

Régulation de l'autophagie par l'Acétyl Coenzyme A : des mécanismes à une nouvelle définition des Mimétiques de la Restriction Calorique

L'autophagie est un processus d'autodigestion dans lequel la cellule dégrade ses propres composants dans le but de maintenir l'homéostasie dans ses conditions basales et en situation de stress. En effet, l'activation de ce processus d'autophagie permet le recyclage et l'élimination d'entités dangereuses, telles que des organilles endommagées, des protéines à longue durée de vie ou ayant tendance à s'aggréger. Mécanistiquement, l'autophagie consiste en l'invagination de composants cellulaires de masse ou sélectifs dans une vésicule à double membrane appelée autophagosome, fusionnant *in fine* avec la membrane lysosomale pour la dégradation de son contenu.

L'autophagie est un processus conservé au cours de l'évolution retrouvé à un niveau basal dans toutes les cellules mais cependant très plastique. En effet, en présence de différentes formes de stress, l'autophagie est rapidement induite dans le but de restaurer le *status quo* et de promouvoir la viabilité cellulaire. En particulier, la privation de nutriments représente le stimulus le plus physiologiquement capable d'amorcer l'autophagie. Quand les cellules sont cultivées dans un milieu appauvri en nutriments ou lorsque les souris ont jeûné pendant 24 à 48 heures, l'autophagie est induite aussi bien *in vitro* que *in vivo* en réponse à cette perturbation métabolique; dans ce contexte, la dégradation lysosomale des composants cellulaires médiée par l'autophagie fournit les cellules en substrats énergétiques nécessaires au maintien des fonctions cellulaires en situation de carence nutritionnelle.

Entant donné ce rôle central dans l'homéostasie, des perturbations dans le processus autophagique sont directement ou indirectement liées à des pathologies communes telles que le cancer, les maladies neurodégénératives, l'obésité et le vieillissement.

Dans une perspective moléculaire, la génération de l'autophagosome est un processus complexe et finement régulé qui peut être divisé en trois phases : l'initiation, l'élongation et l'expansion. Chacune de ces étapes est orchestrée par une série de protéines Atg agissant de manière coordonnée afin d'assurer la

correcte formation de l'autophagosome. Outre leurs fonctions structurales et organisationnelles, les protéines Atg constituent des centres majeurs de régulation de l'autophagie. En particulier, l'activité du complexe d'initiation ULK1 est sous le contrôle de mTORC1, un intégrateur des apports énergétiques dérivant de la signalisation de l'insuline et de la disponibilité en acides aminés dans la traduction et l'activation de processus anaboliques, ainsi que répresseur majeur de l'autophagie. mTORC1 phosphoryle ULK1 sur différents sites inhibiteurs et inhibe ainsi l'autophagie. Lors du jeûne en nutriments, mTORC1 est inhibé et l'activité kinase de ULK1 est ainsi libérée. De manière similaire, Beclin-1 (un composant essentiel de la nucléation), Atg5 et Atg7 (impliqués dans la conjugaison de LC3 à l'autophagosome) représentent des points majeurs de la régulation de l'autophagie.

L'autophagie peut aussi bien être un processus de masse qu'un processus sélectif; dans ce dernier cas, l'interaction entre les protéines Atg, les adaptateurs et les protéines spécifiques de l'organelle explique le renouvellement et la dégradation des composants cellulaires (mitochondrie, Reticulum Endoplasmique, etc) ou des pathogènes. L'autophagie induite par le jeûne est considérée comme un processus de masse dans lequel de larges parties du cytoplasme subissent la dégradation lysosomale; il semble que le rôle évolutif de l'autophagie est intimement lié à l'adaptation à une perturbation métabolique; en effet, les souris Atg5 KO, qui ne parviennent pas à activer l'autophagie, meurent peu après leur naissance succombant au jeûne post-partum.

Les signaux métaboliques de la carence nutritive activent l'autophagie dans le but de dégrader des macromolécules et d'obtenir des substrats riches en énergie nécessaires aux besoins cellulaires. Pour cette raison, nous pouvons voir de manière évidente comment l'autophagie et le métabolisme cellulaire se croisent à différents niveaux. Des recherches récentes ont identifié des paramètres métaboliques clés qui changent en condition de jeûne et qui sont capables d'activer l'autophagie par l'action de senseurs métaboliques.

