



HAL
open science

Etude du rôle de la co-chaperonne BAG6 dans la régulation de la mitophagie

Romain Ragimbeau

► **To cite this version:**

Romain Ragimbeau. Etude du rôle de la co-chaperonne BAG6 dans la régulation de la mitophagie. Sciences agricoles. Université Montpellier, 2020. Français. NNT : 2020MONTT022 . tel-03144035

HAL Id: tel-03144035

<https://theses.hal.science/tel-03144035>

Submitted on 17 Feb 2021

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE POUR OBTENIR LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE MONTPELLIER

En Biologie-Santé

École doctorale CBS2 N°168 – SCIENCES CHIMIQUES ET BIOLOGIQUES POUR LA SANTE

Unité de recherche : INSTITUT DE RECHERCHE EN CANCEROLOGIE DE MONTPELLIER, INSERM U1194

Etude du rôle de la co-chaperonne BAG6 dans la régulation de la mitophagie

Présentée par Romain RAGIMBEAU
Le 16 octobre 2020

Sous la direction de Sophie PATTINGRE
et Céline GONGORA

Devant le jury composé de

Nadine HOUEDE, PUPH, CHU de Nîmes, INSERM U1194

Etienne MOREL, DR, Institut Necker Enfants Malades, INSERM U1151

Valérie PIERREFITE, CR, Université de Nice, UMR E4320

Frédéric GROS, MCU, Université de Strasbourg, IBMC

Sophie PATTINGRE, CR, IRCM, INSERM U1194

Céline GONGORA, DR, IRCM, INSERM U1194

Présidente du jury

Rapporteur

Rapporteuse

Examineur

Directrice de thèse

Co-directrice de thèse



UNIVERSITÉ
DE MONTPELLIER

REMERCIEMENTS

Je remercie d'abord tous les membres du jury de me faire l'honneur de participer à mon évaluation finale :

Le professeur Nadine Houédé pour avoir accepté la présidence du jury

Valérie Pierreffite et Etienne Morel d'être les rapporteurs de ce travail de thèse.

Frédéric Gros, merci pour votre présence en tant qu'examineur

Mes remerciements vont également à l'Université de Montpellier et à l'école doctorale CBS2 pour m'avoir attribué la bourse ayant permis la réalisation de ce doctorat.

Je tiens à remercier toutes celles et ceux qui ont contribué à la réalisation de ce travail :

Ma directrice de thèse Sophie Pattingre.

Ma co-directrice de thèse et cheffe d'équipe Céline Gongora.

Les membres de mon comité de thèse Lucile Espert et Ollivier Milhavet.

Leila El Kebriti qui a initié ce projet.

Elise Fourgous pour sa rigueur et sa persévérance.

Je remercie enfin tous les membres de l'équipe « Résistance aux traitements et thérapies innovantes » ainsi que tous mes camarades de thèse pour m'avoir soutenu, encouragé, conseillé durant ces trois années de recherche.

SOMMAIRE

LISTE DES ABRÉVIATIONS	7
INTRODUCTION	8
I) GENERALITES SUR L'AUTOPHAGIE	9
A) Historique de la découverte de l'autophagie	9
B) Les différents types d'autophagie	12
1) La microautophagie.....	13
2) L'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA).....	14
3) La macroautophagie.....	15
C) Sélectivité de l'autophagie	15
D) Fonctions de l'autophagie	17
1) Fonction énergétique.....	17
2) Fonction cytoprotectrice.....	18
a) Autophagie et vieillissement.....	18
b) Autophagie et cancer.....	18
II) LA MACHINERIE MOLECULAIRE DE L'AUTOPHAGIE	20
A) Initiation	20
B) Nucléation	21
C) Elongation de la membrane autophagosomale	22
1) Le système ATG12-ATG5-ATG16.....	22
2) Le système LC3 / GABARAP.....	22
3) La séquestration spécifique du contenu cytoplasmique.....	24
D) Fusion et dégradation	25

III) GÉNÉRALITÉS SUR LES MITOCHONDRIES	26
A) Structure	26
B) Fonctions	26
1) Rôle métabolique.....	26
2) Mort cellulaire par apoptose.....	27
C) Contrôle qualité des mitochondries	29
1) Contrôle qualité des protéines mitochondriales.....	29
a) Dépendant des chaperonnes.....	29
b) Dépendant des protéases mitochondriales.....	29
2) Contrôle qualité de l'ensemble de la mitochondrie.....	30
a) La complémentarité fonctionnelle entre mitochondries.....	30
b) L'élimination des mitochondries par mitophagie.....	30
D) La dynamique mitochondriale chez les mammifères	31
1) Les mécanismes de la dynamique mitochondriale.....	32
a) La fusion mitochondriale.....	32
b) La fission mitochondriale.....	33
2) Fonctions de la dynamique mitochondriale.....	34
a) La fusion mitochondriale régule le métabolisme cellulaire.....	34
b) La fission mitochondriale permet la répartition cellulaire des mitochondries.....	34
c) La fission mitochondriale est un pré-requis à l'apoptose.....	35
d) La fission mitochondriale est un pré-requis à la mitophagie.....	35
IV) LA MITOPHAGIE	37
A) Généralités	37
B) Fonctions de la mitophagie	37
C) La mitophagie canonique : dépendante de l'ubiquitinylation des protéines mitochondriales	38
1) La voie de signalisation PINK1-PARKIN.....	38
2) Conséquences de l'ubiquitinylation des protéines de la membrane externe.....	40
a) Recrutement des récepteurs cytosoliques (adaptateurs) de la mitophagie.....	40
b) OMMAD et mise en jeu des récepteurs mitochondriaux de la membrane interne.....	40

