward 5'-TCCTGAGCAGAAGAGTTTGG-3' and reverse 5'-GCTGGAAGTCGAGTGTGCTA-3') and Glut1: (forward 5'-GATTGGCTCCTTCTCTGTGG-3' and reverse 5'-TCAAAGGACTTGCCCAGTTT-3'). Real time PCR was carried out using the Brilliant Sybr Green QPCR core reagent kit (Stratagene) and the thermocycler of the MX-4000 multiplex Quantitative PCR system (Stratagene). The following reaction mixture by well was used: 20 ng cDNA, Core PCR Buffer 1x, 3mM MgCl₂, 0.8mM dNTPs, 4% DMSO, 0.2 μ M primer, 0.334x Sybr Green, 75mM reference dye, 1.25U Sure-Start Taq DNA Polymerase). The cycling conditions were as follows: initial enzyme activation at 95°C for 5 min, followed by 40 cycles at 95°C for 30s, T_m for 60 s, and 72°C for 30 s. Gene-specific fluorescence was measured by a denaturation from the hybridization temperature to 95°C, 0.5 degree by 0.5 degree, for 30 s.

Quantitative normalization of cDNA in each sample was performed using rplpo and β_2 -microglobulin mRNAs as internal control. Relative quantification was carried out using the $\Delta\Delta C_t$ method.

Acknowledgements:

We are grateful to Dr Bert Volgestein (The Johns Hopkins University) for the HCT116 BaxKO cell line. We also thank Dr Valerie Trichet and Pr. R. Breathnach's team for help with virus production and Dr Paul PILET for help with the confocal microscopy. This work was supported by grants from the « Ligue contre le cancer » (Equipe labellisée Ligue), « Ligue Départementale Loire-Atlantique contre la cancer » and the « Association En Avant la Vie ».

References

1. Abedin MJ, Wang D, McDonnell MA, Lehmann U, Kelekar A (2007) Autophagy delays apoptotic death in breast cancer cells following DNA damage. *Cell Death Differ* 14: 500-510.
2. Arsham AM, Howell JJ, Simon MC (2003) A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J Biol Chem* 278: 29655-29660.
3. Brugarolas J, Lei K, Hurley RL, Manning BD, Reiling JH et al. (2004) Regulation of mtor function in response to hypoxia by redd1 and the tsc1/tsc2 tumor suppressor complex. *Genes Dev* 18: 2893-2904.
4. Daido S, Kanzawa T, Yamamoto A, Takeuchi H, Kondo Y et al. (2004) Pivotal role of the cell death factor bnip3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res* 64: 4286-4293.
5. Dang DT, Chen F, Gardner LB, Cummins JM, Rago C et al. (2006) Hypoxia-inducible factor-1alpha promotes nonhypoxia-mediated proliferation in colon cancer cells and xenografts. *Cancer Res* 66: 1684-1936.
6. Ding W, Ni H, Gao W, Hou Y, Melan MA et al. (2007) Differential effects of endoplasmic reticulum stress-induced autophagy on cell survival. *J Biol Chem* 282: 4702-4710.
7. Fingar DC, Richardson CJ, Tee AR, Cheatham L, Tsou C et al. (2004) Mtor controls cell cycle progression through its cell growth effectors s6k1 and 4e-bp1/eukaryotic translation initiation factor 4e. *Mol Cell Biol* 24: 200-216.
8. Gingras AC, Raught B, Sonenberg N (2004) Mtor signaling to translation. *Curr Top Microbiol Immunol* 279: 169-197.
9. Jung YD, Nakano K, Liu W, Gallick GE, Ellis LM (1999) Extracellular signal-regulated kinase activation is required for up-regulation of vascular endothelial growth factor by serum starvation in human colon carcinoma cells. *Cancer Res* 59: 4804-4807.
10. Kanzawa T, Zhang L, Xiao L, Germano IM, Kondo Y et al. (2005) Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein bnip3. *Oncogene* 24: 980-991.
11. Lavieu G, Scarlatti F, Sala G, Carpentier S, Levade T et al. (2006) Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. *J Biol Chem* 281: 8518-8527.
12. Li Y, Wang Y, Kim E, Beemiller P, Wang C et al. (2007) Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mtor by interacting with rheb. *J Biol Chem* 282: 35803-35813.
13. Liang C, Feng P, Ku B, Dotan I, Canaani D et al. (2006) Autophagic and tumour suppressor activity of a novel beclin1-binding protein uvrag. *Nat Cell Biol* 8: 688-699.
14. Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB et al. (2006) Hypoxia-induced energy stress regulates mrna translation and cell growth. *Mol Cell* 21: 521-531.
15. Lum JJ, Bauer DE, Kong M, Harris MH, Li C et al. (2005) Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* 120: 237-248.
16. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain J, Gautier F et al. (2007a) Functional and physical interaction between bcl-x(l) and a bh3-like domain in beclin-1. *EMBO J* 26: 2527-2539.
17. Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G (2007b) Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 741-752.

18. Meley D., Bauvy C., Houben-Weerts JHPM, Dubbelhuis PF, Helmond MJT, Codogno P, Meijer AJ. (2006). AMP-activated Protein Kinase and the regulation of autophagic proteolysis. *J.Biol.Chem* 281: 34870-34879.
19. Mellor R.H and Harris A.L. (2007). The role of the hypoxia-inducible BH3-only proteins BNIP3 and BNIP3L in cancer. *Cancer Metastasis Rev* 26: 553-566.
20. Mizushima N (2005) The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2: 1535-1541.
21. Niemann A, Baltes J, Elsasser HP (2001) Fluorescence properties and staining behavior of monodansylpentane, a structural homologue of the lysosomotropic agent monodansylcadaverine. *J Histochem Cytochem* 49: 177-185.
22. Nobukuni T, Kozma SC, Thomas G (2007) Hvps34, an ancient player, enters a growing game: mtor complex1/s6k1 signaling. *Curr Opin Cell Biol* 19: 135-141.
23. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH et al. (2005) Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit beclin 1-dependent autophagy. *Cell* 122: 927-939.
24. Pattingre S, Espert L, Biard-Piechaczyk M, Codogno P (2007) Regulation of macroautophagy by mtor and beclin 1 complexes. *Biochimie* : .
25. Petiot A, Ogier-Denis E, Blommaert EF, Meijer AJ, Codogno P (2000) Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in ht-29 cells. *J Biol Chem* 275: 992-998.
26. Pouyssegur J, Dayan F, Mazure NM (2006) Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature* 441: 437-443.
27. Ray R., Chen G., Vande Velde C., Cizeau J, Park J.H., Reed J.C., Gietz D.G. and Greeberg A.H.(2000). BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X_L and induces cell death independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J Biol Chem* 272:1439-1448.
28. Rashmi R., Pillai S.G., Vijayalingam S, Ryerse J. and Chinnadurai G. (2007). BH3-only protein BIK induces caspase independent cell death with autophagic features in *bcl-2* null cells. *Oncogene* :1-10.
29. Sarbassov DD, Ali SM, Sabatini DM (2005) Growing roles for the mtor pathway. *Curr Opin Cell Biol* 17: 596-603.
30. Sato K, Tsuchihara K, Fujii S, Sugiyama M, Goya T et al. (2007) Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Res* 67: 9677-9684.
31. Shimizu S, Kanaseki T, Mizushima N, Mizuta T, Arakawa-Kobayashi S et al. (2004) Role of bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol* 6: 1221-1228.
32. Takahashi Y, Coppola D, Matsushita N, Cuaing HD, Sun M et al. (2007) Bif-1 interacts with beclin 1 through uvrag and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol* 9: 1142-1151.
33. Tracy K, Dibling BC, Spike BT, Knabb JR, Schumacker P et al. (2007) Bnip3 is an rb/e2f target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol* 27: 6229-6242.
34. Yorimitsu T, Klionsky DJ (2005) Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2: 1542-1552.

Titles and legends to figures

Figure 1: *Hypoxia and serum-nutrient starvation induce a distinct autophagy response.*

(A) Electron micrographs of HCT116-BaxKO cells placed under normoxia in serum-nutrient starvation (EBSS) and under hypoxia in complete medium (CM) for 6 h. Black arrows depict representative autophagosomes and white arrows depict mitochondria.

(B) HCT116-BaxKO cells were analyzed for their MDH staining after 6 h of cultured under normoxia in complete medium (CM) or in EBSS medium (EBSS) or under hypoxia in complete medium (Hypoxia). Data are the mean (\pm SD) of at least 4 independent experiments.

Figure 2 : *HIF-1 α transcriptional activity was strongly increased in response to serum-*

nutrient starvation(A) mRNA level analysis of HIF-1 α , VEGF, Noxa, BNIP3, Mcl-1 and Glut-1 by quantitative PCR has been performed by using Sybr green method. HCT116-BaxKO cells were cultured under normoxia in EBSS medium (E9H and E16H) or under hypoxia in complete medium during 9 h or 16 h before RNA extractions (A9H and A16H) (B) Immunocytochemistry of endogenous HIF-1 α in HCT116-BaxKO cells grown under normal conditions (CM), starved (EBSS) or placed under hypoxia (Hypoxia) during 16 h.(C) For cell proliferation studies, HCT116-BaxKO cells were plated in 6-wells plate and then harvested daily for 5 days and cell number and viability was measured using trypan blue exclusion dye (D) mRNA analysis of HIF-1 α and BNIP3 by Q-PCR in HCT116-BaxKO cells and HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α cells cultured (shHIF-1 α) in EBSS medium during 9 h or 16 h before RNA extractions (E9H and E16H). (A) and (D) Relative quantification of mRNA level in cells placed under hypoxia or serum-nutrient depletion were determined by reference to the mRNA level measured in cells placed in complete medium.

Figure 3 : *Silencing of HIF-1 α affects the autophagy activity in response to serum-nutrient starvation*

(A) HCT116-BaxKO shRNA-luciferase (shLuciferase) and HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α (shHIF-1 α) cells were analyzed for their MDH staining after 6 h of culture in complete (CM) or in EBSS medium and under 6 h of hypoxia. Data are the mean (\pm SD) of at least 3 independent experiments. A Student test was applied for statistic analysis.

(B/C) Computer-assisted analyses were performed to determine the number and the area of TEM-autophagic vacuoles. 41 whole HCT116-BaxKO shRNA-luciferase cells (shLuciferase) and 33 whole HCT116-BaxKO shRNAHIF-1 α cells (shHIF-1 α) were analyzed. The distribution of the number (B) and of the area (C) of vacuoles per cell was plotted by intervals of 10 and 500 pixel² respectively and the frequency of occupation of these intervals labeled (% of cells).

(D) Western Blot showing 4EBP-1 profile in HCT116-BaxKO cells (parental) and in HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α cells (shHIF-1 α) cultured in complete medium (CM), in EBSS medium during 9 h (E9) or placed 9 h in hypoxia (A9). HCT116-BaxKO cells were cultured during 9 h in EBSS medium containing 1 μ M of Wortmannin (W) or in complete medium containing 20 μ M of LY294002 (LY). 100 μ g protein extracts were loaded on an 18% SDS-PAGE.

Figure 4: *BNIP3 is involved in the autophagic activity in response to serum-nutrient starvation*

(A) mRNA analysis of VEGF and BNIP3 by Q-PCR in HCT116-BaxKO cells, in HCT116-BaxKO shRNA-VEGF cells or in HCT116-BaxKO shRNA-BNIP3 cells cultured in EBSS medium during 9 h before RNA extractions (B) Western Blot showing Beclin-1 protein expression was performed in HCT116-BaxKO shRNA-luciferase (shLuciferase) and HHCT116-BaxKO shRNA-Beclin-1 (sh Beclin-1) cells. (C) HCT116-BaxKO shRNA-

luciferase (shLuciferase), HCT116-BaxKO shRNA-VEGF (shVEGF), HCT116-BaxKO shRNA-BNIP3 (shBNIP3), HCT116-BaxKO shRNA-Becclin-1 (shBecclin-1), HCT116-BaxKO shRNA-BNIP3/shRNA-luciferase (shBNIP3 shLuciferase) and HCT116-BaxKO shRNA-BNIP3/shRNA-HIF-1 α (shBNIP3+shHIF-1 α) cells were analyzed for their MDH staining after 6 h of culture in complete (CM) or in EBSS medium. Data are the mean (\pm SD) of at least 3 independent experiments. A Student test was applied for statistic analysis.

Figure 5: *BNIP3 rescues the autophagic activity in response to serum-nutrient starvation in HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α cells*

(A) Ectopic BNIP3 protein expression in HCT116-BaxKO shRNA-luciferase (shLuciferase) transfected by with either the empty vector (vector) or either the vectors allowing the constitutive expression of BNIP3 (pBNIP3) or of BNIP3 Δ TM (pBNIP3 Δ TM) was detected by western blot analysis with an antibody against the V5 epitope. (B) HCT116-BaxKO shRNA-HIF-1 α were transiently co-transfected with a pDsRed vector allowing the expression of the Red fluorescent protein and with either the empty vector (vector) or either the vectors allowing the constitutive expression of BNIP3 (pBNIP3) or of BNIP3 Δ TM (pBNIP3 Δ TM). Fluorescent cells were analyzed for their MDH staining after 6 h of culture in complete (CM) or in EBSS medium. Data are the mean (\pm SD) of 3 independent experiments. A Student test was applied for statistic analysis.

Figure 1A :

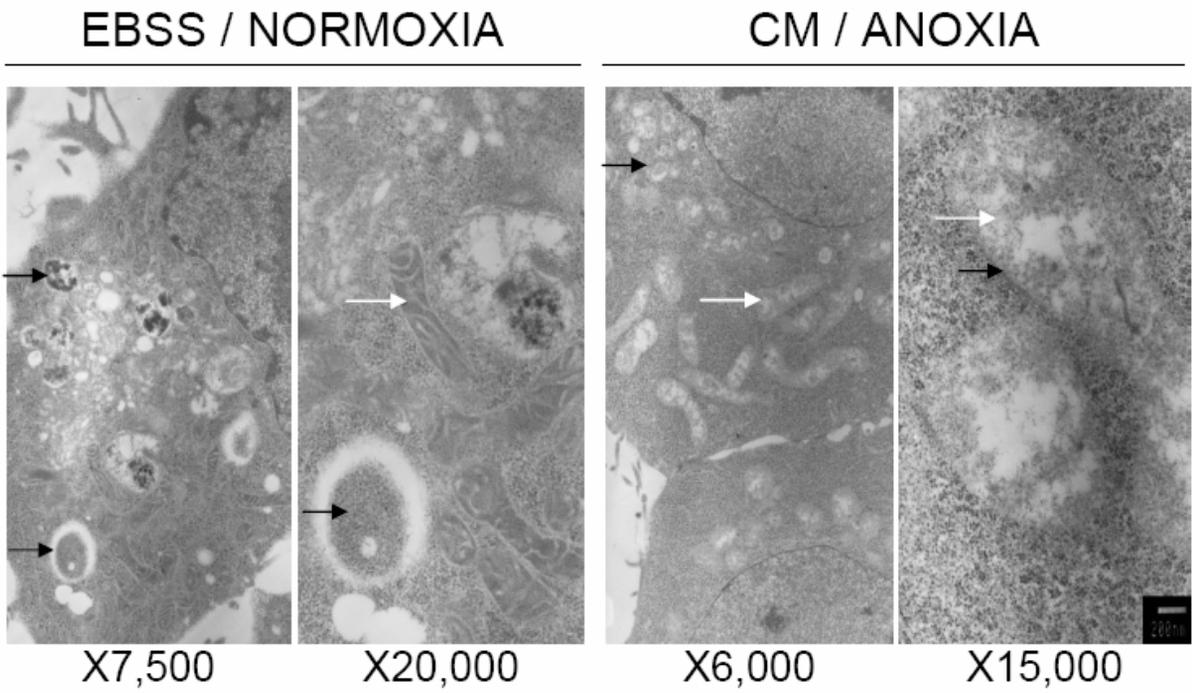


Figure 1B :