Parmi les différents métabolites qui peuvent influencer la voie autophagique, un rôle central est occupé par des métabolites énergétiques clés tels que l'ATP, le NADH, les acides aminés et les lipides. Le statut énergétique des cellules peut être résumé par le concept de "charge énergétique" du système adénylate (reflétant les concentrations intracellulaires d'ATP, ADP et AMP), calculée selon la formule $([ATP] + 1/2 [ADP]) / ([ATP] + [ADP] + [AMP])$. Quand la synthèse d'ATP est diminuée, comme conséquence de la réduction glycolytique et de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) ou de la privation de glucose, la valeur absolue de la charge énergétique diminue en réponse à une hausse drastique de la concentration en AMP. Cet événement est capable d'amorcer l'activation du principal senseur du système adénylate cellulaire, l'AMPK. L'activation de l'AMPK est essentielle pour induire l'autophagie, principalement pour son activité inhibitrice à l'égard de mTOR. L'inhibition de mTOR médiée par AMPK a plusieurs volets : elle peut phosphoryler et activer l'inhibiteur de mTOR TSC2 ou sa sous-unité activatrice Raptor, de plus, l'AMPK peut directement activer l'autophagie en phosphorylant ULK-1 ou Beclin-1 en absence de glucose. Au-delà d'une baisse des concentrations en ATP, le jeûne nutritif est caractérisé par une diminution des concentrations de la source principale d'énergie de pouvoir réductif des réactions bioénergétiques, soit le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH). En conséquence du jeûne nutritif, les deux voies métaboliques majeures de la production en NADH, la glycolyse et le cycle de Krebs, sont régulées à la baisse. Cet événement résulte en la réduction des niveaux de NADH parallèlement à l'augmentation de ceux en NAD^+ . La diminution du ratio $NADH/NAD^+$ est un fait *per se* capable d'amorcer l'autophagie. Le lien entre $NADH/NAD^+$ et activation de l'autophagie est représenté par des réactions de déacétylation protéique médiées par les histones déacétylases de classe III (Sirtuins chez les mammifères) qui peuvent être considérées comme des senseurs cellulaires de $NADH/NAD^+$. Sirtuin 1 (SIRT1), un des principaux régulateurs de la réponse au jeûne, nécessite NAD^+ comme cofacteur pour son activité catalytique. Lors de la carence en nutriments, SIRT1 cytoplasmique déacétyle les protéines

essentielles à l'autophagie Atg5, Atg7, Atg12 et LC3 ainsi que Beclin-1 libérant par conséquent ces protéines de l'acétylation inhibitrice.

Dans les cellules eucaryotes, la réponse à l'épuisement en acides aminés essentiels est centrée sur deux systèmes distincts qui intègrent l'information sur la disponibilité en acides aminés en activant la synthèse protéique, soient le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α et mTOR. eIF2 α représente le centre régulateur du Contrôle Général des Acides Aminés (GAAC); dans ce système, une baisse des niveaux d'acides aminés résulte en l'accumulation d'ARNt non chargés, à son tour activant la kinase eIF2 α k4. Par phosphorylation inhibitrice de eIF2 α sur Ser51, GNC2 assure à la fois un blocage de la traduction (en absence d'acides aminés essentiels) et une stimulation de l'autophagie promouvant la traduction du facteur de transcription ATF4. Ce dernier contrôle l'expression de plusieurs gènes ATG incluant ATG5, ULK1 et LC3.

La kinase mTOR Ser/Thr répond à la disponibilité en facteurs de croissance et en acides aminés (en particulier la leucine) en phosphorylant et activant 4EBP1 et la kinase ribosomale S6, promouvant de fait la synthèse protéique et agissant comme principal répresseur de l'autophagie. Les mécanismes par lesquels les acides aminés activent mTOR ne sont pas encore complètement caractérisés et sont interconnectés avec le système des petites protéines G contrôlant la fonction de mTOR. Il est pensé que mTOR détecte la présence d'acides aminés à l'intérieur de la lumière lysosomale, dès lors que mTORC1 active est localisée au niveau de la membrane lysosomale. Par ailleurs, il a été établi que cette fonction détectrice en acide aminés de mTORC1 repose sur les protéines GTPases Rag et sur leur statut de charge en GTP, dépendant à leur tour de la disponibilité en acides aminés dans la lumière lysosomale.