D) La mitophagie non canonique : indépendante de l'ubiquitinylation des protéines mitochondriales	41
1) La régulation des récepteurs mitochondriaux protéiques.....	41
2) La régulation des récepteurs mitochondriaux de type cardiolipine.....	42
E) Implications physiopathologiques de la mitophagie	43
1) Mitophagie et cancer.....	43
2) Mitophagie et cardiopathies.....	43
3) Mitophagie et maladies neurodégénératives.....	44
a) Maladie de Parkinson.....	44
b) Maladie de Huntington.....	45
F) Conclusion	45
V) LA PROTEINE BAG6	46
A) Généralités	46
B) Localisation	46
C) Structure de la protéine BAG6	47
1) Région N-terminale (acides aminés 1-474).....	47
2) Extrémité C-terminale.....	47
3) Région centrale.....	48
D) Fonctions de BAG6	48
1) Régulation de l'apoptose.....	48
2) Contrôle qualité des protéines cytoplasmiques.....	49
a) Régulation de l'activité et de l'expression des chaperonnes HSP70.....	49
b) Elimination des polypeptides agrégés ou défectueux.....	49
c) Translocation et rétrotranslocation des protéines ancrées au RE.....	50
3) Fonctions nucléaires.....	52
a) Régulation épigénétique.....	52
b) Régulation du cycle cellulaire.....	52
4) BAG6 est une navette pour l'acétyl-transférase EP300.....	53
5) Fonctions mitochondriales.....	54
OBJECTIFS DE LA THESE	56
RESULTATS	58
DISCUSSION	90
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	98

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADP : Adénosine di-phosphate	MAP1LC3 : Microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3
ADN : Acide désoxyribonucléique	MEFs : Mouse embryonic fibroblast
ADNmt : ADN mitochondrial	MFN1 : Mitofusine 1
AIF : Apoptosis inducing factor	MFN2 : Mitofusine 2
ARN : Acide ribonucléique	
ATG : Autophagy-related gene / protein	NLS : Nuclear Localization Sequence
ATP : Adénosine tri-phosphate	NIPSNAP : 4-Nitrophenylphosphatase domain and non-neuronal SNAP25-like
ATPase : Enzyme hydrolysant l'ATP	
AUT : Autophagocytosis	OMM : Outer mitochondrial membrane
	OMMAD : Outer Mitochondrial Membrane-Associated Degradation
BAG : Bcl-2-associated athanogene	OPA1 : Optic Atrophy 1
BH3 : Bcl-2 homology 3	
	PI3K : Phosphoinositol-3 kinase
CDK : Cyclin-dependant kinase	PI3KR4 : Sous-unité régulatrice 4 de la PI3K
CMA : Chaperone-mediated autophagy	PI3P : Phosphatidylinositol 3-phosphate
CVT : Cytoplasm to vacuole targeting	
	RE : Réticulum endoplasmique
DRP1 : Dynamin-related protein 1	UBD : Ubiquitin Binding Domain
	UBL : Ubiquitin-Like
ECI : Evolutionary conserved islands	UPS : Ubiquitin-protasome system
ERAD : Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation	
ERO : Espèce réactive de l'oxygène	VPS : Vacuolar protein sorting
ES : Embryonic stem	
ESAT-6 : Early secretory antigenic target 6	SNAP : Synaptosomal-associated protein
	SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor
FIP200 : Focal adhesion kinase-Interacting Protein of 200 kDa	
	TIM : Translocase of the inner membrane
GABARAP : Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein	TOM : Translocase of the outer membrane
GTP : Guanosine tri-phosphate	
GTPase : Enzyme hydrolysant le GTP	ULK : Unc-51 like autophagy activating kinase
	VAMP : Vesicle-associated membrane protein
HSP : Heat shock protein	
IMM : Inner mitochondrial membrane	
LIR : LC3 interacting region	
LC3 : Light chain 3	

INTRODUCTION

I) GÉNÉRALITÉS SUR L'AUTOPHAGIE

A) Historique de la découverte de l'autophagie

Le terme « autophagie » dérive du grec auto (soi-même) et phagein (manger) et signifie « se manger soi-même ». Il désigne un mécanisme conservé au cours de l'évolution (présent chez tous les eucaryotes étudiés à ce jour), grâce auquel le matériel intracellulaire des cellules eucaryotes est séquestré dans des vacuoles autophagiques appelées autophagosomes. Le matériel séquestré est ensuite digéré puis recyclé par l'intermédiaire du lysosome (nommé vacuole chez la levure) (1).

Les premières observations de vésicules à double membrane, caractéristique de la structure de l'autophagosome, ont été faites en microscopie électronique par SL. Clark en 1957 dans des cellules rénales de souris âgées de moins de 2 semaines (2).

En 1962, TP. Ashford et KR. Porter, décrivent dans des hépatocytes de rats préalablement traités au glucagon, une augmentation du nombre de vésicules semblables à celles observées par Clark, et dont certaines contiennent des mitochondries (Figure 1). Ils proposent qu'il s'agit de foyers d'autolyse isolés par une membrane afin de préserver le reste de la cellule du processus de dégradation (3).

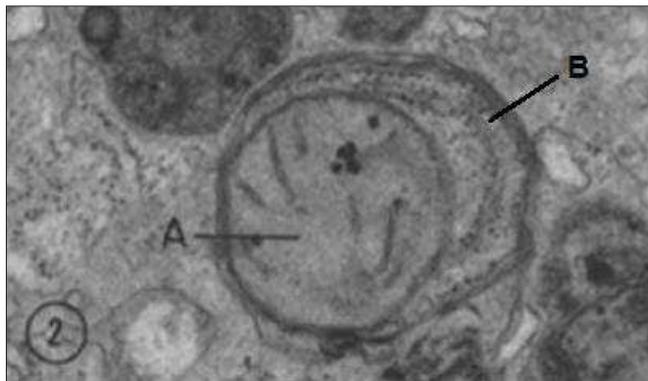


Figure 1. Une mitochondrie (A) séquestrée dans un autophagosome (B) (3).
Section de foie de rat observée en microscopie électronique.

En parallèle, AB. Novikoff et E. Essner démontrent au début des années 1960, un lien entre autophagosome et lysosome en décrivant des structures qu'ils nomment « cytolysosomes » : des organites ayant une activité phosphatase acide (caractéristique des lysosomes) et contenant des mitochondries, du réticulum endoplasmique, des ribosomes et d'autres composants cytoplasmiques en cours de dégradation (4).

Le terme autophagie a finalement été proposé en 1963 par Christian de Duve, prix Nobel de Physiologie ou Médecine pour la découverte des lysosomes en 1955, lors du « *Ciba Foundation Symposium on Lysosomes* ».

C. de Duve définit l'autophagie en ces termes : « *numerous recent observations have demonstrated the existence in living cells of a mechanism for the bulk segregation and digestion of portions of their own cytoplasm ; this mechanism has been termed focal autolysis, focal cytoplasmic degradation, or cellular autophagy* » (5). Il est intéressant de noter que pour C. de Duve le concept de « *bulk autophagy* » fait référence à un processus de séquestration aléatoire du matériel intracellulaire dans l'autophagosome (5).