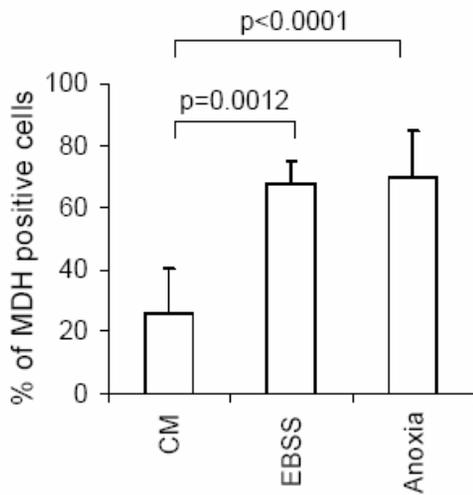


Figure 2A

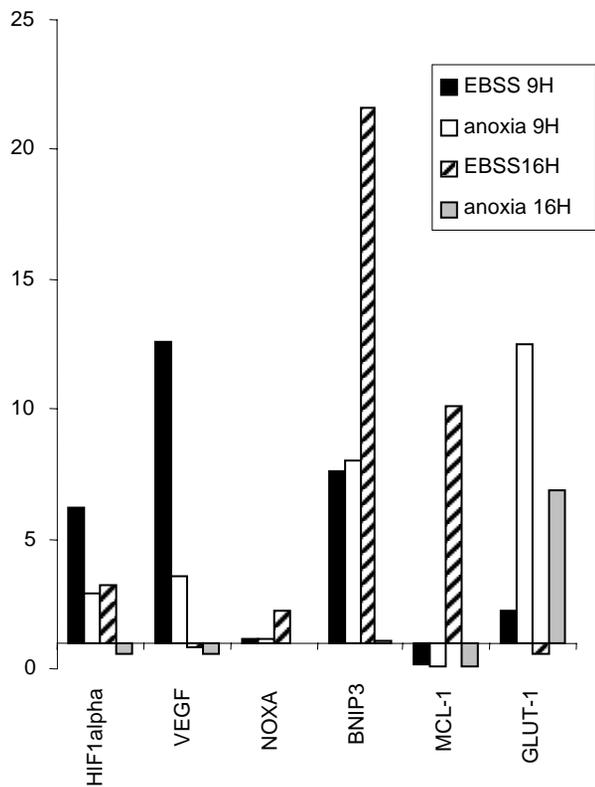


Figure 2B

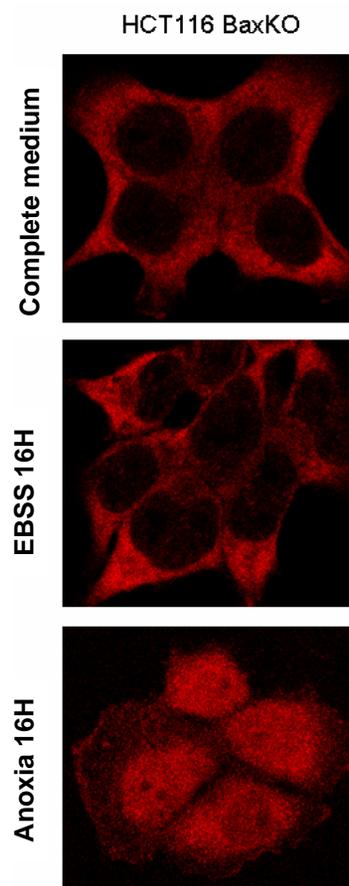


Figure 2C

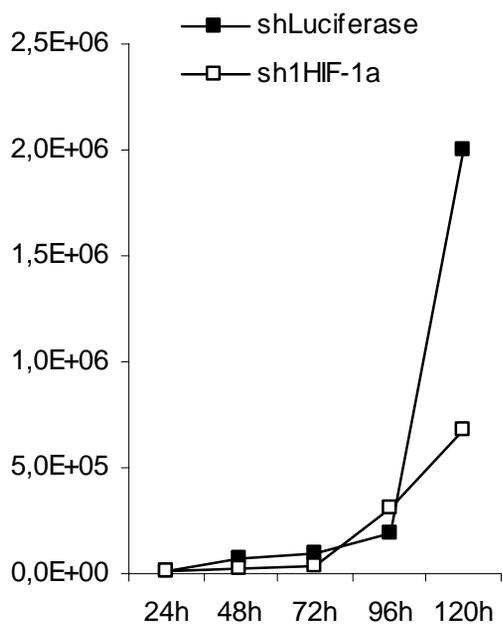


Figure 2D

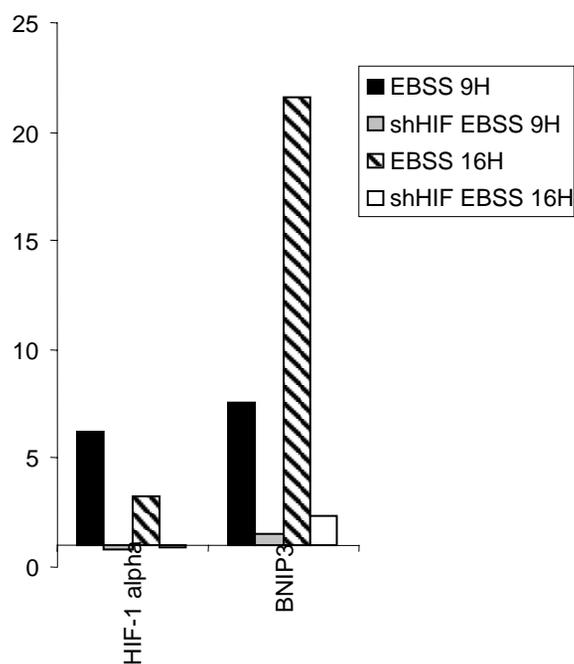


Figure 3A

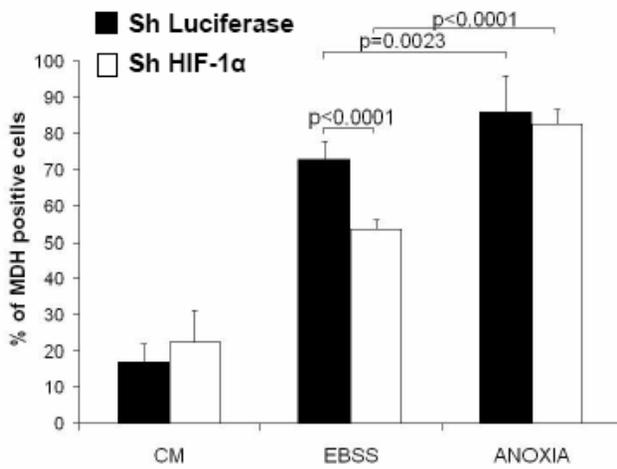


Figure 3B

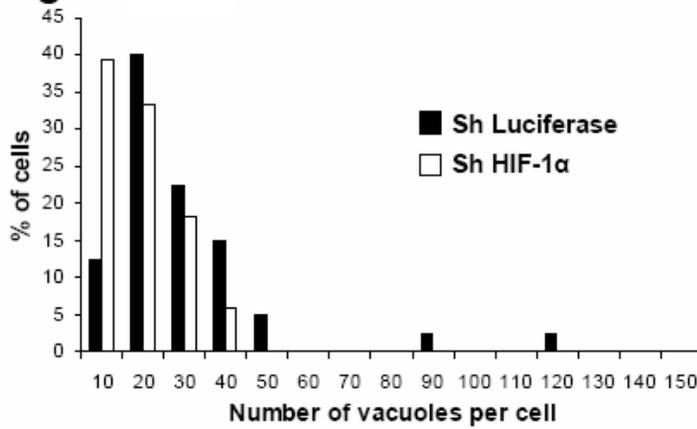


Figure 3C

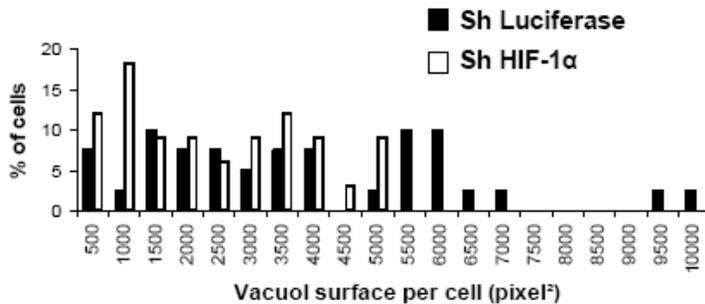


Figure 3D

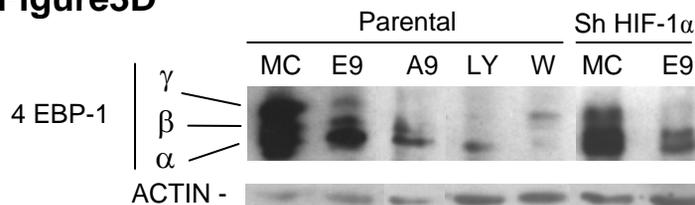


Figure 4A

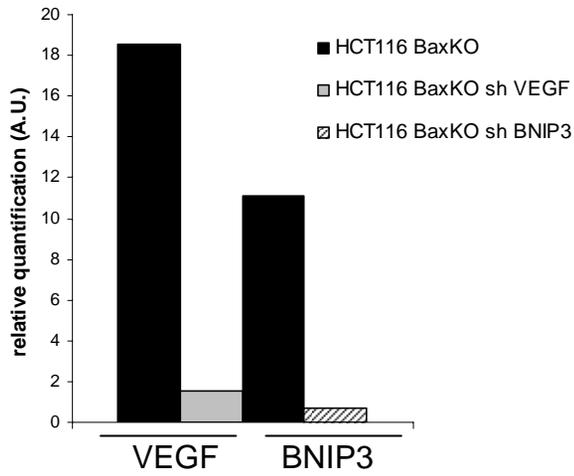


Figure 4B

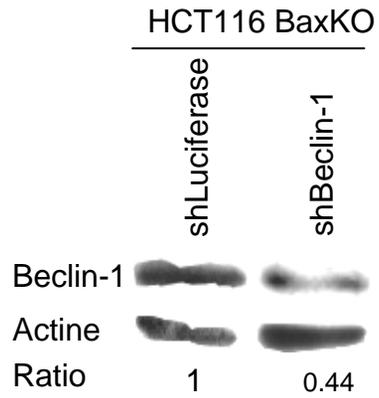


Figure 4C

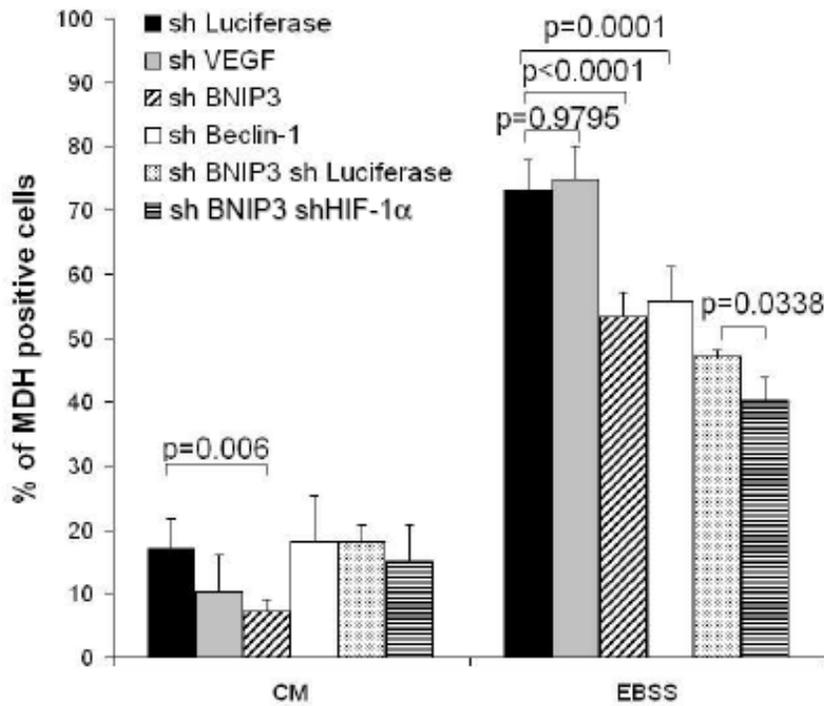


Figure 5A

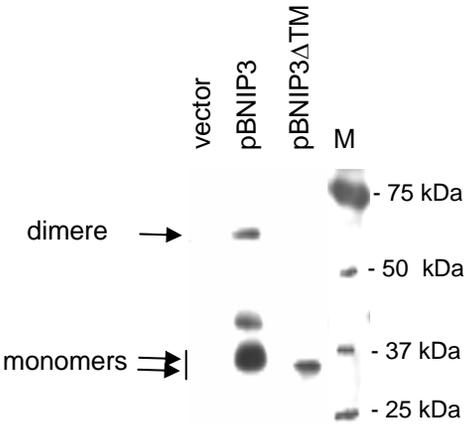
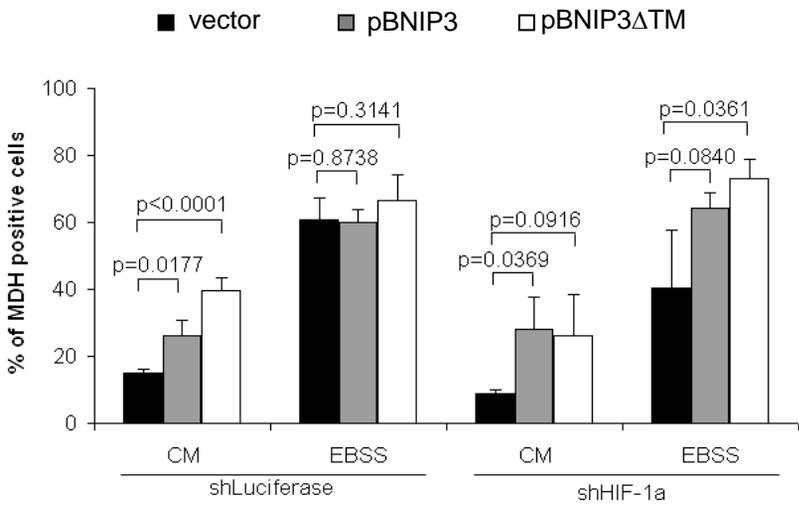


Figure 5B



III. Étude de la régulation de l'autophagie et de HIF-1 α

3.1. p53 n'est pas impliquée dans la régulation de l'autophagie induite par une carence nutritive dans les HCT116 Bax $^{-/-}$

La protéine p53 est décrite comme étant indispensable à l'inhibition de mTOR et donc à l'initiation de l'autophagie des HCT116 (Feng *et al.*, 2005). Elle apparaît également impliquée dans la régulation de l'activité de HIF-1 α (Ravi *et al.*, 2000; Schmid *et al.*, 2004).

Il est alors apparu intéressant d'évaluer la capacité des cellules HCT116 déficientes en p53. Afin d'étudier le rôle de p53 dans le même contexte cellulaire, ces cellules ont été rendues Bax déficientes par shARNs. La sous-expression a été validée par immuno-empreinte et par mesure de la survie cellulaire à une carence nutritive (cf. *Figure 48*).

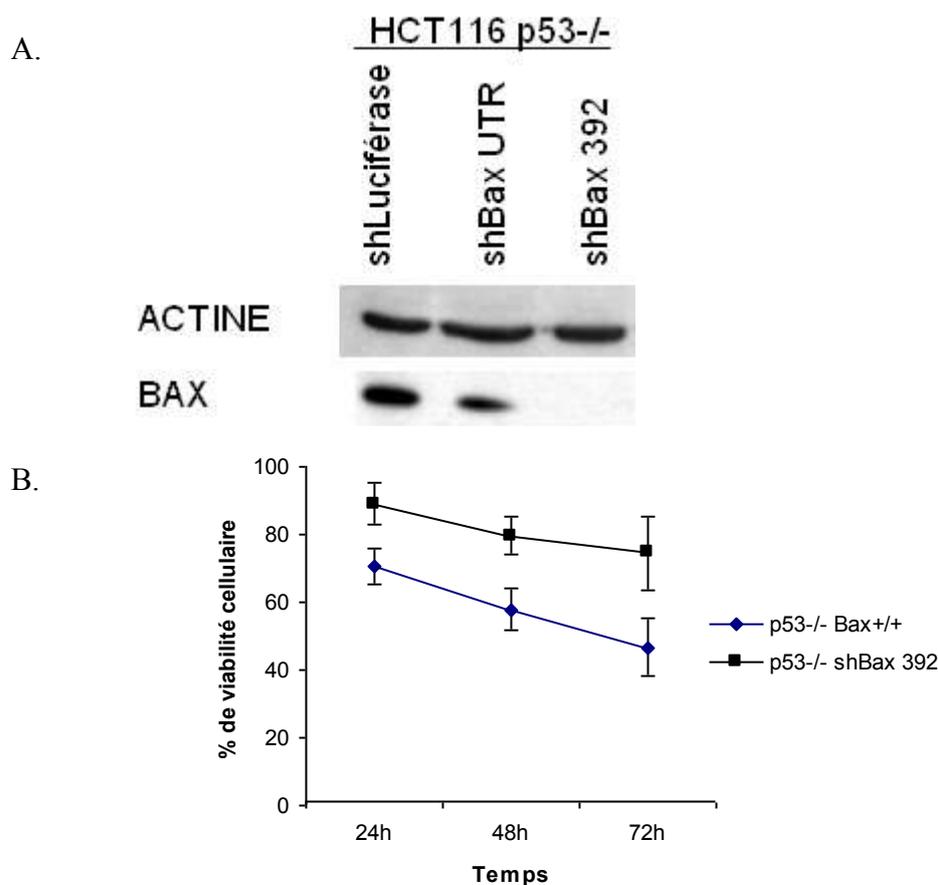


Figure 48 : Validation de l'extinction de Bax dans la lignée HCT116 p53 $^{-/-}$ par immuno-empreinte (A) et par mesure de la survie cellulaire lors d'une carence nutritive (B).

La mesure de la capacité autophagique a été réalisée par mesure de la dégradation des protéines à longue durée de vie (protéolyse) et par marquage des vacuoles autophagiques avec le MDH (cf. *Figure 49*). Aucune diminution de l'activité autophagique n'a pu être mise en évidence dans les cellules HCT116 p53^{-/-} shBax392 par rapport aux cellules HCT116 p53^{+/+} Bax^{-/-}. Par ailleurs, afin de confirmer l'inhibition de mTOR dans les cellules p53^{-/-}, une immuno-empreinte contre 4EBP1 a été réalisée et présente la même diminution du niveau de phosphorylation de 4EBP1 ce qui indique que mTOR est bien inactive (cf. *Figure 49*).

Cela est légèrement en désaccord avec la littérature qui décrit que p53 serait responsable de l'inhibition de mTOR lorsqu'il est activé par un dommage à l'ADN (étoposide, doxorubicine) ou une carence en glucose, ce qui ne correspond pas à nos conditions de carence (Feng *et al.*, 2005). En effet, il semble que dans l'autophagie de survie induite par une carence en sérum et en acides aminés dans les cellules cancéreuses colo-rectales, l'inhibition de mTOR est indépendante de p53 ou que p53 ne soit pas indispensable à son inhibition étant donné que l'absence de facteur de croissance et d'acides aminés sont deux signaux suffisants pour provoquer son inhibition.

Une récente étude a montré qu'un homologue de p53, p73, peut être activé suite à un dommage à l'ADN et que comme p53, il puisse activer DRAM et réguler l'autophagie. Son rôle dans la régulation de l'autophagie est cependant indépendant de DRAM. Par ailleurs, un mutant dominant négatif de p73 capable d'inhiber l'autophagie régulée par p53 et p73 n'a aucun effet sur l'autophagie induite par une carence en acides aminés. Les auteurs suggèrent également qu'il existe des différences importantes entre l'autophagie induite par l'activation de p53 et p73 et celle induite par une carence nutritive (Crighton *et al.*, 2007). Ces données pourraient donc expliquer l'absence de rôle de p53 dans les cellules HCT116 Bax^{-/-} soumises à une carence nutritive.