Basé sur ces résultats, il est évident que la régulation métabolique et l'autophagie reposent sur des senseurs métaboliques tels que mTOR et AMPK qui influencent le processus autophagique en phosphorylant différents substrats. Récemment, un travail publié par Morselli *et al.* en 2011 a montré

comment deux composants naturels, la spermidine et le resveratrol, étaient capables d'induire l'autophagie par des mécanismes distincts mais convergents. De façon surprenante, ces deux composés étaient capables d'induire des changements similaires du niveau d'acétylation protéique dit acétylprotéome (détecté par la technique de spectrométrie de masse SILAC) et en particulier en (dé)acétylant des substrats cytosoliques communs importants pour l'activation de l'autophagie. En effet, le resveratrol est un activateur (indirect) de SIRT1, tandis que la spermidine agit comme un inhibiteur général des acétyltransférases. Compte tenu de ces faits, il semble clair que la modulation épigénétique de l'autophagie dans le cytoplasme par les réactions de (dé)acétylation représente une nouvelle étape de la régulation de ce processus. En effet, les cellules hébergent de multiples acétyltransférases et (dé)acétylases dont le rôle sur la régulation de l'autophagie n'a pas été investigué en détail. A noter que l'acétylation est en concurrence avec la phosphorylation dans la régulation épigénétique de plusieurs processus cellulaires et que la plupart des protéines cellulaires sont retrouvées acétylées.

Le premier but de ma thèse a été de déterminer si les réactions de (dé)acétylation protéique étaient un fait commun de l'induction de l'autophagie. Par une approche de spectrométrie de masse au moyen d'isotopes stables marqués avec des acides aminés en culture cellulaire (SILAC), nous avons décidé de comparer les effets à court terme suscités par la plupart des inducteurs communs de l'autophagie, tels que la carence en nutriments et la rapamycine, sur l'acétylprotéome cytosolique. L'analyse des modèles globaux de l'acétylation nous ont permis (i) de définir des voies de signalisation convergentes et divergentes affectées par ces modulateurs de l'autophagie, (ii) d'identifier les substrats et (iii) d'établir une nouvelle fonction de régulation de l'autophagie par acétylation indépendante de la transcription. Dans le contexte de l'autophagie induite par le jeûne et le croisement entre l'autophagie et le métabolisme, nous avons pour but de déterminer si l'acétylation pouvait représenter un niveau supplémentaire de "régulation métabolique de l'autophagie" en plus des axes AMP/AMPK- et acides

aminés/mTOR déjà décrits. Le lien idéal pour cette étude est suggéré par la propriété des acétyltransférases à catalyser leur réaction en utilisant l'AcétylCoA (AcCoA) comme substrat. L'AcCoA est une molécule ne traversant pas les membranes, constituée par un groupe acétyl (CH₃CO) lié à un coenzyme A (CoA), un dérivé de vitamine B5 et de cystéine, par une liaison thioester. Comme les liaisons thioester sont riches en énergie, la structure chimique de l'AcCoA facilite le transfert du groupe acétyl à une variété de molécules acceptrices, incluant les groupes aminés sur les protéines. En particulier, l'acétylation lysine des protéines peut être catalysée par divers groupes de lysine acétyltransférases (KATs). Le génome humain code pas moins de 22 KATs distinctes qui possèdent une spécificité des substrats marqués. Beaucoup de KATs ont une K_d relativement haute (faible affinité) pour l'AcCoA, ceci signifie que les fluctuations physiologiques de la quantité en AcCoA dans le compartiment cellulaire, où ces KATs sont exprimées, peuvent affecter leur activité catalytique. Pour cette raison, nous avons décidé de voir si lors de l'autophagie induite par le jeûne, une baisse des niveaux d'AcCoA pouvait représenter un nouveau paramètre métabolique capable d'influencer la réponse autophagique *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, la réduction de l'activité KAT et par conséquent une diminution en niveaux protéiques, conduirait finalement à l'induction de l'autophagie. En effet, l'AcetylCoA représente une molécule énergétique clé au croisement du catabolisme des sucres, des lipides et des acides aminés et peut ainsi servir de molécule signal au statut cellulaire "nourrit/état de jeûne".