Ces travaux pionniers ont établi l'existence de l'autophagie dans les cellules de mammifères. Par la suite, des études ont montré que l'autophagie est régulée par des signaux extracellulaires tels que l'état nutritionnel (6), les hormones de régulation de la glycémie (glucagon et insuline) (7) et par des voies de signalisation intracellulaire impliquant certaines kinases, phosphatases (8,9), et les protéines G (10).

La machinerie moléculaire de l'autophagie est caractérisée dans les années 1990 grâce à des études réalisées chez la levure (*Saccharomyces cerevisiae*). Dans ce modèle eucaryote simple, l'autophagie est induite par la carence nutritionnelle puis étudiée en microscopie grâce à l'apparition de « corps autophagiques » dans la vacuole (Figure 2) (11).

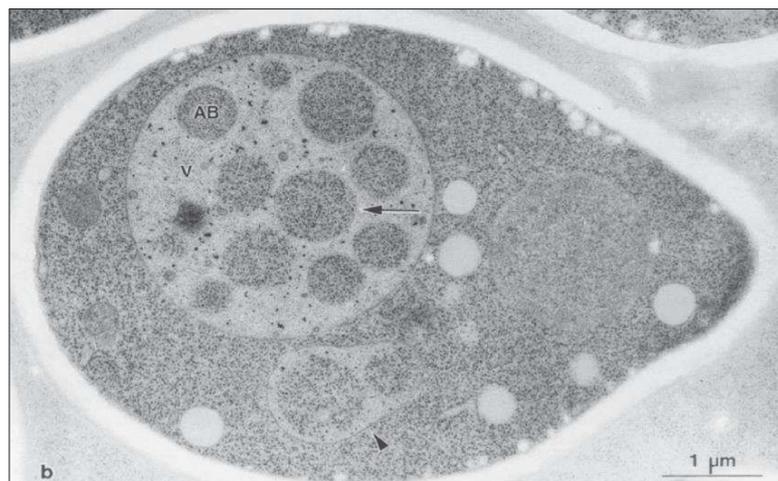


Figure 2. Levure contenant des corps autophagiques au sein de sa vacuole (11).
Observation en microscopie électronique. Légende : V = vacuole, AB = autophagic body.

Ce modèle a permis à l'équipe de Yoshinori Ohsumi de réaliser un criblage génétique et de conclure qu'au moins 15 gènes *APG* (connus aujourd'hui sous le nom d'*ATG* pour « AuTophagy-related genes ») étaient nécessaires au déroulement de l'autophagie chez la levure (12).

Par une approche similaire, M. Thumm identifie en 1994 trois groupes de levures mutantes *AUT* (pour « AuTophagocytosis ») déficientes pour l'autophagie (13) et l'équipe de DJ. Klionsky en 1995 identifie 5 gènes *CVT* (pour « Cytoplasm to Vacuole Targeting) responsables de l'adressage de l'aminopeptidase 1 du cytoplasme vers la vacuole (14).

La caractérisation des gènes essentiels au déroulement de l'autophagie s'est poursuivie entre 1996 et 2000 : d'abord chez la levure, puis chez les mammifères (1). Ces gènes ont été regroupés en 2003 sous la dénomination commune de gène *ATG* (15).

A titre d'exemple, citons le clonage d'*ATG5* par le groupe de Y. Oshumi en 1996 (16), celui d'*ATG3* par le groupe de M. Thumm en 1997 (17) et la découverte chez la levure puis chez l'Homme du complexe *ATG5-ATG12*, dont la conjugaison similaire à celle de l'ubiquitine, dépend d'*ATG7* (E1-like enzyme) et d'*ATG10* (E2-like enzyme) (18,19).

En 1999, l'équipe de Beth Levine est la première à fournir la preuve qu'un gène de mammifère (*BECLIN 1*, l'orthologue d'*ATG6* chez la levure) restaure l'autophagie dans une lignée déficiente de cellules cancéreuses mammaires (MCF-7). En outre, son laboratoire identifie, pour la première fois, l'implication physiopathologique de l'autophagie en démontrant la fonction suppressive de tumeur de *BECLIN 1*, mutée ou absente dans 40 à 75% des cancers sporadiques du sein ou de l'ovaire (20).

En l'an 2000, Y. Ichimura et al. font une avancée majeure en décrivant chez la levure la lipidation d'*ATG8* qui consiste en sa liaison covalente avec les phosphatidyléthanolamines de la membrane autophagosomale (21). La même année, l'orthologue de mammifère d'*ATG8* est identifiée : la protéine *LC3* ou *MAP1LC3* (microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3) qui sert de marqueur moléculaire des autophagosomes (Figure 3) (22).

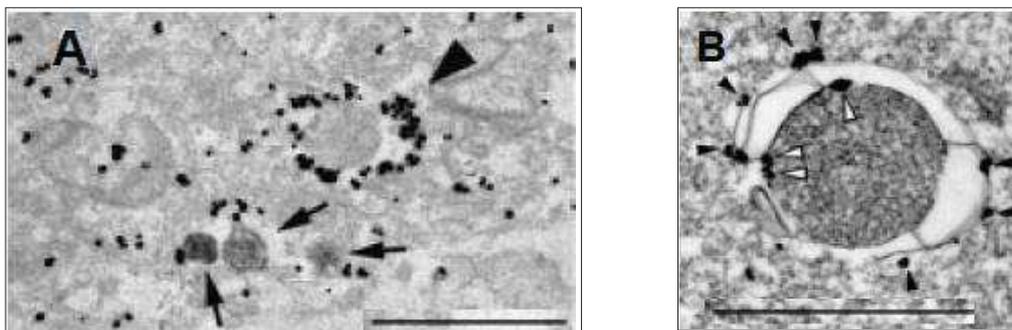


Figure 3. La protéine LC3 associée à la membrane des autophagosomes (22). Observations en microscopie électronique. Barre = 1 μ m. **A** | Cellules HeLa transfectées avec du GFP-LC3 et immunomarquées par un anti-GFP. **B** | Cellules souches embryonnaires murines immunomarquées par un anti-LC3.

A partir de 2003 l'étude de l'autophagie se développe *in vivo* grâce à des modèles animaux déficients pour une protéine *ATG* (1).

Les équipes de N. Heintz et de B. Levine rapportent que chez la souris, l'invalidation du gène *BECLIN 1* est létale et que sa délétion hétérozygote favorise la formation spontanée de tumeurs en lien avec un dysfonctionnement de l'autophagie (23,24). Beth Levine montre également que plusieurs gènes *ATGs* sont impliqués dans la longévité et le développement larvaire du nématode *C. elegans* (25).