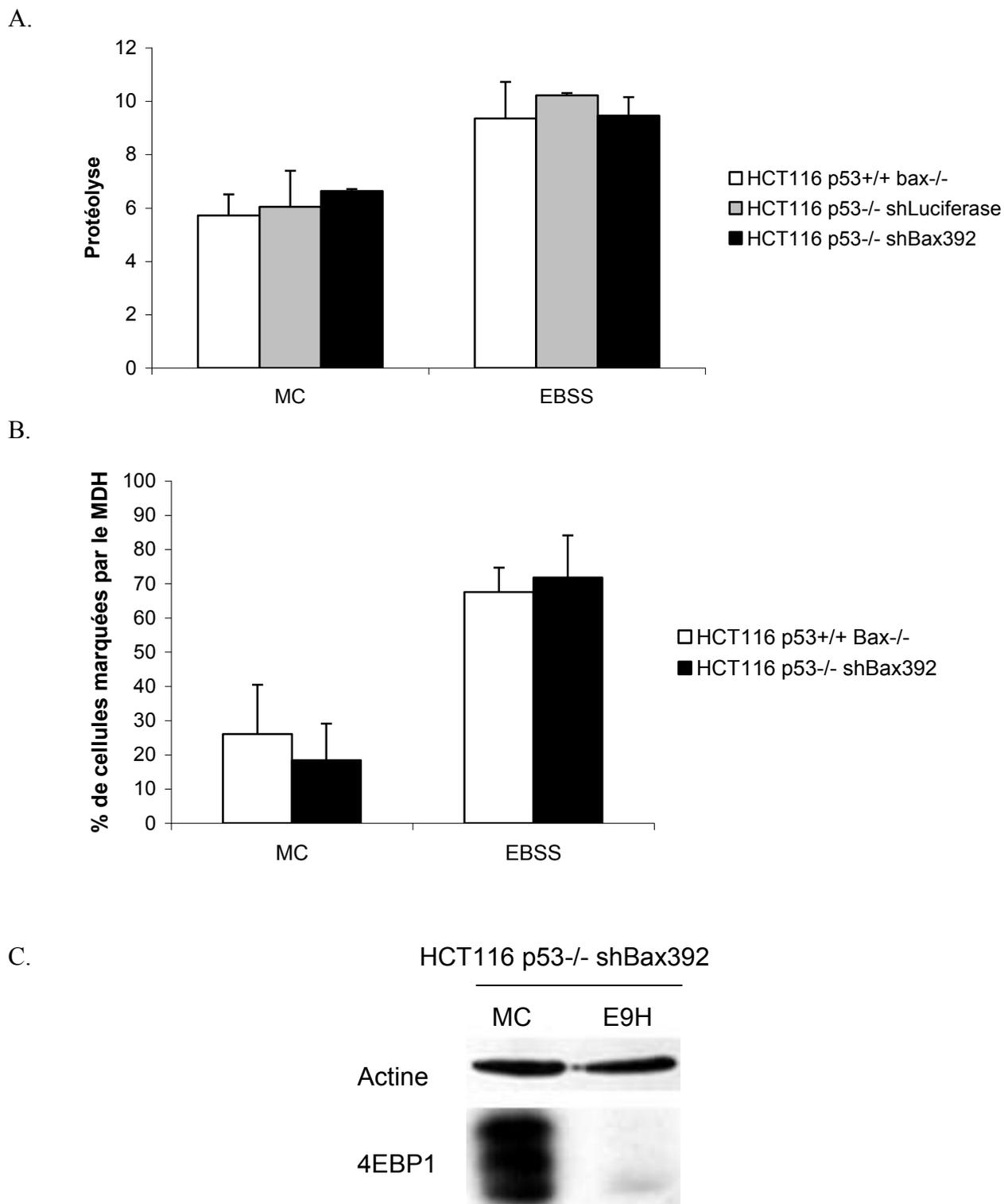


Figure 49 : Mesure de l'activité autophagique des HCT116 déficientes en p53. A. Protéolyse des HCT116 p53+/+ Bax-/-, des HCT116 p53-/- Bax+/+ (shLuciférase) et des p53-/- shBax392. B. Mesure du marquage des autophagosomes avec le MDH dans les HCT116 p53+/+ bax-/- et p53-/- shBax392. C. Immuno-empreinte contre 4EBP1 dans les cellules HCT116 p53-/- shBax392 en milieu complet et lors d'une carence nutritive de 9 h.

3.2. Etude des voies de signalisation impliquées dans la régulation de l'activité d'HIF-1 α dans la réponse autophagique induite par une carence nutritive

De nombreuses kinases peuvent être impliquées dans l'activation d'HIF-1 α dont les PI3K/Akt. L'autophagie étant également régulée par la voie des PI3-Kinases, il nous a semblé intéressant d'étudier l'effet de l'inhibition de différentes kinases sur l'autophagie et sur l'expression d'HIF-1 α et de ses cibles afin de tenter de déterminer quelle voie est majoritairement impliquée dans la réponse autophagique et de type hypoxique des HCT116 soumises à une carence nutritive (cf. *Figure 50*).

L'inhibition des PI3-Kinases par le LY294002 provoque une diminution de la capacité autophagique des cellules HCT116 Bax^{-/-} couplée à une diminution de l'expression d'HIF-1 α et de ses cibles. Ces données sont conformes à la littérature. En effet, les PI3-Kinases régulent positivement l'expression d'HIF-1 α . Par ailleurs, les inhibiteurs des PI3-Kinases tels que le LY294002 sont décrits comme pouvant provoquer l'inhibition de l'autophagie.

L'inhibition des MAPK par le PD98059 induit une diminution de la dégradation des protéines à longue durée de vie. Par ailleurs, l'inhibition de MAPK provoque une forte diminution de l'expression de HIF-1 α ainsi que de ses cibles.

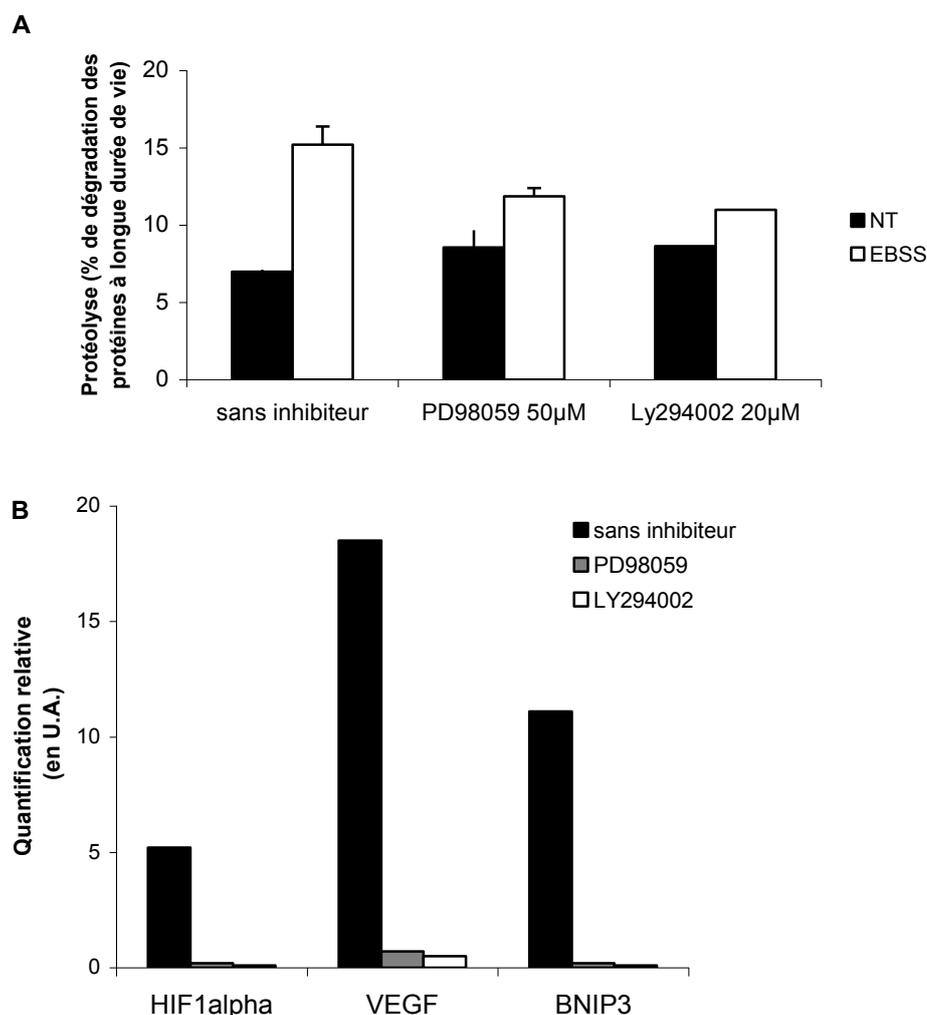


Figure 50 : Effet de l'inhibition des MAPK et des PI3-kinases sur la capacité autophagique et sur l'activité d'HIF-1 α dans la lignée HCT116 Bax $^{-/-}$. A. Protéolyse en milieu complet et en milieu carencé pendant 9 h en présence ou en absence de ces inhibiteurs. B. Quantification relative de l'expression d'*Hif-1 α* , de *Bnip3* et de *Vegf* par Q-PCR (EBSS 9 h).

Ces résultats suggèrent que les MAPK et les PI3-Kinases sont impliquées dans la sur-expression d'HIF-1 α suite à une carence nutritive. En 2007, Comes *et al.* ont mis en évidence l'importance d'une MAPK, p38 dans le contrôle de l'autophagie et la mort cellulaire. L'inhibition de p38 induisait un arrêt du cycle et de l'autophagie, l'inhibition de cette autophagie provoquant une augmentation de la mort cellulaire par apoptose (Comes *et al.*,

2007). Nos résultats sont donc en légère contradiction avec cette étude. Mais il est à noter que dans notre cas, nous n'inhibons pas spécifiquement la p38 mais l'ensemble des MAPK par le PD98059. Par ailleurs, ces résultats doivent être approfondis. En effet, il est important de connaître les mécanismes mis en jeu afin de savoir si c'est l'absence de sur-expression d'HIF-1 α suite à une carence nutritive qui est responsable de la diminution de la capacité autophagique ou si l'inhibition des MAPK joue un rôle plus direct sur l'autophagie.

DISCUSSION

DISCUSSION

Nous avons montré que, dans la lignée cancéreuse colo-rectale HCT116 Bax^{-/-} déficiente pour l'apoptose, la carence en sérum et en acides aminés induit deux processus de survie : l'autophagie d'une part et une réponse de type hypoxique d'autre part. Cette autophagie de survie apparaît comme régulée par les protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL et par le facteur de transcription HIF-1 α . Le rôle de Bcl-2 et Bcl-xL dans la régulation de l'autophagie n'est plus à démontrer mais les modalités exactes de leur action restent à préciser. HIF-1 α participerait également à la régulation de l'autophagie induite par une carence nutritive mais pas à celle induite par l'hypoxie sévère. La protéine apoptotique, BNIP3, cible transcriptionnelle d'HIF-1 α , semble être responsable de la modulation de l'autophagie observée lors d'une carence nutritive. Ces données confortent l'importance des protéines apoptotiques de la famille de Bcl-2 dans la régulation d'un autre processus cellulaire pouvant aboutir à la mort ou la survie cellulaire. Pour autant, les mécanismes impliqués dans ces processus ne sont actuellement pas totalement élucidés.

L'autophagie, un avantage sélectif dans un environnement carencé

La dualité de finalité de l'autophagie (pro-survie ou pro-mortalité) est, dans la lutte anti-cancéreuse, une question brûlante qui n'est pas encore résolue. Alors que les activateurs de l'autophagie sont connus pour être des suppresseurs de tumeurs et que ses inhibiteurs des oncogènes, les mécanismes anti-tumoraux de ce processus ne sont pas établis. Par ailleurs, il a été démontré que l'autophagie pouvait favoriser la survie ou alors promouvoir la mort cellulaire lors d'une carence nutritive, fréquente au sein des tumeurs, lors de radiations ou lors de traitements chimiothérapeutiques de cellules résistantes à l'apoptose (Levine, 2007). Il est

difficile de prédire l'effet de l'induction de l'autophagie. En effet, l'autophagie semble être un processus de survie ou de mort cellulaire selon : le type cellulaire, sa compétence pour l'apoptose et le stress induit. D'autres études sont nécessaires pour cerner plus précisément le rôle pro-mortalité de l'autophagie ainsi que pour connaître les causes qui orientent ce processus de survie en processus de mort cellulaire. Par ailleurs, les mécanismes moléculaires impliqués dans ces deux types d'autophagie ne seraient pas tout à fait identiques, expliquant les résultats parfois divergents concernant la régulation de l'autophagie. Il apparaît alors comme essentiel de caractériser le type d'autophagie provoqué selon le modèle choisi afin de confronter efficacement ses propres résultats aux résultats déjà publiés.

Nous avons donc montré que la carence nutritive en sérum et en acides aminés provoque dans la lignée cancéreuse HCT116, déficiente pour l'apoptose, une autophagie de survie. Cette autophagie de survie a pu être mise en évidence par la présence de cellules dans un état particulier de stase. Cet état est caractérisé à la fois par le fait que les cellules peuvent à nouveau proliférer lors d'une remise en culture en milieu complet, et aussi par le fait qu'il est fortement réduit lors de l'inactivation de l'autophagie. Par ailleurs, l'inhibition de l'autophagie de survie provoque une augmentation de la mort cellulaire. Il a récemment été publié que, dans différentes lignées de cancer colo-rectal, une carence en acides aminés induit une réponse autophagique assurant la survie des cellules tumorales dans un environnement austère (Sato *et al.*, 2007).

Carence nutritive et réponse de type hypoxique

Nous avons également démontré que la carence nutritive provoque une réponse de type hypoxique dans les cellules colo-rectales HCT116. Le défaut de vascularisation provoqué par la croissance incontrôlée des cellules cancéreuses aboutit à la création d'un

environnement pauvre en oxygène et en nutriments. Il semble finalement assez pertinent qu'une carence nutritive puisse induire une réponse de type hypoxique déclenchant l'angiogénèse et donc assurant l'apport de nutriments ainsi que la survie cellulaire.

De façon plus intéressante, nous avons montré que le facteur de transcription régulant la réponse à l'hypoxie, HIF-1 α , est également impliqué dans la régulation de l'autophagie. Il est à noter que ce facteur est déjà connu pour participer à la balance entre survie ou apoptose dans des conditions d'hypoxie (Piret *et al.*, 2002). Nous avons montré que le gène *hif-1 α* est sur-exprimé lors d'une carence nutritive, mais que la protéine ne semble pas stabilisée puisque ne s'accumulant pas dans les cellules. Sa localisation cellulaire semble majoritairement cytoplasmique mais HIF-1 α est pourtant effectivement responsable de la sur-expression de différentes cibles dont *Vegf* et *Bnip3*.

Afin de comprendre plus précisément le mode d'action d'HIF-1 α dans des conditions de carence nutritive, il aurait été tout d'abord intéressant d'étudier l'activité des prolyl- et asparagyl-hydroxylases, éléments clés dans la régulation de sa stabilité. Etant donné que la protéine ne s'accumule pas lors de carence nutritive, on peut émettre l'hypothèse que l'activité des PHD/FIH est conservée mais dépassée par la forte sur-expression d'*hif-1 α* . Cela permettrait d'expliquer qu'une partie puisse être importée dans le noyau et responsable de son activité transcriptionnelle. Par ailleurs, HIF-1 α est peut-être rapidement exportée du noyau ce qui justifierait qu'on ne puisse observer son accumulation nucléaire. Il a été montré que la phosphorylation des sérines 641 et 643 par les MAPK est importante pour inhiber son export (Mylonis *et al.*, 2006). L'inhibition des MAPK induit dans les HCT116 une forte diminution de l'expression d'HIF-1 α ainsi que celle de ses cibles, et une diminution de la capacité autophagique. La multiplicité des réponses obtenues n'a pas permis de conclure quant au rôle dans l'inhibition de l'export nucléaire par les MAPK.