Les recherches sur la voie métabolique contrôlant l'AcCoA dans les cellules nous a amené à identifier de nouveaux modulateurs autophagiques pouvant être potentiellement utilisés à des fins translationnelles. En particulier, la restriction calorique a été démontrée pour jouer un rôle pro-santé dans différents contextes pathologiques, incluant mais non limités au cancer et au vieillissement

(possiblement dépendant de l'autophagie). *De facto*, la privation en nutriments se présente comme une stratégie difficile à accepter en clinique.

L'étude de la régulation métabolique de l'autophagie induite par le jeûne peut ainsi nous aider à identifier des composés qui, par induction autophagique, peuvent mimer les altérations métaboliques et les effets pro-santé provoqués par la restriction calorique. A ce jour, les thérapies basées sur l'autophagie ont été inefficaces en raison des effets indésirables (par exemple Sirolimus) ou de la non spécificité des composés. Par conséquent, nous avons cherché à valider le rôle des agents réductifs de l'AcCoA dans les paramètres pathologiques pour lesquels l'autophagie est connue pour être impliquée dans le processus pathogénique.

Pendant la première partie de ma thèse, nous avons mis en place une méthode de détection rapide de l'acétylation protéique cytosolique par immunofluorescence marquant les queues de lysines acétylées. Au moyen de cette méthode, il est possible de perméabiliser la membrane cytosolique sans altérer la membrane nucléaire, permettant ainsi à un anticorps anti-lysine acétylée de reconnaître uniquement les protéines cytosoliques. Partant du fait que le resveratrol, un polyphénol, déclenche l'autophagie par activation de SIRT1 et (dé)acétylation des protéines cytosoliques, nous avons étudiés les effets pro-autophagiques de composés phénoliques. De façon importante, nous avons établi une corrélation entre acétylation cytosolique (mais pas nucléaire) et induction autophagique. Nous avons alors indirectement confirmé ces résultats *in vivo* en démontrant que les composés phénoliques contenus dans le café étaient capables de stimuler l'autophagie et de diminuer l'acétylation protéique dans différents organes murins.

Guidés par le fait que cette (dé)acétylation protéique pourrait effectivement affecter le processus de régulation, nous avons cherché à savoir si cette modulation épigénétique intervenait lors de stimuli autophagiques physiologiques tels que la carence nutritive. Par des analyses métabolomiques, nous

avons observé que le jeûne à court terme *in vitro* ainsi que le jeûne de 48h *in vivo* présentaient comme caractéristique commune une réduction drastique des niveaux en AcCoA, reflétée par une diminution en acétylation protéique cytosolique et par l'induction de l'autophagie. La réduction de l'acétylation protéique par le jeûne a été également confirmée par l'approche de spectrométrie de masse SILAC, dans laquelle la plupart des protéines cytosoliques s'avèrent être hypoacétylées.

Nous avons ainsi exploré la modulation pharmacologique et génétique de la voie métabolique, menant à la production d'AcCoA, par différentes sources d'énergie (telles que le glucose, l'acétate, les acides aminés branchés, les intermédiaires du cycle de Krebs) afin de voir si elle pouvait également modifier l'autophagie et l'acétylation.

Plus particulièrement, nous avons observé que le blocage de l'importation du pyruvate glycolytique dans la mitochondrie ou l'inhibition de la conversion du pyruvate en AcCoA dépendant de la PDH via l'activation des PDKs, réduisait les niveaux d'AcCoA, l'acétylation protéique et induisait l'autophagie. Etant une molécule chargée, l'AcCoA ne peut traverser passivement les membranes cellulaires. Pour cette raison, l'AcétylCoA est exporté dans le cytosol sous forme de citrate et est reconverti en AcCoA par ACLY, la principale enzyme responsable de la production de l'AcCoA. L'inhibition chimique du transporteur du citrate mitochondrial par ACLY induit la triade réduction de l'AcCoA/(dé)acétylation protéique/induction autophagique. Fait important, l'hydroxycitrate, un inhibiteur compétitif de ACLY, a été montré comme stimulateur de l'autophagie dans divers tissus murins.