En 2004, l'utilisation d'un modèle murin invalidé pour *ATG5* démontre le rôle essentiel de l'autophagie dans la survie du souriceau nouveau-né suite au jeûne néonatal causé par la rupture du lien placentaire (26).

Alors que l'autophagie était traditionnellement considérée comme un processus aboutissant à la séquestration « en vrac » de portions du cytoplasme (5), le concept d'autophagie sélective (c'est-à-dire spécifique d'un élément cytoplasmique) émerge au cours des années 2000. Par exemple, I. Kissová et al. démontrent en 2004 dans la levure qu'une mutation de la protéine Uth1p, située sur la membrane externe de la mitochondrie, inhibe spécifiquement la dégradation des mitochondries par autophagie, alors que la machinerie autophagique est fonctionnelle (27). Pour nommer cette forme sélective d'autophagie impliquant uniquement la mitochondrie, J. Lemasters propose en 2005 le terme de « mitophagie » (28).

Depuis 2005, le nombre de publications concernant l'autophagie est en augmentation exponentielle, et plus de dix-huit mille articles ont été publiés entre 1962 et 2018 (29).

Les progrès réalisés ces trente dernières années concernant la compréhension du fonctionnement de l'autophagie et son importance physiopathologique ont été mis en lumière en 2016, lorsque le japonais Yoshinori Ohsumi a été récompensé pour la découverte des gènes ATG par le prix Nobel de Physiologie ou Médecine.

B) Les différents types d'autophagie

L'autophagie est un processus catabolique majeur des cellules eucaryotes impliquant la dégradation puis le recyclage du contenu intra-cytoplasmique (molécules, organites, micro-organismes) dans le lysosome.

On distingue trois types différents d'autophagie (Figure 4) : la micro-autophagie, l'autophagie dépendante des chaperonnes ou CMA (Chaperone-Mediated Autophagy) et la macro-autophagie. Chaque type d'autophagie est morphologiquement distinct et se caractérise par des mécanismes qui lui sont propres (30).

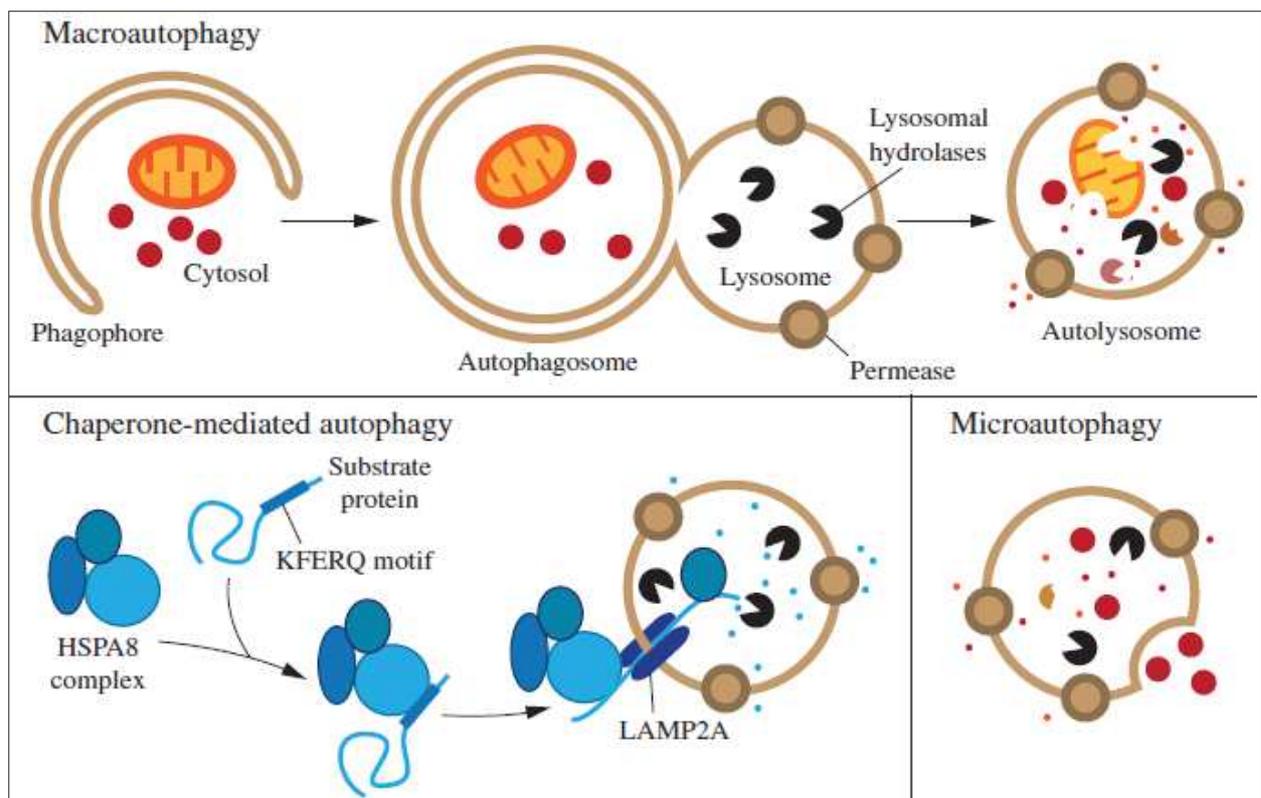


Figure 4. Les trois types d'autophagie dans les cellules de mammifères (30). La macroautophagie repose sur la formation *de novo*, dans le cytosol, de vésicules à double membrane (autophagosomes) capables de séquestrer et de transporter le contenu intracellulaire (cargo) jusqu'au lysosome. La CMA implique le transport de protéines directement à travers la membrane lysosomale. La microautophagie consiste en l'absorption directe du cargo par déformation de la membrane lysosomale. Les trois types d'autophagie conduisent à la dégradation du cargo dans le lysosome et au recyclage des métabolites dans le cytosol.

1) La microautophagie

La microautophagie fait référence à différents processus, qui ont en commun la pénétration du matériel cytoplasmique dans le lysosome ou l'endosome tardif (microautophagie endosomale) par l'intermédiaire d'une invagination ou d'une protrusion de la membrane lysosomale (30). C'est un phénomène initialement décrit chez la levure, dont les mécanismes et les fonctions sont encore incomplètement élucidés.