Autophagie et protéines apoptotiques de la famille de Bcl-2

Les années 2000 ont vu naître un intérêt croissant pour la régulation de l'autophagie. En effet, les cellules cancéreuses étant le plus souvent résistantes à l'apoptose, il semblait prometteur d'identifier les mécanismes permettant la conversion de l'autophagie de survie en mort autophagique. De nombreux régulateurs ont été mis en évidence, dont une famille de protéines déjà impliquée dans la régulation d'un processus de mort cellulaire : les protéines de la famille de Bcl-2. Nous avons d'abord étudié le rôle de la protéine pro-apoptotique Bax dans la régulation de l'autophagie de survie. Nous avons remarqué que l'absence ou la présence de Bax ne modifiait pas la capacité autophagique de la lignée cancéreuse colo-rectale HCT116 (Priault *et al.*). Bax ne semblait donc jouer aucun rôle dans l'autophagie de survie. Afin d'étudier la fonction autophagique des membres anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, nous avons donc choisi d'utiliser la lignée HCT116 Bax^{-/-}, déficiente pour l'apoptose. Il est à noter que, bien que Bax n'intervienne pas directement dans la régulation de l'autophagie, son absence peut modifier l'organisation et la localisation de certaines protéines apoptotiques dont Bcl-2 et Bcl-xL, connues pour interagir avec lui et l'inhiber. Contrairement aux données récentes de la littérature (Patingre *et al.*, 2005; Maiuri *et al.*, 2007), nous avons montré que Bcl-2 et Bcl-xL participent à la régulation positive de l'autophagie. Il est à noter que Shimizu *et al.* ont démontré que suite à un stimulus apoptotique, Bcl-xL régulait positivement la mort autophagique de MEF déficients pour l'apoptose (Shimizu *et al.*, 2004). La sur-expression de Bcl-2 et Bcl-xL augmente la capacité protéolytique des HCT116 en stimulant le nombre et la taille des autophagosomes. L'effet de leurs sous-expressions est très marqué pour Bcl-xL et moindre pour Bcl-2 mais a pour conséquence de diminuer la capacité autophagique des cellules HCT116 (Priault *et al.*). Il est actuellement décrit que Bcl-2 jouerait un rôle inhibiteur de l'autophagie en séquestrant Beclin-1 loin du complexe PI3-Kinases/hVPS34 (Patingre *et*

al., 2005; Liang *et al.*, 2006). Plus précisément, la carence nutritive permettrait la dissociation du complexe Beclin-1/Bcl-2 en faveur du complexe Beclin-1/hVPS34. Parallèlement la protéine UVRAG pourrait faciliter cette interaction et également promouvoir l'autophagie. Il est à noter que Beclin-1 possède 4 domaines : un de liaison avec Bcl-2/Bcl-xL (acides aminés 88-150), un en faisceau d'hélices (*coil-coiled*) responsable de son interaction avec UVRAG (AA 150-244), un très conservé évolutivement (ECD) responsable de son interaction avec hVPS34 (AA 244-337) et un dernier, signal d'export nucléaire (AA 180-190). Afin de comprendre pourquoi, dans les HCT116, la carence nutritive induit une autophagie régulée positivement par Bcl-2 et Bcl-xL, nous avons étudié les interactions de Beclin-1 avec Bcl-2 et Bcl-xL, ainsi que la localisation de ces différents partenaires. Par co-immuno-précipitation, l'interaction de Bcl-2 et Beclin-1 endogènes a pu être mise en évidence, et la carence nutritive ne semble pas modifier cette interaction. Par contre, nous n'avons pas pu retrouver l'interaction entre Bcl-xL et Beclin-1. Par immuno-cytochimie et par fractionnement subcellulaire, nous avons remarqué que ces trois protéines sont présentes au sein des mitochondries et dans le cytoplasme (Priault *et al.* et données non montrées). L'interaction entre Bcl-xL et Beclin-1 n'est donc pas impossible mais pourrait être très transitoire, ce qui expliquerait qu'on ne puisse pas la retrouver par co-immuno-précipitation. Dans les cellules HCT116 décrites comme possédant une mutation rendant UVRAG monoallélique, le niveau de cette protéine est relativement faible (Liang *et al.*, 2006), alors que Beclin-1, Bcl-2 et Bcl-xL sont fortement exprimés. Il a déjà été suggéré qu'il puisse exister deux types de complexes hVSP34 pouvant expliquer la stimulation aussi bien par l'absence que la présence d'acides aminés. Il pourrait très bien exister également un autre type de complexe composé des différents partenaires en proportions peut-être différentes, ou encore un complexe plus transitoire qui permettrait la régulation positive de l'autophagie de survie induite par une carence nutritive. D'autres recherches sont nécessaires afin de totalement élucider ce

paradoxe. Une nouvelle protéine, Bif-1 (également appelée Endophilin B1 et SH3GLB1), vient d'ailleurs d'être identifiée comme interagissant avec Beclin-1 lors d'une carence nutritive *via* sa liaison avec UVRAG. Elle pourrait promouvoir la formation des autophagosomes et la mort autophagique (Takahashi *et al.*, 2007). Il est intéressant de noter que cette protéine avait initialement été découverte au titre de protéine pouvant interagir avec Bax. Tout ceci souligne que les processus régulant l'autophagie sont loin d'être totalement clarifiés. Cela appuie, une fois encore, les interconnexions entre apoptose et autophagie *via* les protéines de la famille Bcl-2.

Les protéines anti-apoptotiques ne sont pas les seuls membres de la famille de Bcl-2 à pouvoir réguler l'autophagie. En effet, il a été récemment décrit que certaines protéines à un unique domaine BH3 (« *BH3-only* ») puissent également y participer. Bad ainsi que le BH3 mimétique ABT737 sont capables de déplacer l'interaction entre le domaine BH3 de Beclin-1 et les domaines BH1/BH2 de Bcl-2/Bcl-xL (Maiuri *et al.*, 2007). Il est à noter que Beclin-1 est une protéine à BH3 particulière car aucun rôle apoptotique n'a pu lui être jusqu'à présent imputé. Nous avons également montré que la carence nutritive induit une réponse autophagique principalement régulée par la protéine apoptotique BNIP3, cible d'HIF-1 α . BNIP3 est une protéine à domaine BH3 atypique puisque celui-ci ne semble pas impliqué dans la mort apoptotique. BNIP3 a déjà été décrite comme impliquée dans la mort autophagique induite par différents traitements et par l'hypoxie (Daido *et al.*, 2004; Kanzawa *et al.*, 2005)). Nous avons démontré que le domaine transmembranaire de BNIP3, assurant sa localisation mitochondriale et sa dimérisation, ne semble pas indispensable à son rôle dans l'autophagie de survie, contrairement à ce qui est décrit dans la mort autophagique (Kanzawa *et al.*, 2005). La forme tronquée de BNIP3 est connue comme étant un dominant négatif. Lorsque BNIP3 est sur-exprimée, on peut remarquer la présence de la forme pleine longueur

mono- ou dimérique et de cette forme tronquée dans les HCT116. Il semblerait que, dans nos conditions, la perte de ce domaine, pourtant essentiel à sa dimérisation et à sa localisation, ne semble pas inhiber son action pro-autophagique. Il est à noter que Ray *et al.* ont démontré qu'un domaine en NH2 terminal (1-49) peut être suffisant pour permettre la liaison avec Bcl-xL (Ray *et al.*, 2000). Il aurait été intéressant de vérifier cette interaction dans nos conditions et/ou d'identifier de nouveaux partenaires afin d'expliquer son rôle dans l'autophagie de survie.

Régulation de l'autophagie par mTOR

Nous avons également voulu comprendre si la diminution de l'autophagie induite par une carence en l'absence d'HIF-1 α et/ou de sa cible BNIP3 était due à une ré-activation de mTOR. En effet, HIF-1 α , dans des conditions d'hypoxie est décrite comme pouvant inhiber mTOR *via* Redd1/Redd2 (Brugarolas *et al.*, 2004). Par ailleurs, BNIP3 a récemment été décrite comme impliquée dans l'inhibition de Rheb et donc de mTOR en hypoxie (Li *et al.*, 2007). Nous avons mis en évidence que mTOR est toujours inactive dans les cellules shHIF-1 α qui n'expriment ni *Hif-1 α* ni *Bnip3*. Conformément à la littérature, lors d'une carence nutritive en sérum et en acides aminés, l'inhibition des PI3-Kinases et d'Akt ainsi que l'activation du complexe hVSP34 sont suffisantes à l'inactivation de mTOR. Mais cela ne permet pas d'affirmer qu'HIF-1 α ne participe pas du tout à son inhibition. Cela suggère également que l'inhibition de l'autophagie provoquée par l'absence d'HIF-1 α et/ou de BNIP3 a lieu au niveau d'étapes de régulation plus en aval de mTOR.

Autophagie induite par l'hypoxie sévère et par une carence nutritive

Nous avons remarqué que l'absence d'HIF-1 α ainsi que celle de Beclin-1 dans des conditions d'hypoxie n'induisent pas de diminution de la capacité autophagique des cellules HCT116. L'inhibition de mTOR par l'hypoxie a déjà été décrite comme pouvant être indépendante d'HIF-1 α (Liu *et al.*, 2006). Par ailleurs, la sous-expression de Beclin-1 n'étant pas totale, on peut imaginer que dans des conditions d'hypoxie, le peu de Beclin-1 restant soit suffisant pour la régulation de l'autophagie. Cela laisse surtout à penser que les mécanismes régulant l'autophagie induite par une carence nutritive et par l'hypoxie ne soient pas tout à fait les mêmes. C'est assez cohérent avec les images de microscopie électronique qui montrent un profil autophagique assez différent dans les deux conditions. En effet, les vacuoles « typiquement autophagiques » sont plus réduites en nombre dans des cellules en hypoxie, alors que des structures plus larges apparaissent, dégradant potentiellement des mitochondries. Ces régulations semblant différentes, nous avons préféré nous concentrer sur la régulation de l'autophagie induite par la carence nutritive plutôt que sur celle induite par l'hypoxie. Comme aucune diminution de l'autophagie n'est observée en hypoxie dans les cellules shHIF-1 α , nous n'avons donc pas étudié le rôle de BNIP3 dans ces conditions. A noter que, récemment, le rôle de BNIP3 a été documenté dans l'autophagie induite par l'hypoxie (Tracy *et al.*, 2007).

Régulation de l'autophagie par p53

D'autres facteurs également connus pour réguler l'apoptose sont apparus comme régulant aussi l'autophagie. L'un d'entre eux est le facteur de transcription p53. Il a été décrit comme impliqué dans l'inhibition de mTOR suite à un traitement de dommage à l'ADN. L'inhibition de mTOR passerait par l'activation de l'AMPK (Feng *et al.*, 2005). Par ailleurs,

la régulation par p53 de l'autophagie induite par un dommage à l'ADN impliquerait une de ses cibles, DRAM (Crichton *et al.*, 2006). Comme p53 est également décrit comme intervenant à différents niveaux dans la régulation de la stabilité et de l'activité transcriptionnelle d'HIF-1 α , nous avons voulu étudier son rôle dans l'autophagie induite par une carence nutritive dans les cellules HCT116 Bax $^{-/-}$. Contrairement à son rôle dans l'autophagie induite par un dommage à l'ADN, p53 ne semble jouer aucun rôle dans celle induite par une carence nutritive. Son absence ne diminue pas la capacité autophagique des cellules et n'empêche pas l'inhibition de mTOR. Une étude récente a mis en évidence le rôle d'un homologue de p53, p73, dans la régulation de l'autophagie mais d'une manière DRAM-indépendante (Crichton *et al.*, 2007). Alors qu'un mutant dominant négatif de p73 inhibe l'autophagie régulée par p53 et p73, aucun effet n'est observé lors d'une induction de l'autophagie par une carence en acides aminés. Cela confirme le rôle de p53, DRAM et p73 dans l'autophagie induite par un dommage à l'ADN et suggère que des mécanismes différents, indépendants de ces protéines, soient mis en jeu lors d'une carence nutritive. Ces données sont en accord avec nos résultats.

D'autres cibles de p53 sont également apparues comme impliquées dans la balance entre autophagie et apoptose. C'est le cas des inhibiteurs des kinases dépendantes des cyclines (cdk), p21 et p27, participant à la régulation du cycle cellulaire. Liang *et al.* ont démontré que p27 peut être phosphorylée par la voie de signalisation LKB1-AMPK activé lors d'un déficit énergétique. Cette phosphorylation est associée à l'induction d'une autophagie de survie alors que l'inhibition de cette phosphorylation aboutit à l'activation de l'apoptose (Liang *et al.*, 2007). Récemment, la sur-expression de p21 a été décrite comme induisant l'apoptose, alors que sa sous-expression induit l'autophagie lors d'un traitement au céramide (Fujiwara *et al.*, 2007). L'expression de p21 étant augmentée dans les HCT116 lors d'une carence nutritive,

indépendamment de p53, nous avons commencé l'étude de son rôle dans l'autophagie de survie. L'absence de p21 diminue fortement la capacité autophagique des HCT116 Bax-/- p21-/- (données non montrées). Son rôle plus précis dans l'autophagie ainsi que dans la résistance à l'apoptose est actuellement en cours d'investigation.

Autophagie et lutte anti-cancéreuse

Les processus régulant l'autophagie sont très nombreux et méritent encore de nombreuses études afin de comprendre l'ensemble des phénomènes. Il est cependant nécessaire de préciser le fonctionnement du rôle anti-tumoral de l'autophagie avant la mise en place de la tumeur (mécanisme anti-vieillessement, protection contre le stress oxydatif et donc protection du génome, ...) pour permettre de la stimuler si besoin. Au contraire, une fois la tumeur mise en place, l'autophagie de survie est un moyen de défense efficace de la cellule tumorale contre les conditions défavorables.

Par ailleurs, la carence nutritive provoquant également la sur-expression d'HIF-1 α et de sa cible VEGF, facteurs angiogéniques et pro-tumoraux majeurs (Dang *et al.*, 2006), il semble très important de pouvoir soit la contrecarrer soit la faire basculer vers un processus de mort cellulaire. Les réponses cellulaires étant variables selon le contexte cellulaire et le traitement utilisé, il serait sans doute judicieux d'établir des marqueurs tumoraux permettant de prévoir la réponse de la cellule tumorale à tel ou tel traitement anti-cancéreux.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Abcouwer, S. F., Marjon, P. L., Loper, R. K. & Vander Jagt, D.L. (2002). Response of VEGF expression to amino acid deprivation and inducers of endoplasmic reticulum stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43, pp. 2791-2798.

Arico, S., Petiot, A., Bauvy, C., Dubbelhuis, P. F., Meijer, A. J., Codogno, P. & Ogier-Denis, E. (2001). The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J Biol Chem*, 276, pp. 35243-35246.

Arsham, A. M., Howell, J. J. & Simon, M.C. (2003). A novel hypoxia-inducible factor-independent hypoxic response regulating mammalian target of rapamycin and its targets. *J Biol Chem*, 278, pp. 29655-29660.

Avruch, J., Hara, K., Lin, Y., Liu, M., Long, X., Ortiz-Vega, S. & Yonezawa, K. (2006). Insulin and amino-acid regulation of mTOR signaling and kinase activity through the Rheb GTPase. *Oncogene*, 25, pp. 6361-6372.

Bae, M., Ahn, M., Jeong, J., Bae, M., Lee, Y. M., Bae, S., Park, J., Kim, K. & Kim, K. (2002). Jab1 interacts directly with HIF-1alpha and regulates its stability. *J Biol Chem*, 277, pp. 9-12.

Bae, S., Jeong, J., Park, J. A., Kim, S., Bae, M., Choi, S. & Kim, K. (2004). Sumoylation increases HIF-1alpha stability and its transcriptional activity. *Biochem Biophys Res Commun*, 324, pp. 394-400.

Baek, J. H., Jang, J. E., Kang, C. M., Chung, H. Y., Kim, N. D. & Kim, K.W. (2000). Hypoxia-induced VEGF enhances tumor survivability via suppression of serum deprivation-induced apoptosis. *Oncogene*, 19, pp. 4621-4631.

Baek, J., Liu, Y., McDonald, K., Wesley, J., Hubbi, M., Byun, H. & Semenza, G. (2007). Spermidine/Spermine-N1-Acetyltransferase 2 Is an Essential Component of the Ubiquitin Ligase Complex That Regulates Hypoxia-inducible Factor 1{alpha}. *J Biol Chem*, 282, pp. 23572-23580.

Bardos, J. I., Chau, N. & Ashcroft, M. (2004). Growth factor-mediated induction of HDM2 positively regulates hypoxia-inducible factor 1alpha expression. *Mol Cell Biol*, 24, pp. 2905-2914.

- Bell, E. L., Emerling, B. M. & Chandel, N.S. (2005). Mitochondrial regulation of oxygen sensing. *Mitochondrion*, 5, pp. 322-332.
- Boya, P., Gonzalez-Polo, R., Casares, N., Perfettini, J., Dessen, P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P. & Kroemer, G. (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol Cell Biol*, 25, pp. 1025-1040.
- Brugarolas, J. B., Vazquez, F., Reddy, A., Sellers, W. R. & Kaelin, W.G.J. (2003). TSC2 regulates VEGF through mTOR-dependent and -independent pathways. *Cancer Cell*, 4, pp. 147-158.
- Brugarolas, J., Lei, K., Hurley, R. L., Manning, B. D., Reiling, J. H., Hafen, E., Witters, L. A., Ellisen, L. W. & Kaelin, W.G.J. (2004). Regulation of mTOR function in response to hypoxia by REDD1 and the TSC1/TSC2 tumor suppressor complex. *Genes Dev*, 18, pp. 2893-2904.
- Byfield, M. P., Murray, J. T. & Backer, J.M. (2005). hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J Biol Chem*, 280, pp. 33076-33082.
- Canu, N., Tufi, R., Serafino, A. L., Amadoro, G., Ciotti, M. T. & Calissano, P. (2005). Role of the autophagic-lysosomal system on low potassium-induced apoptosis in cultured cerebellar granule cells. *J Neurochem*, 92, pp. 1228-1242.
- Codogno, P. & Meijer, A.J. (2006). Atg5: more than an autophagy factor. *Nat Cell Biol*, 8, pp. 1045-1047.
- Colell, A., Ricci, J., Tait, S., Milasta, S., Maurer, U., Bouchier-Hayes, L., Fitzgerald, P., Guio-Carrion, A., Waterhouse, N. J., Li, C. W., Mari, B., Barbry, P., Newmeyer, D. D., Beere, H. M. & Green, D.R. (2007). GAPDH and autophagy preserve survival after apoptotic cytochrome c release in the absence of caspase activation. *Cell*, 129, pp. 983-997.
- Comes, F., Matrone, A., Lastella, P., Nico, B., Susca, F. C., Bagnulo, R., Ingravallo, G., Modica, S., Lo Sasso, G., Moschetta, A., Guanti, G. & Simone, C. (2007). A novel cell type-specific role of p38alpha in the control of autophagy and cell death in colorectal cancer cells. *Cell Death Differ*, 14, pp. 693-702.
- Corradetti, M. N. & Guan, K. (2006). Upstream of the mammalian target of rapamycin: do all roads pass through mTOR?. *Oncogene*, 25, pp. 6347-6360.

Crichton, D., O'Prey, J., Bell, H. S. & Ryan, K.M. (2007). p73 regulates DRAM-independent autophagy that does not contribute to programmed cell death. *Cell Death Differ*, *14*, pp. 1071-1079.

Crichton, D., Wilkinson, S., O'Prey, J., Syed, N., Smith, P., Harrison, P. R., Gasco, M., Garrone, O., Crook, T. & Ryan, K.M. (2006). DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell*, *126*, pp. 121-134.

Daido, S., Kanzawa, T., Yamamoto, A., Takeuchi, H., Kondo, Y. & Kondo, S. (2004). Pivotal role of the cell death factor BNIP3 in ceramide-induced autophagic cell death in malignant glioma cells. *Cancer Res*, *64*, pp. 4286-4293.

Daido, S., Yamamoto, A., Fujiwara, K., Sawaya, R., Kondo, S. & Kondo, Y. (2005). Inhibition of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit radiosensitizes malignant glioma cells by inducing autophagy. *Cancer Res*, *65*, pp. 4368-4375.

Dang, D. T., Chen, F., Gardner, L. B., Cummins, J. M., Rago, C., Bunz, F., Kantsevov, S. V. & Dang, L.H. (2006). Hypoxia-inducible factor-1alpha promotes nonhypoxia-mediated proliferation in colon cancer cells and xenografts. *Cancer Res*, *66*, pp. 1684-1936.