Au contraire, les approches chimiques ou génétiques visant à réapprovisionner le pool d'AcétylCoA ont montré qu'elles augmentent l'acétylation protéique et inhibent l'autophagie induite par le jeûne; en effet, l'administration d'intermédiaires du cycle de Krebs (tels que la forme perméable de l'alpha-cétoglutarate) ou d'intermédiaires du catabolisme des acides aminés

branchés inhibent l'autophagie induite par le jeûne avec pour conséquence une hausse en AcCoA et des niveaux d'acétylation protéique.

Nous avons ainsi démontré que cette baisse en AcCoA cytosolique est corrélée à une diminution en acétylation protéique et à l'induction de l'autophagie. Aussi, nous avons observé que l'export du citrate et ACLY sont des événements obligatoires pour augmenter les niveaux d'AcétylCoA et inhiber l'autophagie induite par le jeûne. Par conséquent, nous avons pu voir que l'AcCoA *per se* agit comme un répresseur majeur l'autophagie induite par le jeûne, comme l'a confirmée la microinjection d'AcCoA qui a montré l'inhibition de l'autophagie induite par la carence nutritive.

Nous avons exploité la découverte d'agents augmentant l'AcCoA tels que des inhibiteurs de l'autophagie dans un modèle de maladie cardiovasculaire dans laquelle l'autophagie joue un rôle préjudiciable. En outre, sachant que la disponibilité en AcCoA peut directement contrôler l'activité des KATs, nous avons criblé une petite quantité d'ARN interférents (ARNsi) dirigés contre des KATs humains, dont la localisation n'est pas strictement nucléaire, pour leur capacité à induire l'autophagie en réponse à une augmentation en concentrations d'AcCoA. Ainsi, nous avons trouvé que la KAT EP300 est un senseur de la concentration en AcCoA cytosolique, traduisant un signal de disponibilité en nutriments dans l'inhibition de l'autophagie. En effet, en présence de nutriments, EP300 acétyle et inhibe les protéines autophagiques clés telles que Atg5, Atg7, LC3 et Beclin-1 limitant ainsi l'autophagie. Par ailleurs, nous avons caractérisé un mécanisme anticipatoire d'autorégulation selon lequel la présence de EP300 s'autoacétyle boostant ainsi son activité catalytique. De fait, la déplétion en AcCoA impacte directement sur l'activité de EP300, amorçant une autophagie à court terme et indépendante du noyau, comme l'a confirmé le fait que les agents diminuant l'AcCoA fonctionnent dans le cytoplasme. En résumé,

nous avons démontré que la carence en nutriments est caractérisée par une baisse rapide de la concentration en AcCoA cytosolique, culminant dans l'inhibition de l'activité de EP300 et l'activation de l'autophagie.

Les composés capables de réduire la concentration d'AcCoA, tels que les inhibiteurs de EP300 ou les activateurs de HDAC, peuvent être *bona fine* considérés comme des Mimétiques de la Restriction Caloriques "MRC". Selon cette nouvelle définition, nous avons criblé des inhibiteurs spécifiques ou non des KATs et nous avons élucidé que leur activité inhibitrice envers les KATs est corrélée à l'induction de l'autophagie. En particulier, nous avons constaté que la spermidine pouvait induire l'autophagie (également) par inhibition de EP300.

En perspective, les réactions de déacétylation régulant l'autophagie pourraient être utilisées comme biomarqueurs pour mesurer les effets des MRC *in vitro* et *in vivo*. De plus, si la détection de la déacétylation et l'induction de l'autophagie constituaient des biomarqueurs précis pour prédire l'efficacité des MRC, ils pourraient à leur tour faciliter les cribles pharmacologiques pour l'identification de nouveaux MRC. Dans de tels cribles, les cultures cellulaires pourraient être exposées à des MRC candidats et l'autophagie pourrait être détectée (par exemple, par le contrôle de la redistribution de la protéine verte fluorescente (GFP)-LC3 aux autophagosomes). La déacétylation de protéines générales ou spécifiques pourrait également être mesurée. Finalement, si la déacétylation constitue le point où lequel l'autophagie est régulée par l'AcCoA, les acétyltransférases et les déacétylases, il semble évident que cette combinaison particulière d'inducteurs de l'autophagie doivent interagir de manière synergique. Il sera important d'étudier de telles interactions plus en détail afin de mieux comprendre les possibles effets bénéfiques et collatéraux *in vivo*.