Selon la nature du contenu cytoplasmique à dégrader on distingue une microautophagie non sélective ou sélective. La microautophagie non sélective permet la dégradation d'une petite portion du cytoplasme aléatoirement séquestrée suite à l'invagination tubulaire du lysosome. Inversement, la microautophagie sélective implique la dégradation d'organites spécifiques (Figure 5) : par exemple des mitochondries (micromitophagie), une fraction du noyau (micronucléophagie) ou des péroxysomes (micropexophagie) (31).

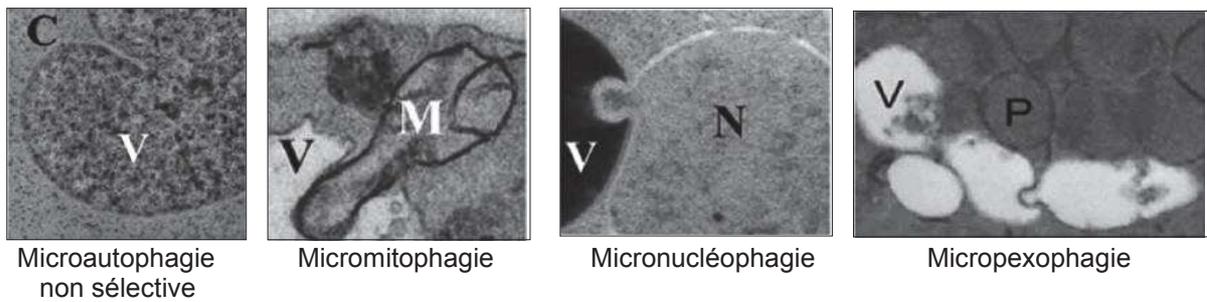


Figure 5. Les différentes formes de microautophagie chez la levure (31). Observations en microscopie électronique. Légende : V = Vacuole, C = Cytoplasme, M = Mitochondrie, N = Noyau, P = Peroxisomes.

2) L'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA)

Un autre type d'autophagie, ayant été décrit à ce jour uniquement chez les oiseaux et les mammifères, se nomme autophagie dépendante des chaperonnes (32).

Elle est strictement sélective et implique la dégradation de protéines cytosoliques à l'intérieur du lysosome. Pour être dégradées par la CMA, ces protéines doivent posséder un motif consensus pentapeptidique KFERQ qui permet l'interaction de la protéine à dégrader (le cargo) avec la chaperonne cytosolique HSP70-8/HSPA8. Environ 40% des protéines de mammifères contiennent un motif de type KFERQ (32). Une fois fixé à la chaperonne HSP70-8 via son domaine KFERQ, le cargo est transporté au niveau de la face externe de la membrane lysosomale, et HSP70-8 se lie au récepteur membranaire monomérique LAMP2A (lysosomal-associated membrane protein 2A). Cette liaison du complexe HSP70-8-cargo à LAMP2A conduit à la multimérisation de LAMP2A et à la formation d'un complexe de translocation permettant la pénétration de la protéine substrat à travers la membrane lysosomale et à sa dégradation dans la lumière du lysosome (30,32). La CMA participe au contrôle qualité des protéines en éliminant celles ayant des défauts conformationnels. En cas d'anomalie lors de la synthèse protéique ou bien en cas de stress post-traductionnel dénaturant (stress oxydant, hypoxique) le motif KFERQ, normalement masqué par la conformation protéique, devient accessible à la HSP70-8 et la protéine est dégradée par CMA (32).

3) La macroautophagie

Enfin, le troisième type d'autophagie se nomme macroautophagie. C'est la forme la mieux décrite et la plus étudiée. Elle se déroule dans toutes les cellules eucaryotes et son mécanisme est conservé au cours de l'évolution. Dans la suite de ce mémoire le terme « autophagie » fera systématiquement référence à la macroautophagie.

Elle diffère de la microautophagie et de la CMA car la séquestration du matériel intracellulaire se fait à distance du lysosome et implique la formation d'une vésicule cytoplasmique nommée autophagosome qui va transporter le cargo vers le lysosome.

Durant l'autophagie, les autophagosomes apparaissent *de novo* à partir de structures à double membrane appelées phagophores, dont l'origine exacte est controversée. Plusieurs études ont suggéré qu'ils émergent à partir d'une protrusion du réticulum endoplasmique appelée omégasome (33,34), d'autres auteurs évoquent plutôt la membranaire plasmique (35), l'appareil de Golgi (36), ou encore la mitochondrie (37) comme autant de sources possibles.

Une fois formé, le phagophore s'allonge, se courbe et se referme autour du matériel à dégrader en générant un autophagosome sphéroïde à double membrane dont la taille est comprise chez les mammifères entre 0,5 et 1,5 μm (30). Il faut approximativement huit minutes pour former un autophagosome.

L'autophagosome est dégradé en fusionnant sa membrane externe avec celle du lysosome, aboutissant à la formation d'un autophagolysosome. Au contact des hydrolases acides lysosomales, la membrane interne de l'autophagosome et son contenu sont dégradés et les métabolites résultant exportés vers le cytosol par l'intermédiaire de perméases lysosomales (30). L'ensemble de ce processus est dépendant de l'activation d'une trentaine de protéines ATGs.

C) Sélectivité de l'autophagie

L'autophagie dite sélective implique la séquestration spécifique dans l'autophagosome d'un organelle, d'une macromolécule ou d'un micro-organisme intracellulaire (virus ou bactérie) (Figure 6) et met en jeu des voies de signalisation et des récepteurs propres à chaque élément à dégrader, tout en reposant sur une machinerie autophagique commune.

Par exemple, l'autophagie sélective des péroxisomes se nomme pexophagie. Elle est décrite principalement chez les levures méthylotrophes et permet la dégradation des péroxysomes lorsque les levures sont cultivées en l'absence de méthanol (38).

L'agrèphagie, quant à elle, désigne l'autophagie sélective des agrégats protéiques. L'accumulation d'agrégats protéique est toxique pour les cellules (notamment pour les neurones) et leur élimination par autophagie contribue au maintien de l'homéostasie cellulaire. Le dysfonctionnement de l'autophagie est un des mécanismes identifiés dans la physiopathologie de certaines maladies neurodégénératives caractérisées par l'accumulation de protéines toxiques (39).