De Virgilio, C. & Loewith, R. (2006). Cell growth control: little eukaryotes make big contributions. *Oncogene*, *25*, pp. 6392-6415.

De Virgilio, C. & Loewith, R. (2006). The TOR signalling network from yeast to man. *Int J Biochem Cell Biol*, *38*, pp. 1476-1481.

Dong, Z. & Wang, J. (2004). Hypoxia selection of death-resistant cells. A role for Bcl-X(L). *J Biol Chem*, *279*, pp. 9215-9221.

Erler, J. T., Cawthorne, C. J., Williams, K. J., Koritzinsky, M., Wouters, B. G., Wilson, C., Miller, C., Demonacos, C., Stratford, I. J. & Dive, C. (2004). Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol*, *24*, pp. 2875-2889.

Feng, Z., Zhang, H., Levine, A. J. & Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*, pp. 8204-8209.

Ferrara, N. (2004). Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress.

Endocr Rev, 25, pp. 581-611.

Franovic, A., Gunaratnam, L., Smith, K., Robert, I., Patten, D. & Lee, S. (2007). Translational up-regulation of the EGFR by tumor hypoxia provides a nonmutational explanation for its overexpression in human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, pp. 13092-13097.

Fujiwara, K., Daido, S., Yamamoto, A., Kobayashi, R., Yokoyama, T., Aoki, H., Iwado, E., Shinojima, N., Kondo, Y. & Kondo, S. (2007). Pivotal role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1 in apoptosis and autophagy. *J Biol Chem*, , .

Fukuda, R., Hirota, K., Fan, F., Jung, Y. D., Ellis, L. M. & Semenza, G.L. (2002). Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J Biol Chem*, 277, pp. 38205-38211.

Furuta, S., Hidaka, E., Ogata, A., Yokota, S. & Kamata, T. (2004). Ras is involved in the negative control of autophagy through the class I PI3-kinase. *Oncogene*, 23, pp. 3898-3904.

Furuya, N., Yu, J., Byfield, M., Pattingre, S. & Levine, B. (2005). The evolutionarily conserved domain of Beclin 1 is required for Vps34 binding, autophagy and tumor suppressor function. *Autophagy*, 1, pp. 46-52.

Gothie, E. & Pouyssegur, J. (2002). HIF-1 : régulateur central de l'hypoxie. *medecine/sciences*, vol.18 n°1, pp. 70-78.

Greijer, A. E. & van der Wall, E. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 (HIF-1) in hypoxia induced apoptosis. *J Clin Pathol*, 57, pp. 1009-1014.

Guo, K., Searfoss, G., Krolkowski, D., Pagnoni, M., Franks, C., Clark, K., Yu, K. T., Jaye, M. & Ivashchenko, Y. (2001). Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell Death Differ*, 8, pp. 367-376.

Hahn-Windgassen, A., Nogueira, V., Chen, C., Skeen, J. E., Sonenberg, N. & Hay, N. (2005). Akt activates the mammalian target of rapamycin by regulating cellular ATP level and AMPK activity. *J Biol Chem*, 280, pp. 32081-32089.

Hamacher-Brady, A., Brady, N. R. & Gottlieb, R.A. (2006). The interplay between pro-death and pro-survival signaling pathways in myocardial ischemia/reperfusion injury: apoptosis

- meets autophagy. *Cardiovasc Drugs Ther*, 20, pp. 445-462.
- Hardie, D. G. (2005). New roles for the LKB1-->AMPK pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 17, pp. 167-173.
- Harris, A. L. (2002). Hypoxia--a key regulatory factor in tumour growth. *Nat Rev Cancer*, 2, pp. 38-47.
- Hippert, M. M., O'toole, P. S. & Thorburn, A. (2006). Autophagy in cancer: good, bad, or both?. *Cancer Res*, 66, pp. 9349-9351.
- Hirota, K. & Semenza, G.L. (2006). Regulation of angiogenesis by hypoxia-inducible factor 1. *Crit Rev Oncol Hematol*, 59, pp. 15-26.
- Hui, A. S., Bauer, A. L., Striet, J. B., Schnell, P. O. & Czyzyk-Krzeska, M.F. (2006). Calcium signaling stimulates translation of HIF-alpha during hypoxia. *FASEB J*, 20, pp. 466-475.
- Inoki, K., Zhu, T. & Guan, K. (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell*, 115, pp. 577-590.
- Jeong, J. W., Bae, M. K., Ahn, M. Y., Kim, S. H., Sohn, T. K., Bae, M. H., Yoo, M. A., Song, E. J., Lee, K. J. & Kim, K.W. (2002). Regulation and destabilization of HIF-1alpha by ARD1-mediated acetylation. *Cell*, 111, pp. 709-720.
- Jiang, W. G., Sampson, J., Martin, T. A., Lee-Jones, L., Watkins, G., Douglas-Jones, A., Mokbel, K. & Mansel, R.E. (2005). Tuberin and hamartin are aberrantly expressed and linked to clinical outcome in human breast cancer: the role of promoter methylation of TSC genes. *Eur J Cancer*, 41, pp. 1628-1636.
- Jin, S. (2006). Autophagy, mitochondrial quality control, and oncogenesis. *Autophagy*, 2, pp. 80-84.
- Jung, Y. D., Nakano, K., Liu, W., Gallick, G. E. & Ellis, L.M. (1999). Extracellular signal-regulated kinase activation is required for up-regulation of vascular endothelial growth factor by serum starvation in human colon carcinoma cells. *Cancer Res*, 59, pp. 4804-4807.
- Kadowaki, M., Karim, M. R., Carpi, A. & Miotto, G. (2006). Nutrient control of macroautophagy in mammalian cells. *Mol Aspects Med*, 27, pp. 426-443.

- Kang, H. J., Kim, H. J., Rih, J., Mattson, T. L., Kim, K. W., Cho, C., Isaacs, J. S. & Bae, I. (2006). BRCA1 plays a role in the hypoxic response by regulating HIF-1 α stability and by modulating vascular endothelial growth factor expression. *J Biol Chem*, *281*, pp. 13047-13056.
- Kanzawa, T., Germano, I. M., Komata, T., Ito, H., Kondo, Y. & Kondo, S. (2004). Role of autophagy in temozolomide-induced cytotoxicity for malignant glioma cells. *Cell Death Differ*, *11*, pp. 448-457.
- Kanzawa, T., Zhang, L., Xiao, L., Germano, I. M., Kondo, Y. & Kondo, S. (2005). Arsenic trioxide induces autophagic cell death in malignant glioma cells by upregulation of mitochondrial cell death protein BNIP3. *Oncogene*, *24*, pp. 980-991.
- Ke, Q. & Costa, M. (2006). Hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Mol Pharmacol*, *70*, pp. 1469-1480.
- Kim, J., Ahn, H., Ryu, J., Suk, K. & Park, J. (2004). BH3-only protein Noxa is a mediator of hypoxic cell death induced by hypoxia-inducible factor 1 α . *J Exp Med*, *199*, pp. 113-124.
- Kirisako, T., Baba, M., Ishihara, N., Miyazawa, K., Ohsumi, M., Yoshimori, T., Noda, T. & Ohsumi, Y. (1999). Formation process of autophagosome is traced with Apg8/Aut7p in yeast. *J Cell Biol*, *147*, pp. 435-446.
- Kondo, Y. & Kondo, S. (2006). Autophagy and cancer therapy. *Autophagy*, *2*, pp. 85-90.
- Kothari, S., Cizeau, J., McMillan-Ward, E., Israels, S. J., Bailes, M., Ens, K., Kirshenbaum, L. A. & Gibson, S.B. (2003). BNIP3 plays a role in hypoxic cell death in human epithelial cells that is inhibited by growth factors EGF and IGF. *Oncogene*, *22*, pp. 4734-4744.
- Land, S. C. & Tee, A.R. (2007). Hypoxia-inducible factor 1 α is regulated by the mammalian target of rapamycin (mTOR) via an mTOR signaling motif. *J Biol Chem*, *282*, pp. 20534-20543.
- Lang, K. J. D., Kappel, A. & Goodall, G.J. (2002). Hypoxia-inducible factor-1 α mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia. *Mol Biol Cell*, *13*, pp. 1792-1801.
- Lavieu, G., Scarlatti, F., Sala, G., Carpentier, S., Levade, T., Ghidoni, R., Botti, J. & Codogno,

- P. (2006). Regulation of autophagy by sphingosine kinase 1 and its role in cell survival during nutrient starvation. *J Biol Chem*, *281*, pp. 8518-8527.
- Lavieu, G., Scarlatti, F., Sala, G., Levade, T., Ghidoni, R., Botti, J. & Codogno, P. (2007). Is autophagy the key mechanism by which the sphingolipid rheostat controls the cell fate decision?. *Autophagy*, *3*, pp. 45-47.
- Le Gouill, S., Podar, K., Amiot, M., Hideshima, T., Chauhan, D., Ishitsuka, K., Kumar, S., Raje, N., Richardson, P. G., Harousseau, J. & Anderson, K.C. (2004). VEGF induces Mcl-1 up-regulation and protects multiple myeloma cells against apoptosis. *Blood*, *104*, pp. 2886-2892.
- Lee, C., Kim, S. J., Jeong, D. G., Lee, S. M. & Ryu, S.E. (2003). Structure of human FIIH-1 reveals a unique active site pocket and interaction sites for HIF-1 and von Hippel-Lindau. *J Biol Chem*, *278*, pp. 7558-7563.
- Lee, M., Hwang, J., Lee, H., Jung, S., Kang, I., Chi, S., Kim, S. & Ha, J. (2003). AMP-activated protein kinase activity is critical for hypoxia-inducible factor-1 transcriptional activity and its target gene expression under hypoxic conditions in DU145 cells. *J Biol Chem*, *278*, pp. 39653-39661.
- Levine, B. (2007). Cell biology: autophagy and cancer. *Nature*, *446*, pp. 745-747.
- Levine, B. & Klionsky, D.J. (2004). Development by self-digestion: molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev Cell*, *6*, pp. 463-477.
- Levine, B. & Yuan, J. (2005). Autophagy in cell death: an innocent convict?. *J Clin Invest*, *115*, pp. 2679-2688.
- Li, F., Sonveaux, P., Rabbani, Z. N., Liu, S., Yan, B., Huang, Q., Vujaskovic, Z., Dewhirst, M. W. & Li, C. (2007). Regulation of HIF-1 alpha stability through S-nitrosylation. *Mol Cell*, *26*, pp. 63-74.
- Li, Y., Wang, Y., Kim, E., Beemiller, P., Wang, C., Swanson, J., You, M. & Guan, K. (2007). Bnip3 mediates the hypoxia-induced inhibition on mTOR by interacting with Rheb. *J Biol Chem*, , .
- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B. & Jung, J.U. (2006). Autophagic

and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat Cell Biol*, 8, pp. 688-699.

Liang, J., Shao, S. H., Xu, Z., Hennessy, B., Ding, Z., Larrea, M., Kondo, S., Dumont, D. J., Gutterman, J. U., Walker, C. L., Slingerland, J. M. & Mills, G.B. (2007). The energy sensing LKB1-AMPK pathway regulates p27(kip1) phosphorylation mediating the decision to enter autophagy or apoptosis. *Nat Cell Biol*, 9, pp. 218-224.

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

Liang, X. H., Kleeman, L. K., Jiang, H. H., Gordon, G., Goldman, J. E., Berry, G., Herman, B. & Levine, B. (1998). Protection against fatal Sindbis virus encephalitis by beclin, a novel Bcl-2-interacting protein. *J Virol*, 72, pp. 8586-8596.

Liu, L., Cash, T. P., Jones, R. G., Keith, B., Thompson, C. B. & Simon, M.C. (2006). Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth. *Mol Cell*, 21, pp. 521-531.

Liu, X. H., Kirschenbaum, A., Lu, M., Yao, S., Dosoretz, A., Holland, J. F. & Levine, A.C. (2002). Prostaglandin E2 induces hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization and nuclear localization in a human prostate cancer cell line. *J Biol Chem*, 277, pp. 50081-50086.

Liu, Y. V., Baek, J. H., Zhang, H., Diez, R., Cole, R. N. & Semenza, G.L. (2007). RACK1 competes with HSP90 for binding to HIF-1alpha and is required for O(2)-independent and HSP90 inhibitor-induced degradation of HIF-1alpha. *Mol Cell*, 25, pp. 207-217.

Lum, J. J., Bauer, D. E., Kong, M., Harris, M. H., Li, C., Lindsten, T. & Thompson, C.B. (2005). Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell*, 120, pp. 237-248.

Maiuri, M. C., Le Toumelin, G., Criollo, A., Rain, J., Gautier, F., Juin, P., Tasdemir, E., Pierron, G., Troulinaki, K., Tavernarakis, N., Hickman, J. A., Geneste, O. & Kroemer, G. (2007). Functional and physical interaction between Bcl-X(L) and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J*, 26, pp. 2527-2539.

Majeski, A. E. & Dice, J.F. (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int J*

Biochem Cell Biol, 36, pp. 2435-2444.

Mamane, Y., Petroulakis, E., LeBacquer, O. & Sonenberg, N. (2006). mTOR, translation initiation and cancer. *Oncogene*, 25, pp. 6416-6422.

Marx, J. (2006). Autophagy: is it cancer's friend or foe?. *Science*, 312, pp. 1160-1161.

Meijer, A. J. & Codogno, P. (2004). Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol*, 36, pp. 2445-2462.

Meijer, A. J. & Codogno, P. (2006). Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol Aspects Med*, 27, pp. 411-425.

Meley, D., Pattingre, S. & Codogno, P. (2006). [PI3 kinases and the control of autophagia]. *Bull Cancer*, 93, pp. 439-444.

Mizushima, N. (2005). The pleiotropic role of autophagy: from protein metabolism to bactericide. *Cell Death Differ*, 12 Suppl 2, pp. 1535-1541.

Mylonis, I., Chachami, G., Samiotaki, M., Panayotou, G., Paraskeva, E., Kalousi, A., Georgatsou, E., Bonanou, S. & Simos, G. (2006). Identification of MAPK phosphorylation sites and their role in the localization and activity of hypoxia-inducible factor-1alpha. *J Biol Chem*, 281, pp. 33095-33106.

Nobukuni, T., Joaquin, M., Roccio, M., Dann, S. G., Kim, S. Y., Gulati, P., Byfield, M. P., Backer, J. M., Natt, F., Bos, J. L., Zwartkruis, F. J. T. & Thomas, G. (2005). Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, pp. 14238-14243.

Nobukuni, T., Kozma, S. C. & Thomas, G. (2007). hvps34, an ancient player, enters a growing game: mTOR Complex1/S6K1 signaling. *Curr Opin Cell Biol*, 19, pp. 135-141.

Oberstein, A., Jeffrey, P. D. & Shi, Y. (2007). Crystal structure of the Bcl-XL-Beclin 1 peptide complex: Beclin 1 is a novel BH3-only protein. *J Biol Chem*, 282, pp. 13123-13132.

Park, J. E., Keller, G. A. & Ferrara, N. (1993). The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol Biol Cell*, 4, pp. 1317-1326.

Pattingre, S., Tassa, A., Qu, X., Garuti, R., Liang, X. H., Mizushima, N., Packer, M., Schneider, M. D. & Levine, B. (2005). Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, *122*, pp. 927-939.

Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E. F., Meijer, A. J. & Codogno, P. (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol 3'-kinases are involved in signaling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J Biol Chem*, *275*, pp. 992-998.

Piret, J., Mottet, D., Raes, M. & Michiels, C. (2002). Is HIF-1alpha a pro- or an anti-apoptotic protein?. *Biochem Pharmacol*, *64*, pp. 889-892.

Pore, N., Jiang, Z., Gupta, A., Cerniglia, G., Kao, G. D. & Maity, A. (2006). EGFR tyrosine kinase inhibitors decrease VEGF expression by both hypoxia-inducible factor (HIF)-1-independent and HIF-1-dependent mechanisms. *Cancer Res*, *66*, pp. 3197-3204.

Pore, N., Jiang, Z., Shu, H., Bernhard, E., Kao, G. D. & Maity, A. (2006). Akt1 activation can augment hypoxia-inducible factor-1alpha expression by increasing protein translation through a mammalian target of rapamycin-independent pathway. *Mol Cancer Res*, *4*, pp. 471-479.

Pouyssegur, J., Dayan, F. & Mazure, N.M. (2006). Hypoxia signalling in cancer and approaches to enforce tumour regression. *Nature*, *441*, pp. 437-443.

Proikas-Cezanne, T., Waddell, S., Gaugel, A., Frickey, T., Lupas, A. & Nordheim, A. (2004). WIPI-1alpha (WIPI49), a member of the novel 7-bladed WIPI protein family, is aberrantly expressed in human cancer and is linked to starvation-induced autophagy. *Oncogene*, *23*, pp. 9314-9325.

Pyo, J., Jang, M., Kwon, Y., Lee, H., Jun, J., Woo, H., Cho, D., Choi, B., Lee, H., Kim, J., Mizushima, N., Oshumi, Y. & Jung, Y. (2005). Essential roles of Atg5 and FADD in autophagic cell death: dissection of autophagic cell death into vacuole formation and cell death. *J Biol Chem*, *280*, pp. 20722-20729.

Ravi, R., Mookerjee, B., Bhujwalla, Z. M., Sutter, C. H., Artemov, D., Zeng, Q., Dillehay, L. E., Madan, A., Semenza, G. L. & Bedi, A. (2000). Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev*, *14*, pp. 34-44.

Ray, R., Chen, G., Vande Velde, C., Cizeau, J., Park, J. H., Reed, J. C., Gietz, R. D. & Greenberg, A.H. (2000). BNIP3 heterodimerizes with Bcl-2/Bcl-X(L) and induces cell death

independent of a Bcl-2 homology 3 (BH3) domain at both mitochondrial and nonmitochondrial sites. *J Biol Chem*, 275, pp. 1439-1448.

Richardson, C. J., Schalm, S. S. & Blenis, J. (2004). PI3-kinase and TOR: PIKTORing cell growth. *Semin Cell Dev Biol*, 15, pp. 147-159.