Enfin, lors d'une infection, l'autophagie peut séquestrer le micro-organisme intracellulaire (virus ou bactérie) par un processus appelé xénophagie (40).

La dégradation sélective des mitochondries par autophagie se nomme mitophagie et sera traitée plus précisément dans le chapitre deux de ce mémoire.

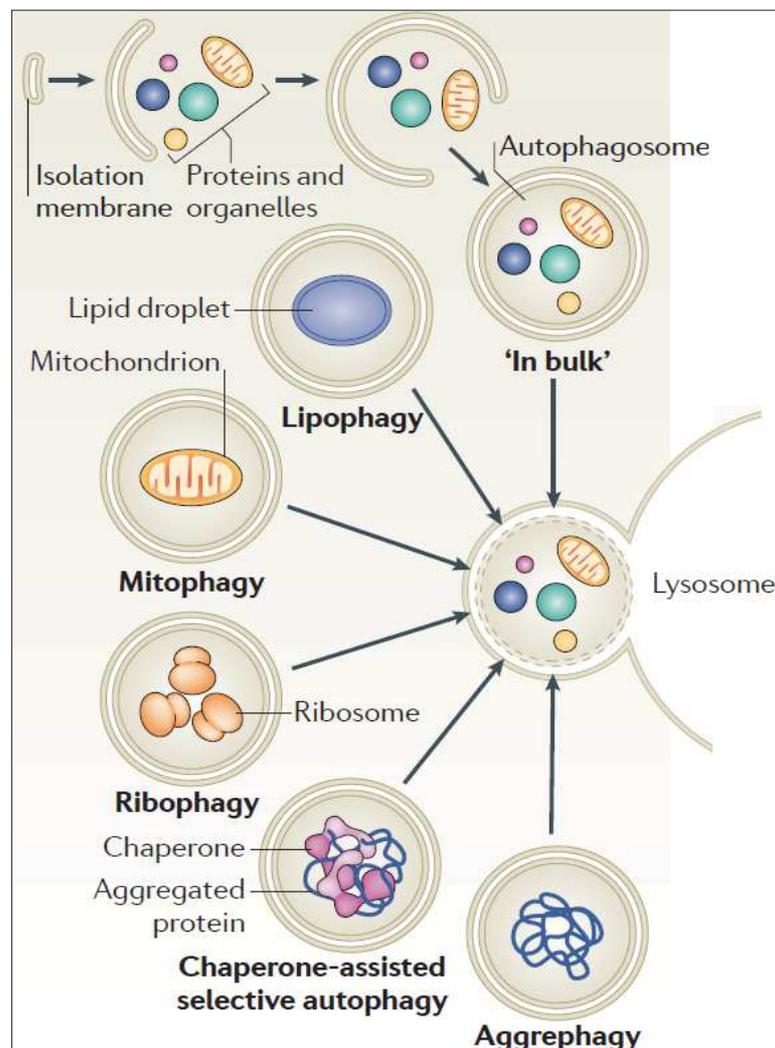


Figure 6. Les différents types d'autophagie (41). Pendant l'autophagie, le contenu intracellulaire est séquestré par une membrane d'isolation formée *de novo* qui s'allonge et se referme pour former un autophagosome. La dégradation se produit lorsque les autophagosomes fusionnent avec les lysosomes. Il existe des formes sélectives de ce processus, dans lesquelles des substrats spécifiques sont dégradés.

D) Fonctions de l'autophagie

1) Fonction énergétique

Une fonction essentielle de l'autophagie est sa capacité à maintenir l'homéostasie énergétique de la cellule en situation de carence nutritionnelle. En effet, l'autophagie est un processus catabolique rapidement inductible qui mobilise les réserves énergétiques endogènes afin de maintenir la synthèse d'ATP (42).

La carence nutritionnelle est l'inducteur le plus puissant de l'autophagie. *In vitro*, l'autophagie est activée en quelques minutes, lorsque les cellules sont privées de glucose, de certains acides aminés et de facteurs de croissance (43). *In vivo*, l'utilisation d'un modèle murin transgénique exprimant le marqueur de l'autophagie LC3 fusionné à la GFP (GFP-LC3), a révélé qu'un jeûne de 24 à 48h induit la formation des autophagosomes dans de multiples organes dont les muscles striés, le foie, le cœur, le rein, le pancréas (44).

Une carence nutritionnelle sévère comme le jeûne met en danger l'intégrité de l'individu : dans cette situation l'autophagie intervient comme un mécanisme de survie. En effet, l'inhibition *in vitro* de l'autophagie par un agent pharmacologique (hydroxychloroquine) ou par l'invalidation d'un gène ATG sensibilise les cellules de mammifères à l'apoptose induite par la carence nutritionnelle (45). Le groupe de Y. Oshumi fit une observation similaire en 1993 : les levures mutées pour *ATG1* ne survivent que deux jours à la carence en azote alors que les levures sauvages survivent plus de cinq jours (12). En 2004, A. Kuma et al. démontrent que des souriceaux déficients pour l'autophagie (invalidés pour *ATG5*), survivent moins longtemps (12h) à une période de jeûne néo-natal que des souriceaux sauvages (21h). Chez les souris mutées, les concentrations sériques et tissulaires en acides aminés (produits du catabolisme cellulaire) sont moindres, illustrant le rôle crucial de l'autophagie en tant que source énergétique en situation de carence nutritionnelle sévère (26).

De manière contre-intuitive, la carence nutritionnelle modérée, appelée restriction calorique (réduction des apports caloriques quotidiens de 20 à 30%), ne met pas en danger la survie de l'individu : bien au contraire elle semble bénéfique pour toutes les espèces étudiées en allongeant leur espérance de vie (46–48). Cette observation laisse entrevoir une autre fonction physiologique importante de l'autophagie que nous allons développer dans le chapitre suivant.

2) Fonction cytoprotectrice

L'autophagie se déroule en permanence en conditions basales et contribue au maintien de l'homéostasie cellulaire en éliminant les organites endommagés ou les agrégats protéiques dont l'accumulation pourrait être néfaste pour la cellule. Elle peut également être induite en situation de stress : lors d'une infection par un micro-organisme intracellulaire ou lors de la carence nutritionnelle. Dans tous les cas, l'autophagie possède une fonction cytoprotectrice en exerçant un contrôle permanent sur la qualité du cytoplasme. Grâce à cette fonction, l'autophagie est impliquée dans la prévention d'un très grand nombre de maladies (49). Nous prendrons comme exemples le cas des maladies dégénératives et du cancer.

a) Autophagie et vieillissement

L'autophagie est fortement impliquée dans le vieillissement et l'apparition des maladies liées à l'âge. Dans divers modèles animaux (nématode, drosophile, souris, rat), des études ont démontré qu'elle décline avec l'âge mais que son induction par restriction calorique favorise la longévité (46,48). D'autre part, plusieurs études génétiques ont établi le rôle des gènes ATGs dans la longévité induite par la restriction calorique (49). Inversement, dans tous les modèles animaux testés, un dysfonctionnement de l'autophagie conduit systématiquement à une réduction de la longévité (25,50,51).

Sur le plan mécanistique, l'autophagie contribue à retarder le vieillissement en réduisant le stress génotoxique induit par l'accumulation de mitochondries non fonctionnelles (*via* la mitophagie), en régulant le métabolisme lipidique (*via* la lipophagie), en éliminant les agrégats protéiques toxiques contribuant à l'apparition de maladies neurodégénératives par exemple (*via* l'agréphagie) (46,48). En outre, l'autophagie inhibe la sénescence au niveau des cellules souches musculaires satellites, mécanisme impliqué dans la sarcopénie (perte de masse et de force musculaire liée à l'âge) (52), et dans les cellules épithéliales tubulaires rénales, la sénescence étant impliquée dans la néphropathie diabétique (53).

b) Autophagie et cancer

De par son rôle cytoprotecteur, l'autophagie est aussi impliquée dans la prévention du cancer, cependant son rôle dans cette maladie est plus ambivalent. En effet, l'autophagie est un mécanisme suppresseur de tumeur mais elle peut devenir oncogénique lorsque la cellule cancéreuse parvient à l'utiliser à son avantage (54).

L'équipe de B. Levine est la première à démontrer en 1999 la fonction oncosuppressive de *Beclin1*, mono-alléliquement délété dans 40 à 75% des formes sporadiques de cancers du sein et de l'ovaire (20). La délétion hétérozygote de ce gène chez la souris conduit à l'apparition spontanée de tumeurs cancéreuses (lymphomes, carcinomes hépatocellulaires, adénocarcinomes pulmonaires) (23,24).

Ce rôle anti-tumoral de l'autophagie a été confirmé par d'autres équipes, par exemple par celle de N. Mizushima qui démontre en 2011 que des souris invalidées pour *Atg5* ou *Atg7* développent spontanément des adénomes hépatiques (55).

Le rôle oncosuppresseur de l'autophagie s'explique principalement par sa capacité à maintenir l'intégrité génomique, par exemple, en éliminant les mitochondries pourvoyeuses de stress génotoxique. Ainsi, la délétion mono-allélique de *Beclin1* a conduit, dans des cellules épithéliales, à une instabilité génétique caractérisée par des dommages à l'ADN, des duplications géniques et des aneuploïdies (56). D'autres mécanismes ont été suggéré comme la régulation de la réponse inflammatoire ou la favorisation de la sénescence induite par les oncogènes (effet anti-prolifératif) (49,54).

Cependant, en tant que mécanisme de résistance au stress, l'autophagie favorise la survie des cellules tumorales, notamment en situation de carence nutritionnelle ou d'hypoxie, des conditions retrouvées au centre de la tumeur avant que l'angiogenèse néoplasique ne s'installe (57). L'autophagie contribue également à la progression tumorale et la dissémination métastatique en permettant la transition-épithélio-mésenchymateuse et en protégeant les cellules cancéreuses de l'anoïkis (58–60). Enfin, l'autophagie est un mécanisme de résistance aux dommages induits par des traitements anti-cancéreux comme les chimiothérapies, la radiothérapie, ou les thérapies ciblées (54). Par exemple, certains inhibiteurs de tyrosine kinase comme l'imatinib (dans la leucémie myéloïde chronique) ou le Crizotinib (dans le lymphome anaplasique à grandes cellules) induisent un flux autophagique cytoprotecteur dont l'inhibition par des agents pharmacologiques (hydroxychloroquine) ou des ARN interférents potentialise la mort cellulaire induite par le traitement (61,62). A l'heure actuelle, trente-trois essais cliniques de phases précoces utilisant l'hydroxychloroquine sont en cours en cancérologie (63).

II) LA MACHINERIE MOLECULAIRE DE L'AUTOPHAGIE

L'autophagie repose sur une machinerie complexe comportant une trentaine de protéines ATGs (15). Les protéines ATGs interviennent, en collaboration avec d'autres protéines, à toutes les étapes de l'autophagie, que nous allons décrire et schématiser ci-dessous (Figure 7).

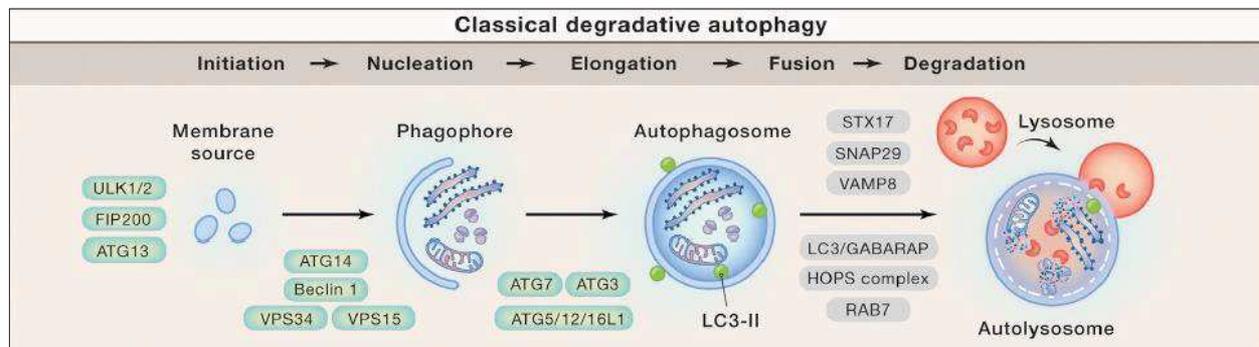


Figure 7. Les différentes étapes de l'autophagie (49). L'autophagosome apparaît *de novo* à partir d'un phagophore grâce à l'action du complexe ATG14-BECLIN1-PI3K III (VPS34 et VPS15) lui-même activé préalablement par le complexe d'initiation ULK-FIP200-ATG13. La membrane autophagosomale s'allonge et se curve sous l'effet du système de conjugaison ATG12-ATG5-ATG16. Ce même système, en collaboration avec les protéines ATG7 et ATG3, permet la lipidation de LC3 dans la membrane de l'autophagosome. L'autophagosome fusionne enfin avec le lysosome grâce à la machinerie de transport vésiculaire pour former un autolysosome dont le contenu est dégradé et recyclé dans le cytoplasme.