Rubinsztein, D. C., Gestwicki, J. E., Murphy, L. O. & Klionsky, D.J. (2007). Potential therapeutic applications of autophagy. *Nat Rev Drug Discov*, 6, pp. 304-312.

Sarbassov, D. D., Ali, S. M. & Sabatini, D.M. (2005). Growing roles for the mTOR pathway. *Curr Opin Cell Biol*, 17, pp. 596-603.

Sarbassov, D. D., Guertin, D. A., Ali, S. M. & Sabatini, D.M. (2005). Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. *Science*, 307, pp. 1098-1101.

Sato, K., Tsuchihara, K., Fujii, S., Sugiyama, M., Goya, T., Atomi, Y., Ueno, T., Ochiai, A. & Esumi, H. (2007). Autophagy is activated in colorectal cancer cells and contributes to the tolerance to nutrient deprivation. *Cancer Res*, 67, pp. 9677-9684.

Schmid, T., Zhou, J. & Brune, B. (2004). HIF-1 and p53: communication of transcription factors under hypoxia. *J Cell Mol Med*, 8, pp. 423-431.

Schmid, T., Zhou, J., Kohl, R. & Brune, B. (2004). p300 relieves p53-evoked transcriptional repression of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1). *Biochem J*, 380, pp. 289-295.

Semenza, G. L., Jiang, B. H., Leung, S. W., Passantino, R., Concordet, J. P., Maire, P. & Giallongo, A. (1996). Hypoxia response elements in the aldolase A, enolase 1, and lactate dehydrogenase A gene promoters contain essential binding sites for hypoxia-inducible factor 1. *J Biol Chem*, 271, pp. 32529-32537.

Shimizu, S., Kanaseki, T., Mizushima, N., Mizuta, T., Arakawa-Kobayashi, S., Thompson, C. B. & Tsujimoto, Y. (2004). Role of Bcl-2 family proteins in a non-apoptotic programmed cell death dependent on autophagy genes. *Nat Cell Biol*, 6, pp. 1221-1228.

Takahashi, Y., Coppola, D., Matsushita, N., Cuaing, H. D., Sun, M., Sato, Y., Liang, C., Jung, J. U., Cheng, J. Q., Mul, J. J., Pledger, W. J. & Wang, H. (2007). Bif-1 interacts with Beclin 1 through UVRAG and regulates autophagy and tumorigenesis. *Nat Cell Biol*, 9, pp. 1142-1151.

- Takeuchi, H., Kondo, Y., Fujiwara, K., Kanzawa, T., Aoki, H., Mills, G. B. & Kondo, S. (2005). Synergistic augmentation of rapamycin-induced autophagy in malignant glioma cells by phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B inhibitors. *Cancer Res*, *65*, pp. 3336-3346.
- Tanida, I., Ueno, T. & Kominami, E. (2004). LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol*, *36*, pp. 2503-2518.
- Tracy, K., Dibling, B. C., Spike, B. T., Knabb, J. R., Schumacker, P. & Macleod, K.F. (2007). BNIP3 is an RB/E2F target gene required for hypoxia-induced autophagy. *Mol Cell Biol*, *27*, pp. 6229-6242.
- Vezina, C., Kudelski, A. & Sehgal, S.N. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. I. Taxonomy of the producing streptomycete and isolation of the active principle. *J Antibiot (Tokyo)*, *28*, pp. 721-726.
- Woolard, J., Wang, W., Bevan, H. S., Qiu, Y., Morbidelli, L., Pritchard-Jones, R. O., Cui, T., Sugiono, M., Waine, E., Perrin, R., Foster, R., Digby-Bell, J., Shields, J. D., Whittles, C. E., Mushens, R. E., Gillatt, D. A., Ziche, M., Harper, S. J. & Bates, D.O. (2004). VEGF165b, an inhibitory vascular endothelial growth factor splice variant: mechanism of action, in vivo effect on angiogenesis and endogenous protein expression. *Cancer Res*, *64*, pp. 7822-7835.
- Wullschleger, S., Loewith, R. & Hall, M.N. (2006). TOR signaling in growth and metabolism. *Cell*, *124*, pp. 471-484.
- Xue, L., Fletcher, G. C. & Tolkovsky, A.M. (1999). Autophagy is activated by apoptotic signalling in sympathetic neurons: an alternative mechanism of death execution. *Mol Cell Neurosci*, *14*, pp. 180-198.
- Yasinska, I. M. & Sumbayev, V.V. (2003). S-nitrosation of Cys-800 of HIF-1alpha protein activates its interaction with p300 and stimulates its transcriptional activity. *FEBS Lett*, *549*, pp. 105-109.
- Yorimitsu, T. & Klionsky, D.J. (2005). Autophagy: molecular machinery for self-eating. *Cell Death Differ*, *12 Suppl 2*, pp. 1542-1552.
- Yu, L., Alva, A., Su, H., Dutt, P., Freundt, E., Welsh, S., Baehrecke, E. H. & Lenardo, M.J. (2004). Regulation of an ATG7-beclin 1 program of autophagic cell death by caspase-8. *Science*, *304*, pp. 1500-1502.

Zhang, L., Conejo-Garcia, J., Yang, N., Huang, W., Mohamed-Hadley, A., Yao, W., Benencia, F. & Coukos, G. (2002). Different effects of glucose starvation on expression and stability of VEGF mRNA isoforms in murine ovarian cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 292, pp. 860-868.

Zhang, L., Li, L., Liu, H., Prabhakaran, K., Zhang, X., Borowitz, J. L. & Isom, G.E. (2007). HIF-1alpha activation by a redox-sensitive pathway mediates cyanide-induced BNIP3 upregulation and mitochondrial-dependent cell death. *Free Radic Biol Med*, 43, pp. 117-127.

Zhong, H., De Marzo, A. M., Laughner, E., Lim, M., Hilton, D. A., Zagzag, D., Buechler, P., Isaacs, W. B., Semenza, G. L. & Simons, J.W. (1999). Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*, 59, pp. 5830-5835.

ANNEXES

***ANNEXE 1* : Similarity and divergence between the RNA polymerase alpha subunits from hyperthermophilic *Thermotoga maritima* and mesophilic *Escherichia coli* bacteria.**

Braun F, Marhuenda FB, Morin A, Guevel L, Fleury F, Takahashi M, Sakanyan V.

Gene. 2006 Oct 1; 380(2):120-6. Epub 2006 Jul 20.

Similarity and divergence between the RNA polymerase α subunits from hyperthermophilic *Thermotoga maritima* and mesophilic *Escherichia coli* bacteria

Frederique Braun*, Fanny B. Marhuenda, Amelie Morin, Laetitia Guevel, Fabrice Fleury, Masayuki Takahashi, Vehary Sakanyan

Unité Biotechnologie, Biocatalyse et Biorégulation, CNRS UMR 6204, Faculté des Sciences et des Techniques, Université de Nantes, 2 rue de la Houssinière, 44322 Nantes cedex 03, France

Received 6 February 2006; received in revised form 12 May 2006; accepted 16 May 2006

Available online 20 July 2006

Received by A. Bernardi

Abstract

The α subunit (α_{Tm}) of *Thermotoga maritima* RNA polymerase has been characterized to investigate its role in transcriptional regulation in one of the few known anaerobic hyperthermophilic bacteria. The highly thermostable α_{Tm} shares 54% similarity with its *Escherichia coli* analogue (α_{Ec}). The *T. maritima* *rpoA* gene coding the α subunit does not complement the thermosensitive *rpoA112* mutation of *E. coli*. However, α_{Tm} and α_{Ec} show similar folding patterns as determined by circular dichroism. Purified α_{Tm} binds to the *T. maritima* *PargGo* promoter region (probably to a UP-element) and Arg282 appears to be crucial for DNA binding. The thermostable protein is also able to interact with transcription regulatory proteins, like ArgR from *T. neapolitana* or CRP from *E. coli*. These data indicate that the RNA polymerase α subunit might play a crucial role in the modulation of gene expression in hyperthermophiles.

© 2006 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Hyperthermophilic bacteria; *Thermotoga*; RNA polymerase alpha subunit; Transcription factors; Gene regulation

1. Introduction

The bacterial RNA polymerase (RNAP) core enzyme consists of an α subunit homodimer, single β , β' and ω subunits (Darst,

2001). Binding of different σ subunit species to the $\alpha_2\beta\beta'\omega$ complex leads to the formation of the holoenzyme and confers the specificity for promoter recognition (Mooney et al., 2005). The α subunit of *Escherichia coli* RNAP (α_{Ec}), encoded by the *rpoA* gene, is a key player in the enzyme assembly and in transcriptional regulation (Ebright and Busby, 1995; Gourse et al., 2000). The α subunit consists of two independently folded domains, which are connected by a flexible linker (Jeon et al., 1997; Zhang and Darst, 1998). The amino-terminal domain (α NTD) (amino acids 8–235) enables subunit dimerization and association with the β and β' subunits during core enzyme assembly; its deletion is deleterious for the cell (Kimura et al., 1994). The carboxy-terminal domain (α CTD) (amino acids 249–329), although not necessary for basal transcription, is needed for transcriptional activation by a large number of transcription factors, including the well-characterized cyclic AMP receptor protein (CRP) (Busby and Ebright, 1994). Moreover, binding of α CTD to the UP-element, an AT-rich

Abbreviations: aa, amino acids; Arg, arginine; ArgR, arginine repressor; cAMP, cyclic adenosine monophosphate; Bst, *Bacillus stearothermophilus*; CRP, cyclic adenosine monophosphate receptor protein; Ec, *Escherichia coli*; IPTG, isopropyl-1- β -D-thio-1-galactopyranoside; IRDye, near-infrared fluorescence dye; *PargGo*, promoter of the *argGHCJBD* operon of *Thermotoga maritima*; ORF, open reading frame; PCR, polymerase chain reaction; RNAP, RNA polymerase; R282, arginine located at the 282 position in α_{Tm} ; *rpoA*, gene encoding α subunit of RNAP; Tm, *T. maritima*; Tn, *Thermotoga neapolitana*; UP-element, Upstream Element.

* Corresponding author. Present address: UMR 601 INSERM, Centre de recherche en cancérologie, 9 quai Moncousu 44035 Nantes Cedex 01, France. Tel.: +33 240 08 40 32; fax: +33 240 08 40 82.

E-mail address: frederique.braun@univ-nantes.fr (F. Braun).

sequence located upstream of a -35 consensus, has been shown to promote transcriptional strength from strong promoters (Ross et al., 1993; Gourse et al., 2000; Aiyar et al., 2002). The arginine residue located at position 265 of α_{Ec} RNAP has been found to be crucial for the UP-element response (Aiyar et al., 1998).

Thermotoga maritima, a hyperthermophilic anaerobic Gram-negative bacterium, is one of the longest evolving lineages in the bacterial kingdom with almost one quarter of its genome similar to that of archaeal representatives (Nelson et al., 1999). Therefore, studying transcription regulation of this organism is important to understand the evolution and diversity of regulatory mechanisms established in microorganisms. Our previous studies of arginine biosynthesis regulation in *Thermotoga* species enabled us to elucidate structure–function relationships and unique features of the thermostable ArgR repressor (Dimova et al., 2000; Song et al., 2001; Morin et al., 2003). Given the key role of the RNAP α subunit in gene regulation in mesophilic bacteria, it is tempting to study the α subunit of *T. maritima* RNA polymerase (α_{Tm}) in order to enlarge our knowledge about transcriptional regulatory mechanisms in hyperthermophiles. The genes encoding all subunits of the core enzyme and four holoenzyme-specific factors, σ^{70} , σ^E , σ^H and σ^{28} , have been identified in *T. maritima* (Nelson et al., 1999). The *T. maritima rpoA* gene is located in an operon composed of four ribosomal protein genes in the order *rpsM*, *rpsK*, *rpsD*, *rpoA* and *rplQ* as in *E. coli*. Our data show that the α subunit of *T. maritima* RNAP is unable to restore the deficiency of the *E. coli* α subunit in the complementation test. However, the highly thermostable α_{Tm} protein possesses both DNA and protein interaction ability *in vitro* indicating that the α subunit might be involved in the transcriptional regulation of genes in a native hyperthermophilic host.

2. Materials and methods

2.1. Bacterial strains and growth conditions

E. coli strains were grown in supplemented Luria Bertani broth at 37 °C, unless otherwise noted. Ampicillin was added at 100 $\mu\text{g/ml}$ to select and to maintain plasmids, whereas tetracycline (15 $\mu\text{g/ml}$) and streptomycin (10 $\mu\text{g/ml}$) were used to cultivate, respectively, the strains *E. coli* XL1 (Stratagene) and *E. coli* HN317 (F^- *tsx-352* λ^- *rpsL283 rpoA112^{ts} aroE353 Sm^r*) (Ishihama et al., 1980).

2.2. Cloning the *rpoA* gene and construction of the $\alpha_{Tm}R282A$ mutant

The *T. maritima* MSB8 gene *rpoA* coding for α_{Tm} was amplified by PCR and cloned in frame with the C-terminal (His)₆ tag sequence in the pET21d vector (Novagen) between *NcoI* and *XhoI* sites, giving rise to the pET α_{Tm} plasmid. The mutant *rpoA_{Tm}* Arg282Ala gene was generated by the PCR overlapping extension method using two overlapping primers carrying the desired mutation as described previously (Karaivanova et al., 1999). The amplified mutant DNA was cloned in pET21d to give rise to the pET $\alpha_{Tm}R282A$ plasmid. The cloned DNA sequences were verified on both strands (MWG).

2.3. Complementation test

Complementation of the *E. coli* HN317 *rpoA112^{ts}* strain was performed with pQE α_{Tm} and pQE α_{Ec} plasmids, carrying the wild-type *rpoA* gene of *T. maritima* and *E. coli*, respectively. The corresponding *rpoA* gene was amplified from pET α_{Tm} or pET α_{Ec} plasmid DNA and inserted between the *Bam*HI and *Sal*I sites of the pQE30 vector (Qiagen). The constructed plasmids pQE α_{Tm} , pQE α_{Ec} and the pQE30 vector were transferred into *E. coli* HN317 *rpoA112^{ts}* and *E. coli* XL1 strains. The ability of the cloned *rpoA* gene to complement the *E. coli* thermosensitive *rpoA112^{ts}* mutation was assessed at a permissive (30 °C) and a non-permissive temperature (42 °C) by streaking the cells on a solid LB-medium, containing 100 $\mu\text{g/ml}$ ampicillin and 0.2 mM IPTG to induce the gene expression from a *Plac* promoter of the pQE30 vector.

2.4. Protein purification

Previously constructed plasmids pETcrp $_{Ec}$, pETargR $_{Ec}$ and pET α_{Ec} (Snapyan et al., 2003), pETargR $_{Tn}$ (Dimova et al., 2000), pETargR $_{Bst}$ (Karaivanova et al., 1999), and the new constructions pET α_{Tm} and pET $\alpha_{Tm}R282A$ were transferred into the *E. coli* BL21(λ DE3) strain and used for the production and purification of the His-tagged proteins by affinity chromatography on an Ni-NTA column according to the manufacturer's recommendations (Qiagen). Protein concentration was measured by the lab-on-chip "Protein 200 plus" kit with Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies).

2.5. Circular dichroism

Circular dichroism (CD) spectra of the purified proteins were measured with a J-810 spectropolarimeter (Jasco, Japan) and a miniquartz cell with 0.2 cm pathlength. Spectra were measured at 25 °C in step mode (bandwidth: 2 nm; response time: 0.125 s; resolution: 0.1 nm) and averaged over 3 scans to increase the signal/noise ratio. The temperature was controlled by a programmable Peltier thermoelectric system. The concentration of proteins used was 0.2 mg/ml in 50 mM sodium phosphate pH 7.4, 25 mM NaCl. The thermal unfolding of proteins was monitored by recording the change in the CD signal at 222 nm (bandwidth: 10 nm; response time: 0.5 s) with a temperature increase from 25 to 85 °C (rate of change: 1 °C/min; data pitch: 0.1 °C). The melting temperature (T_m) of proteins was measured from the midpoint of the unfolding curve.

2.6. Fluorescence anisotropy

The fluorescence anisotropy of the Cy3-labeled RNAP α subunit was measured at 570 nm (bandwidth: 10 nm) with excitation at 545 nm (bandwidth: 10 nm) using a miniquartz cell (1 \times 0.2 cm) in an FP-6500 spectrofluorimeter (Jasco, Japan) equipped with a Peltier temperature controller. Interactions between the purified proteins were examined in PBS buffer at 25 °C. When stated, L-arginine (10 mM) or cAMP (0.5 mM) was added. The concentration of Cy3-labeled RNAP α subunit

was fixed at 15 nM and that of non-labeled *T. neapolitana* ArgR or *E. coli* CRP was gradually increased from 12.5 nM to 1.6 μ M by step-wise addition. Apparent dissociation constants (K_d) were determined as described previously (Snapyan et al., 2003).

2.7. Assessment of DNA–protein binding by protein array

The purified His-tagged proteins were dialyzed against PBS containing 20% glycerol. The serially diluted protein samples of ArgR or RNAP α subunit were printed on a nitrocellulose membrane (FAST-slide, Whatman) with a GSM 417 arrayer (Affymetrix). The *T. maritima* DNA fragments containing the *PargGo* promoter–operator region preceding the *argGHCJBD* operon or deleted *PargGo* Δ A/T were amplified by PCR from *T. maritima* MSB8 DNA using forward and reverse primers; the first nucleotide in the reverse primer was labeled with IRDye700 (MWG). The labeled DNAs were purified on a silica column (Qiagen) and used as probes in binding reactions as described previously (Morin et al., 2003). The fluorescent

spots were scanned with Odyssey (Li-COR) and the signal intensity was assessed with GenePix Pro software (Axon).

3. Results and discussion

3.1. Secondary structure and thermal characteristics of the *T. maritima* RNAP α subunit

Sequence alignment of the RNAP α subunits of *E. coli* (329 aa) and *T. maritima* (336 aa) showed that mesophilic and thermophilic proteins share 37% identity and 54% similarity (Fig. 1A). The purified α_{Ec} and α_{Tm} migrated with an apparent molecular mass of 41 kDa and 46 kDa respectively, almost 5 kDa larger than that deduced from the amino acid sequence of corresponding His-tagged proteins (Fig. 2A). Slower migration in gel was also observed with the α subunit of *Sinorhizobium meliloti* RNAP (Peck et al., 2002).

The secondary structures of purified α_{Ec} and α_{Tm} were analyzed by circular dichroism (CD). The CD spectra of α_{Ec} and

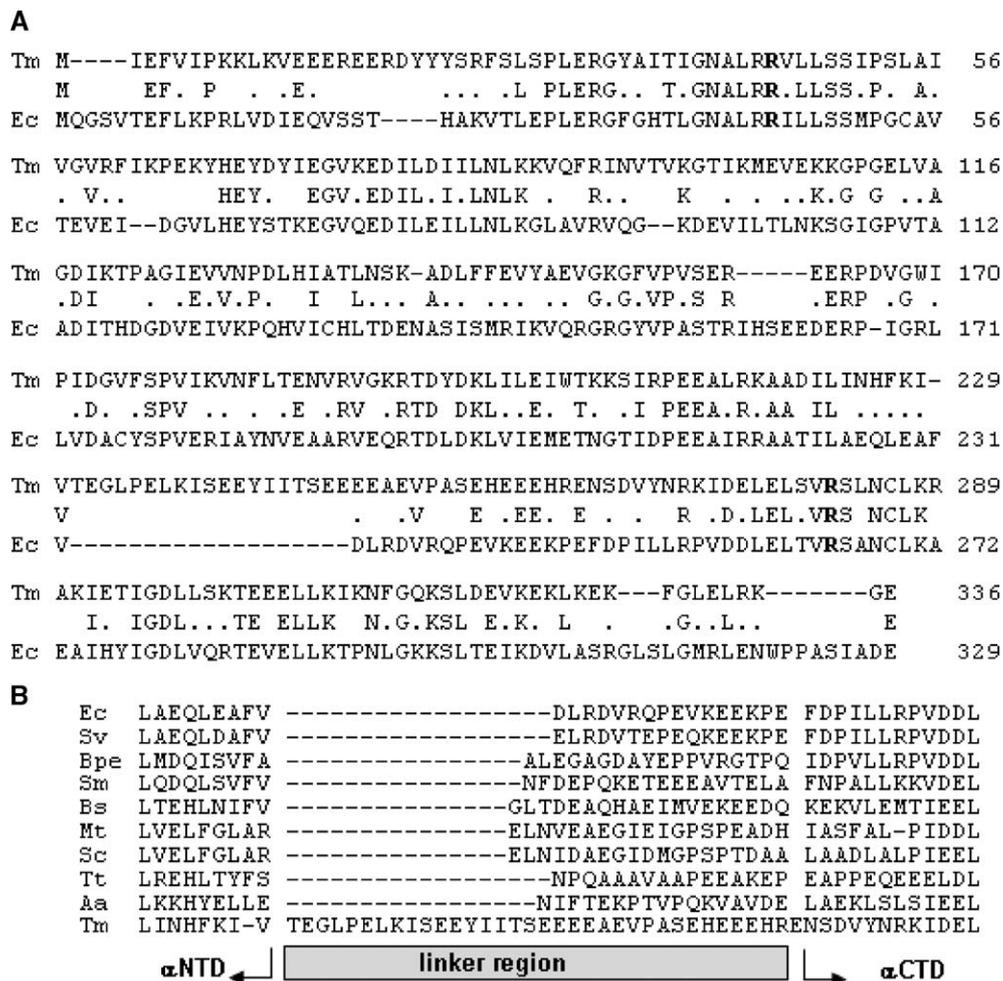


Fig. 1. Comparison of the amino acid sequence of the *T. maritima* and *E. coli* RNAP α subunits. (A) Identical amino acids in *T. maritima* α (Tm) and *E. coli* α (Ec) are indicated between the two sequences and - denotes similar amino acids. The residues Arg45 replaced by Cys in the HN317 *rpoA112*^{ts} strain (Ishihama et al., 1980) and Arg282 replaced by Ala in the mutant α_{Tm} R282A protein are in bold. Dashes indicate gaps introduced to optimize alignment. (B) Alignment of the linker sequence of several bacterial α subunits. Bacteria names: Ec, *E. coli*, Sv, *S. violacea*, Bpe, *B. pertussis*, Sm, *S. meliloti*, Bs, *B. subtilis*, Mt, *M. tuberculosis*, Sc, *S. coelicolor*, Tt, *T. thermophilus*, Aa, *A. aeolicus*, Tm, *T. maritima*.

α_{Tm} were almost superposable, both exhibiting negative peaks at 222 nm and 208 nm (Fig. 2B). These results indicate that the proteins are folded similarly and possess a significant amount of α helices, in agreement with the resolved structure of α_{Ec} (Zhang and Darst, 1998). The protein unfolding at different temperatures was analyzed by measuring the CD signal at 222 nm, which reflects the α helix content. The absence of changes in the CD signal from α_{Tm} , up to 80 °C, highlights the high thermal stability of the *T. maritima* protein whereas the melting temperature of α_{Ec} , estimated from the midpoint of the unfolding curve, was about 42 °C (Fig. 2C). A similar folding pattern was detected for the thermostable α subunit of *Thermus thermophilus* RNAP (Wada et al., 2000).

3.2. The *T. maritima* *rpoA* gene does not complement the *rpoA112^{ts}* mutation of *E. coli*

The arginine residue located at the 45th position in α_{Ec} is essential for the *E. coli* RNA polymerase assembly and is conserved in the *T. maritima* subunit (see Fig. 1A). This observation prompted us to investigate the ability of the wild-type *T. maritima* *rpoA* gene to complement *in vivo* the thermosensitive *rpoA112* mutation of the *E. coli* HN317 strain.

The pQE30, pQE α_{Tm} and pQE α_{Ec} plasmids were introduced into *E. coli* HN317 and *E. coli* XL1 (used as a control) by selection of transformants at 30 °C. Both control and *rpoA112^{ts}* cells harboring pQE α_{Ec} were able to grow at 42 °C (Fig. 3). On the contrary, the thermosensitive cells carrying pQE α_{Tm} did not grow at this non-permissive temperature suggesting that the wild-type α_{Tm} is not able to complement the *rpoA112^{ts}* mutation. This mutation, caused by the Arg45Cys substitution, leads to the loss of α_{Ec} interaction with the RNAP β subunit, without affecting the α subunit dimerization at 42 °C (Ishihama et al., 1980). Therefore, the absence of complementation might be due to the inability of the thermostable α_{Tm} to associate physically with the RNAP β subunit of *E. coli*.

It has been shown that the increased length of the α inter-domain linker affects the *E. coli* RNAP assembly and that the formation of the functional multi-subunit complex can tolerate an increase of up to 16 additional amino acids in the linker sequence (Husnain et al., 2004). The alignment of almost 60 bacterial RNAP α subunit sequences revealed that the linker of α_{Tm} is significantly longer, 34 amino acids as compared to 13 amino acids in α_{Ec} (Fig. 1B). Therefore, we assume that the longer linker of the α subunit in *T. maritima* RNAP prohibits the enzyme assembly required for the complementation of the *rpoA112^{ts}* mutation in the heterologous *E. coli* host.

3.3. The α subunit of *T. maritima* RNAP interacts with regulatory proteins

Various transcriptional activators or repressors fulfill their regulatory role in gene expression *via* binding to the α subunit of *E. coli* RNAP (Barnard et al., 2004). We were thus interested to determine whether the α subunit of *T. maritima* RNAP was able to interact *in vitro* with transcriptional factors in spite of its inability to assemble the functional polymerase in *E. coli* cells.

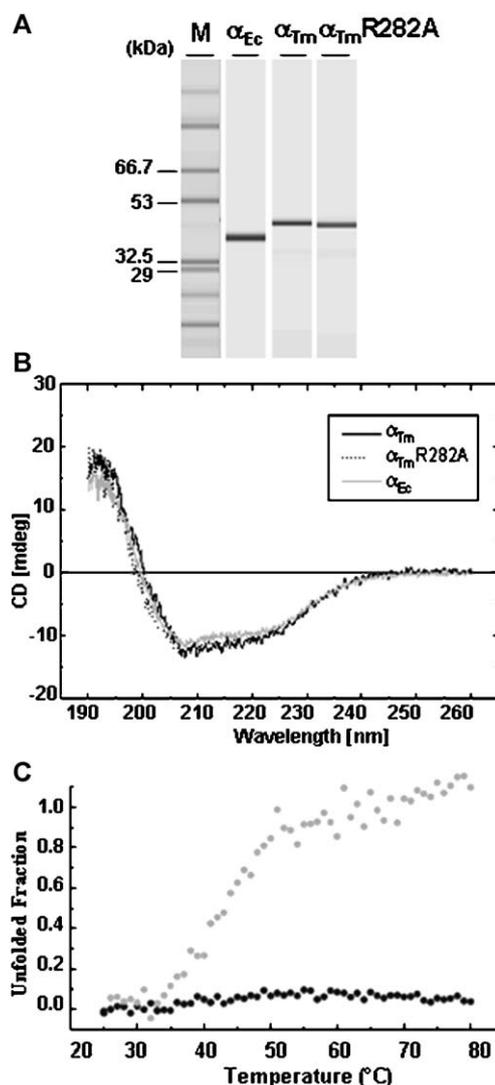


Fig. 2. Circular dichroism of the purified α subunits from *T. maritima* and *E. coli*. (A) The purity and quantity of His-tagged proteins analyzed with the lab-on-chip “Protein 200 plus”. Molecular mass markers (lane M) are indicated to the left of the panel. (B) CD spectra are shown for α_{Ec} (—), α_{Tm} (---) and $\alpha_{TmR282A}$ (····). (C) Thermal unfolding of the wild-type proteins α_{Tm} and α_{Ec} . Changes in the CD signal at 222 nm of α_{Tm} (black dots) and of α_{Ec} (grey dots) with temperature were measured at 0.2 mg/ml of the corresponding proteins and normalized to the maximum change.

We first tested interactions between α_{Ec} and the ArgR protein of *E. coli* (ArgR_{Ec}) and *T. neapolitana* (ArgR_{Tn}). ArgR_{Ec} is a well-characterized repressor that controls transcription of arginine biosynthetic genes in *E. coli* (Maas, 1994). ArgR_{Tn} shares a 96.7% identical sequence with the *T. maritima* protein that governs arginine biosynthesis and appears to be involved in global gene regulation in hyperthermophiles (Morin et al., 2003). Previously, we showed that the α subunit of *E. coli* RNAP is able to bind to *T. neapolitana* ArgR_{Tn} but not to the homologous ArgR_{Ec} repressor (Snappan et al., 2003). We measured the fluorescence anisotropy of Cy3-labeled α_{Ec} and α_{Tm} proteins after addition of increasing concentrations of ArgR_{Tn} or ArgR_{Ec} to the reaction mixture. No anisotropy change was detected when α_{Tm} was incubated with ArgR_{Ec} in the concentration range of 12.5 nM to 1.6 μ M of the protein added. As expected, protein interactions were also not

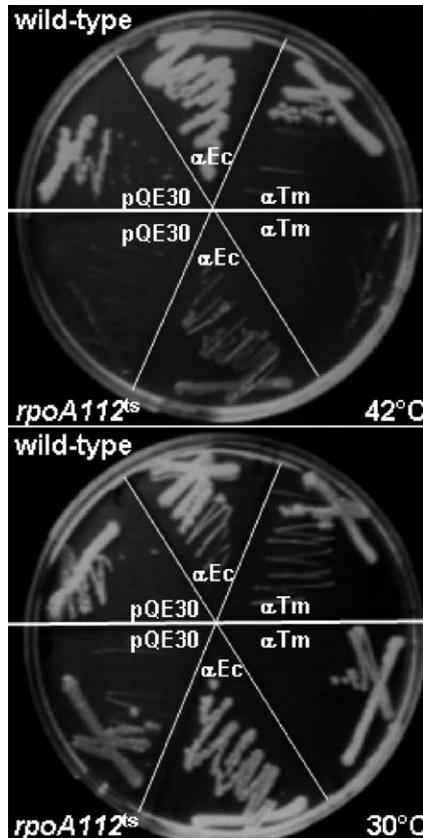


Fig. 3. Complementation of the *E. coli* *rpoA112^{ts}* mutation by the *T. maritima* *rpoA* gene. The *E. coli* HN317 *rpoA112^{ts}* and *E. coli* XL1 strains harboring pQE30 vector, pQE α_{Ec} (α_{Ec}) or pQE α_{Tm} (α_{Tm}) were grown on LB agar containing IPTG at the permissive (30 °C) and non-permissive (42 °C) temperatures.

detected between α_{Ec} and ArgR $_{Ec}$. However, the addition of ArgR $_{Tm}$ increased the fluorescence anisotropy of both α_{Tm} and α_{Ec} thereby proving the molecular interactions between corresponding protein couples. The binding affinity between α_{Tm} and ArgR $_{Tm}$ or α_{Ec} and ArgR $_{Tm}$ was similar and not dependent on L-arginine (Table 1). These results show that the hyperthermophilic ArgR transcriptional factor, in contrast to its mesophilic analogue, binds to both homologous and heterologous RNAP α subunits.

E. coli cells detect carbon sufficiency by a catabolite repression mechanism via cAMP and its receptor protein, CRP (Saier et al., 1996). CRP activates transcription by contacting the RNAP α subunit (Benoff et al., 2002). We tested the ability of the α subunit of *T. maritima* RNAP to bind to *E. coli* CRP. A clear anisotropy response was registered from the reaction mixture of α_{Tm} and CRP, thereby suggesting that the heterologous protein couple interacts under the conditions used. The binding affinity between *T. maritima* and *E. coli* proteins was almost double that between homologous proteins (see Table 1). None of these protein–protein interactions was affected by cAMP, as reported previously for the *E. coli* α_{Tm} interaction with CRP (Heyduk et al., 1993).

To evaluate the functional significance of the observed interaction between heterologous α_{Tm} and *E. coli* CRP, we wanted to study the interaction between α_{Tm} and the *T.*

maritima CRP-like protein. A potential *T. maritima* CRP-like candidate, previously identified as ORF TM1171 (Nelson et al., 1999), shares 22.5% amino acid similarity with the *E. coli* protein. However, the purified protein that was synthesized using the cloned gene was unable to induce an anisotropy change when the reaction was performed with α_{Tm} or α_{Ec} (data not shown). Moreover, in contrast to CRP $_{Ec}$, this thermostable protein could not bind *in vitro* to an operator sequence of the *E. coli* *lac* operon (data not shown). Therefore, we conclude that the *T. maritima* TM1171 encoded protein does not provide functions similar to *E. coli* CRP. This result is in agreement with previous *in vivo* studies with *T. neapolitana* cells, in which catabolite repression was found to occur by a cAMP-independent mechanism (Vargas and Noll, 1996).

The question of the functional significance of the interaction detected between *Thermotoga* RNAP α subunit and *E. coli* catabolite repressor CRP requires further studies with other putative transcriptional regulators of the same family. Nevertheless, the data presented indicate that the α subunit of the hyperthermophilic RNAP is able to establish a wide range of protein contacts with various transcriptional factors.

3.4. The α subunit of *T. maritima* RNAP binds to the *PargGo* promoter region

The α subunit of *E. coli* RNAP can modulate the transcription rate by binding to a UP-element, an AT-rich region located upstream of a -35 consensus of strong promoters that are recognized by σ^{70} factor (Ross et al., 1993). A similar element has been detected in other bacteria (Estrem et al., 1998; Aiyar et al., 2002). Using an algorithm devoted to the prediction of strong promoters in microbial genomes (Sakanyan et al., 2003), we identified a putative promoter in the region preceding the gene *argG* encoding argininosuccinate synthase of the *T. maritima* *argGHCJBD* operon (Fig. 4A). Previously, we showed that this region contains two ARG boxes recognized by the ArgR $_{Tm}$ protein (Morin et al., 2003). This putative promoter is located very close to the *argG* coding region and appears to contain a UP-like element, composed of two typical sub-sites (Estrem et al., 1999), that precedes the *arg*-specific operator sequence (Fig. 4A). To better understand the functional role of this region in arginine biosynthesis regulation, we studied its interaction with the α subunit of *T. maritima* RNAP.

Table 1
Protein-binding affinity¹ of the α subunit of *E. coli* and *T. maritima* RNAPs for ArgR from *T. neapolitana* and CRP from *E. coli*

Protein	α_{Ec}	α_{Tm}	$\alpha_{Tm}R282A$
<i>ArgR_{Tm}</i>			
– Arginine	$6 \cdot 10^{-7}$ M	$6.5 \cdot 10^{-7}$ M	$1 \cdot 10^{-6}$ M
+ Arginine 10 mM	$6 \cdot 10^{-7}$ M	$5 \cdot 10^{-7}$ M	$1 \cdot 10^{-6}$ M
<i>CRP_{Ec}</i>			
– cAMP	$3 \cdot 10^{-7}$ M	$1.5 \cdot 10^{-7}$ M	$2 \cdot 10^{-7}$ M
+ cAMP 0.5 mM	$3 \cdot 10^{-7}$ M	$1 \cdot 10^{-7}$ M	$2 \cdot 10^{-7}$ M

¹ Kd value (in monomer equivalent) is determined from anisotropy curves.

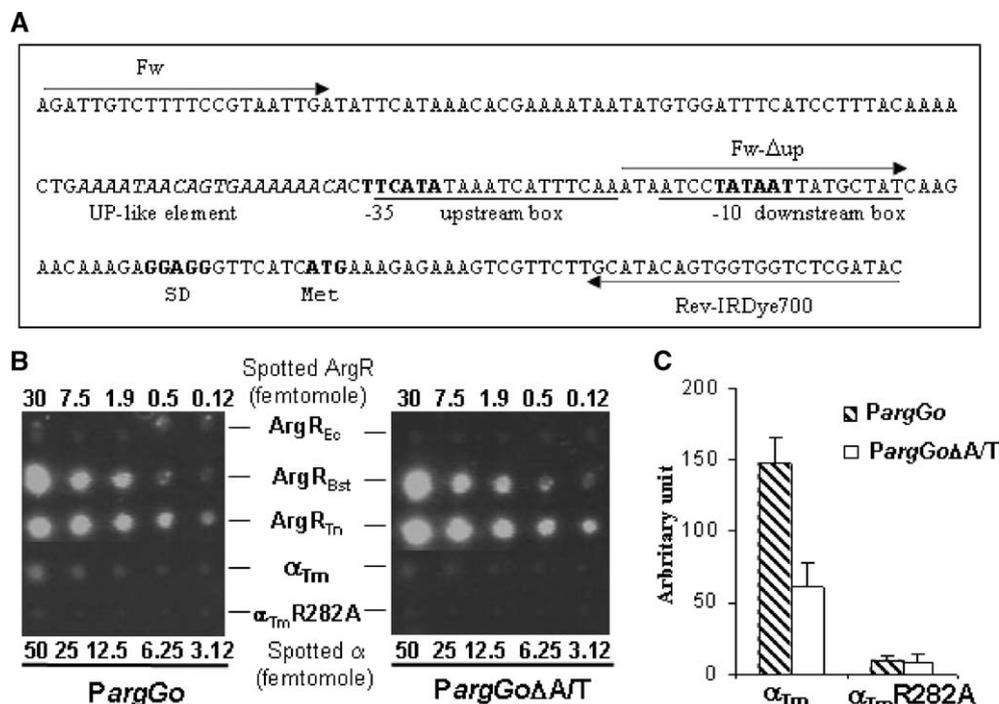


Fig. 4. Assessment of the binding of the α subunit of *T. maritima* RNAP to the *T. maritima* *argHGCGBD* promoter–operator region by the protein array method. (A) The nucleotide sequence of the *PargGo* promoter–operator region is shown. The predicted UP-element is in italic; –35 and –10 transcriptional signals as well as SD and ATG (the initiation codon) translational signals are in bold, the two underlined ARG boxes (upstream and downstream boxes) were described previously (Morin et al., 2003). Arrows show the positions of the forward and reverse primers used for PCR. (B) Detection of fluorescent signal from micro-spots with immobilized wild-type and mutant α_{Tm} proteins and ArgR_{Ec}, ArgR_{Bst}, ArgR_{Tm} probed to the IRDye700-labeled *PargGo* and *PargGo* Δ A/T DNAs. The amount, in femtomole, of spotted ArgR and α proteins is indicated at the top and bottom of the panel, respectively. (C) Histogram of the fluorescent intensity registered from spots with the *T. maritima* wild-type α_{Tm} and mutant α_{Tm} R282A proteins probed to the two DNAs (average of two experiments).

We used the protein array method by applying near-infrared fluorescent DNA probes for the detection of molecular interactions as described previously (Ghochikyan et al., 2002; Snappyan et al., 2003). Serial dilutions of the purified His-tagged α_{Tm} of *T. maritima* and ArgR proteins of *T. neapolitana* and *B. stearothermophilus* (used as positive controls) and *E. coli* (used as a negative control) were spotted on a nitrocellulose membrane and incubated with two IRDye-labeled DNA probes, a full-length *PargGo* promoter–operator DNA or its shorter derivative *PargGo* Δ A/T DNA that lacks a potential UP-element (Fig. 4).

A clear fluorescent signal was detected from spots corresponding to the immobilized α subunit of *T. maritima* RNAP bound to the *PargGo* DNA whereas it was 3-fold weaker from α_{Tm} spots probed to the shorter DNA (Fig. 4B and 4C). This difference indicates that the sequence deleted in the *PargGo* Δ A/T DNA contributes to the binding affinity for α_{Tm} . To confirm the reliability of the bound signals, we compared ArgR protein interactions with the two DNA probes in the same binding assays. Strong fluorescent signals were detected from spots with immobilized ArgR_{Tm} and ArgR_{Bst} probed to both DNA targets confirming that the thermostable repressors bind to both double and single ARG box carrying operators (Morin et al., 2003). On the contrary, no signal was detected with ArgR_{Ec} probed to the *argGo* operator in the presence or absence of arginine. Such a differential behavior of ArgR proteins binding to the *Thermotoga* *PargGo* DNA is in good agreement with previous observations

and underlines that the protein microarray data for α_{Tm} binding to the same DNA regions are reliable.

Several amino acid residues, involved in contacts with DNA, have been identified in the α subunit of *E. coli* RNAP, in particular, the alanine at position 265 is essential for DNA recognition (Murakami et al., 1996; Aiyar et al., 1998). To confirm the DNA-binding ability of the RNAP α subunit from *T. maritima*, we substituted the conserved arginine by alanine, R282A, in α_{Tm} that corresponds to the mentioned R265A mutation in α_{Ec} (Fig. 1A). CD spectra registered from α_{Tm} R282A indicated that the mutation does not alter the protein secondary structure (Fig. 2). Moreover, the mutant protein displayed a binding affinity for ArgR_{Tm} and CRP_{Ec} close to values detected with a wild-type α_{Tm} indicating that its interactions with these transcriptional factors are not affected (Table 1). On the contrary, the spotted α_{Tm} R282A mutant protein displayed an almost 14-fold decrease in intensity of the fluorescent signal when probed to the *PargGo* DNA (Fig. 4B and 4C). Thus, the conserved Arg282 in the thermophilic RNAP α subunit is crucial for binding to DNA.

Our data show that the DNA-recognition mechanism of the RNAP α subunit from *T. maritima* towards DNA is reminiscent of that of the *E. coli* subunit. However, the high A/T content of the analyzed DNA region appears to mask the difference of the α_{Tm} binding to a potential UP-like element. Furthermore, the binding affinity of the *T. maritima* RNAP α subunit to the *PargGo* promoter is, in general, weaker than that, for example, of the

thermophilic ArgRs for ARG boxes (compare corresponding spots in Fig. 4B). Thus, another experimental approach is still required to prove the specificity of this interaction.

The results of this study allow us to put forward the hypothesis that transcriptional regulation of arginine biosynthesis in *Thermotoga* can be governed by two distinct mechanisms: (i) by protein–DNA interactions via the ArgR repressor binding to sequence-specific ARG boxes as in the *argGo* operator (Morin et al., 2003); (ii) by protein–protein interactions via the RNA polymerase α subunit binding to the ArgR transcriptional factor. Further experiments will help to assess the contribution of RNA polymerase α subunit-mediated interactions with specialized transcriptional factors to gene expression in hyperthermophiles.

3.5. Conclusion

The *T. maritima rpoA* gene coding the RNA polymerase α subunit is unable to complement the temperature-sensitive *rpoA112^{ts}* mutation of *E. coli*. The thermostable protein possesses both DNA-binding and protein-binding abilities *in vitro*, thereby reflecting its crucial role in the modulation of gene expression in hyperthermophilic bacteria.

Acknowledgements

We thank Dr. A. Ishihama for providing the *E. coli* HN317 strain. Mr. D. Marquis is acknowledged for technical assistance. This project was supported by a grant from the Région des Pays de la Loire, by the Ministère de l'Éducation Nationale et de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and by CNRS. The J-810 spectropolarimeter was purchased with the help of foundations ARC and Ligue Nationale Contre le Cancer as well as that of CNRS and the Pays de la Loire.

References

- Aiyar, S.E., Gourse, R.L., Ross, W., 1998. Upstream A-tracts increase bacterial promoter activity through interactions with the RNA polymerase alpha subunit. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 14652–14657.
- Aiyar, S.E., Gaal, T., Gourse, R.L., 2002. rRNA promoter activity in the fast-growing bacterium *Vibrio natriegens*. *J. Bacteriol.* 184, 1349–1358.
- Barnard, A., Wolfe, A., Busby, S., 2004. Regulation at complex bacterial promoters: how bacteria use different promoter organizations to produce different regulatory outcomes. *Curr. Opin. Microbiol.* 7, 102–108.
- Benoff, B., et al., 2002. Structural basis of transcription activation: the CAP-alpha-CTD-DNA complex. *Science* 297, 1562–1566.
- Busby, S., Ebright, R.H., 1994. Promoter structure, promoter recognition, and transcription activation in prokaryotes. *Cell* 79, 743–746.
- Darst, S.A., 2001. Bacterial RNA polymerase. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 11, 155–162.
- Dimova, D., Weigel, P., Takashi, M., Marc, F., Van Duyne, G.P., Sakanyan, V., 2000. Thermostability, oligomerization and DNA-binding properties of the regulatory protein ArgR from the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana*. *Mol. Gen. Genet.* 263, 119–130.
- Ebright, R.H., Busby, S., 1995. The *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit: structure and function. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 5, 197–203.
- Estrem, S.T., Gaal, T., Ross, W., Gourse, R.L., 1998. Identification of an UP element consensus sequence for bacterial promoters. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95, 9761–9766.
- Estrem, S.T., et al., 1999. Bacterial promoter architecture: subsite structure of UP elements and interactions with the C-terminal domain of the RNA polymerase α subunit. *Genes Dev.* 13, 2134–2147.
- Ghochikyan, A., et al., 2002. Arginine operator binding by heterologous and chimeric ArgR repressors from *Escherichia coli* and *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* 184, 6602–6614.
- Gourse, R.L., Ross, W., Gaal, T., 2000. UPs and downs in bacterial transcription initiation: the role of the alpha subunit of RNA polymerase in promoter recognition. *Mol. Microbiol.* 37, 687–695.
- Heyduk, T., Lee, J.C., Ebright, Y.W., Blatter, E.E., Zhou, Y., Ebright, R.H., 1993. CAP interacts with RNA polymerase in solution in the absence of promoter DNA. *Nature* 364, 548–549.
- Husnain, S.I., Meng, W., Busby, S.J., Thomas, M.S., 2004. *Escherichia coli* can tolerate insertions of up to 16 amino acids in the RNA polymerase alpha subunit inter-domain linker. *Biochim. Biophys. Acta* 1678, 47–56.
- Ishihama, A., et al., 1980. Temperature-sensitive mutations in the alpha subunit gene of *Escherichia coli* RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* 137, 137–150.
- Jeon, Y.H., Yamazaki, T., Otomo, T., Ishihama, A., Kyogoku, Y., 1997. Flexible linker in the RNA polymerase alpha subunit facilitates the independent motion of the C-terminal activator contact domain. *J. Mol. Biol.* 267, 953–962.
- Karaivanova, I.M., et al., 1999. Mutational analysis of the thermostable arginine repressor from *Bacillus stearothermophilus*: dissecting residues involved in DNA binding properties. *J. Mol. Biol.* 291, 843–855.
- Kimura, M., Fujita, N., Ishihama, A., 1994. Functional map of the alpha subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase. Deletion analysis of the amino-terminal assembly domain. *J. Mol. Biol.* 242, 107–115.
- Maas, W.K., 1994. The arginine repressor from *Escherichia coli*. *Microbiol. Rev.* 58, 631–640.
- Mooney, R.A., Darst, S.A., Landick, R., 2005. Sigma and RNA polymerase: an on-again, off-again relationship? *Mol. Cell* 20, 335–345.
- Morin, A., Huysveld, N., Braun, F., Dimova, D., Sakanyan, V., Charlier, D., 2003. Hyperthermophilic *Thermotoga* arginine repressor binding to full-length cognate and heterologous arginine operators and to half-site targets. *J. Mol. Biol.* 332, 537–553.
- Murakami, K., Fujita, N., Ishihama, A., 1996. Transcription factor recognition surface on the RNA polymerase alpha subunit is involved in contact with the DNA enhancer element. *Embo J.* 15, 4358–4367.
- Nelson, K.E., et al., 1999. Evidence for lateral gene transfer between Archaea and bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* 399, 323–329.
- Peck, M.C., Gaal, T., Fisher, R.F., Gourse, R.L., Long, S.R., 2002. The RNA polymerase alpha subunit from *Sinorhizobium meliloti* can assemble with RNA polymerase subunits from *Escherichia coli* and function in basal and activated transcription both in vivo and in vitro. *J. Bacteriol.* 184, 3808–3814.
- Ross, W., et al., 1993. A third recognition element in bacterial promoters: DNA binding by the alpha subunit of RNA polymerase. *Science* 262, 1407–1413.
- Sakanyan, V., Dekhtyar, M., Morin, A., Braun, F., Dikovski, L., 2003. Method for the identification and isolation of strong bacterial promoters. European patent application 3290203.3. January 27th.
- Saier Jr., M.H., Ramseier, T.M., Reizer, J., 1996. Regulation of carbon utilization. In: Neidhardt, F.C., Curtiss III, R., Ingraham, J.L., Lin, E.C.C., Low, K.B., Reznikoff, W.S., Riley, M., Schaechter, M., Umberger, H.E. (Eds.), *Escherichia coli and Salmonella: Cellular and Molecular Biology*, 2nd ed. ASM Press, Washington, D.C., pp. 1325–1343.
- Song, H., et al., 2001. Transcription regulation in thermophilic bacteria: high resolution contact probing of *Bacillus stearothermophilus* and *Thermotoga neapolitana* arginine repressor–operator interactions. *J. Mol. Biol.* 315, 255–274.
- Snappyan, M., Lecocq, M., Guevel, L., Arnaud, M.C., Ghochikyan, A., Sakanyan, V., 2003. Dissecting DNA–protein and protein–protein interactions involved in bacterial transcriptional regulation by a sensitive protein array method combining a near-infrared fluorescence detection. *Proteomics* 3, 647–657.
- Vargas, M., Noll, K.M., 1996. Catabolite repression in the hyperthermophilic bacterium *Thermotoga neapolitana* is independent of cAMP. *Microbiology* 142, 139–144.
- Wada, T., Yamazaki, T., Kyogoku, Y., 2000. The structure and the characteristic DNA binding property of the C-terminal domain of the RNA polymerase alpha subunit from *Thermus thermophilus*. *J. Biol. Chem.* 275, 16057–16063.
- Zhang, G., Darst, S.A., 1998. Structure of the *Escherichia coli* RNA polymerase alpha subunit amino-terminal domain. *Science* 281, 262–266.

ANNEXE 2 : Apoptosis, Hypoxia and Neural toxicity

Ref. No: CMP/P-823960-GEN

Christophe OLIVIER, Fanny B. MARHUENDA, François M. VALLETTE and Lisa OLIVER*.

Equipe 4 Labellisée Ligue contre le Cancer, UMR 601 INSERM/Université de Nantes.

9 Quai Moncoussu, 44035 Nantes Cedex 01. France.

*Corresponding author: tel: 33-2-40084080; fax: 33-2-40084082

Email: lisa.oliver@univ-nantes.fr

Key words: apoptosis, hypoxia, glioma

Régulation des processus autophagiques induits par une carence nutritive : rôle des protéines de la famille de Bcl-2 et du facteur de transcription HIF-1 α

Les cellules tumorales se développent dans un environnement pauvre en nutriments et en oxygène suite à leur prolifération incontrôlée. Lors d'une carence nutritive, l'autophagie constitue un processus de survie permettant le recyclage de certains constituants cellulaires. L'autophagie est également activée lors d'une diminution de la concentration en oxygène et est régulée par BNIP3 et Redd1, deux cibles du facteur de transcription HIF-1 α jouant un rôle clef dans la réponse hypoxique des cellules. Notre travail a eu pour but d'étudier le rôle des protéines anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL et de HIF-1 α dans les processus autophagiques induits par une carence nutritive. Nous avons démontré que Bcl-2 et Bcl-xL participent de façon non redondante à la régulation positive de l'autophagie de survie dans la lignée cancéreuse colo-rectale HCT116 déficiente pour l'apoptose. L'activation de l'autophagie par Bcl-2 passerait par son interaction avec la protéine autophagique Beclin-1. Par ailleurs, nous avons observé que la carence nutritive provoque une réponse cellulaire de type hypoxique *via* l'activation transcriptionnelle d'HIF-1 α . Pour la première fois, nous mettons en évidence une régulation positive de l'autophagie de survie induite par une carence nutritive impliquant la protéine d'HIF-1 α . En accord avec la littérature, HIF-1 α ne participerait pas à la régulation de l'autophagie induite par l'anoxie. Nos résultats indiquent que le rôle d'HIF-1 α dans les processus autophagiques déclenchés par la carence nutritive fait intervenir BNIP3, protéine appartenant à la famille de Bcl-2 et connue pour son implication dans la réponse autophagique de différentes lignées cellulaires.

Mots clés : Autophagie, carence nutritive, Bcl-2, Bcl-xL, BNIP3, HIF-1 α , hypoxie.

Regulation of autophagy processes induced by starvation: Involvement of the Bcl-2 family proteins and of the transcription factor HIF-1 α

Hypoxia and nutrient deprivation are environmental stresses that could govern the survival and/or adaptation of tumour cells *in vivo*. During nutrient starvation, a mechanism involved in long-lived protein and senescent organelle degradation, named autophagy, promotes survival by recycling cellular components. Under other circumstances, pro-survival autophagy could become a cell death programme. Inter-connections between these two processes seem to be regulated by the Bcl-2 protein family. Autophagy can also be induced by a decrease in the oxygen level and is described to be activated by an inhibition of mTOR by the Bcl-2 family of proteins, BNIP3 and Redd1, both of which are targets of the transcription factor HIF-1 α involved in hypoxic cellular response. The aim of this study was to explore the role of anti-apoptotic proteins and HIF-1 α in starvation-induced autophagy. Bcl-2 and Bcl-xL have been found to regulate pro-survival autophagy in a non-redundant way in the colo-rectal carcinoma cell line HCT116 (Bax^{-/-}). The autophagic activation of Bcl-2 seems to involve its interaction with the autophagic protein Beclin-1 (Atg6). Moreover, nutrient starvation induces a hypoxia-like response via the transcriptional activation of HIF-1 α . This is the first time that HIF-1 α has been described to be involved in the positive regulation of starvation-induced autophagy. According to literature, HIF-1 α does not seem to regulate anoxia-induced autophagy. Our results show that the autophagic regulation of HIF-1 involves BNIP3, protein known to regulate the autophagic response in different cancer cell lines.

Key words: Autophagy, amino acids and serum starvation, Bcl-2, Bcl-xL, BNIP3, HIF-1 α , hypoxia.

MARHUENDA Fanny
65, rue du Général Buat
44000 NANTES