A) Initiation

La première étape de la formation des autophagosomes repose sur la formation d'un complexe d'initiation composé de quatre protéines (Figure 8) :

- La kinase ULK1 (Uncoordinated 51-Like Kinase), qui est l'orthologue d'Atg1 chez la levure, ou son paralogue ULK2 (fonctions similaires)
- ATG13 : qui recrute ATG9 par interaction directe
- ATG101 liant directement ATG13
- FIP200 (Focal adhesion kinase-Interacting Protein of 200 kDa) : elle sert de protéine d'ancrage pour ULK1/2 et ATG13.

Ce complexe d'initiation est régulé en amont par la kinase mTOR. En présence de nutriments, cette dernière inhibe l'autophagie en phosphorylant ULK1/2 et ATG13. Lors de la carence nutritionnelle, l'inhibition de mTOR par l'AMPK, provoque l'activation des kinase ULK1/2 suite à leur déphosphorylation et à la phosphorylation de FIP200 ce qui initie la formation des autophagosomes (30,64).

Les lipides nécessaires à l'établissement du phagophore sont importés depuis un « réservoir membranaire » (pouvant être le RE, l'appareil de Golgi ou l'endosome) sous forme de vésicules incorporant la protéine transmembranaire ATG9. Le recrutement des vésicules se fait, chez la levure, par interaction entre ATG9 et ATG13 (65,66).

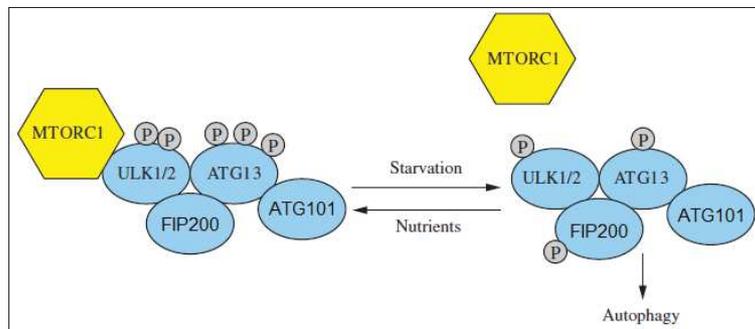


Figure 8. Le complexe d'initiation de l'autophagie (30). Le complexe se compose de ULK1/2, FIP200, ATG13, ATG101. En présence de nutriments, MTORC1 s'associe au complexe et inactive ULK1/2 et l'ATG13 par phosphorylation. En carence nutritionnelle, MTORC1 se dissocie du complexe et ATG13 et ULK1/2 sont partiellement déphosphorylés permettant l'induction de l'autophagie

B) Nucléation

Cette seconde étape dépend du complexe BECLIN1-PI3K de classe III (phosphoinositide 3 kinase de classe III) qui comprend (Figure 9) :

- ATG14 : elle recrute la PI3K III dans la voie autophagique
- BECLIN-1 (orthologue d'Atg6 chez la levure)
- La PI-3 kinase de classe III (PI3K III) formée par :
 - Une unité catalytique PIK3C3 (Vps34 chez la levure)
 - Une unité régulatrice PIK3R4/P150 (Vps15 chez la levure).

L'unité catalytique de la PI3K produit, sur l'autophagosome en formation, du phosphatidylinositol 3-phosphate (PI3P) à partir du phosphatidylinositol. Cette phosphorylation permet le recrutement ultérieur de protéines participant à la formation de l'autophagosome comme Atg18 et Atg12 chez la levure (67) ou les protéines WIPI chez les mammifères, les orthologues d'Atg18 (68,69).

Le recrutement de la PI3K dans la voie de synthèse des autophagosomes dépend de son interaction avec ATG14 (30). Son activité enzymatique est stimulée par l'interaction avec BECLIN-1, protéine indispensable à l'autophagie (20).

BECLIN 1 possède un riche interactome (30,70). Parmi ses activateurs, citons la protéine AMBRA1, elle-même activée par phosphorylation par le complexe d'initiation ULK1 (71). Parmi ses inhibiteurs, on retrouve les protéines anti-apoptotiques BCL-2 et BCL-XL qui interagissent avec BECLIN 1 via ses domaines BH3 et qui ont donc également une fonction inhibitrice de l'autophagie (72,73).

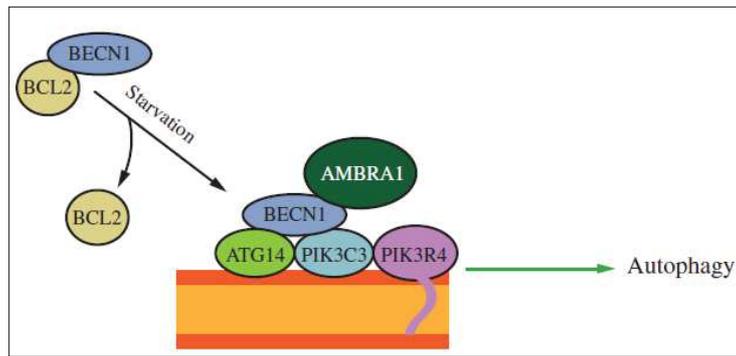


Figure 9. Le complexe ATG14-BECLIN1-PI3K de classe III (30). La PI3K comporte deux sous-unités PIK3C3 et PIK3R4 ; elle est activée par BECLIN1 elle-même régulée positivement par AMBRA1 et négativement par BCL2 qui se lie à BECLIN1 et empêche son association avec le complexe.

C) Elongation de la membrane autophagosomale

Cette étape correspond à l'expansion de la membrane autophagosomale qui séquestre progressivement une portion du cytoplasme pour former la vésicule à double membrane qu'est l'autophagosome. Cette étape est sous la dépendance de deux systèmes de conjugaisons semblables au système de conjugaison de l'ubiquitine (et donc qualifiés de « ubiquitin-like » ou « UBL ») : le système ATG12-ATG5-ATG16 et le système LC3 / GABARAP (Gamma-aminobutyric acid receptor-associated protein) (30) (Figure 10).

1) Le système ATG12-ATG5-ATG16

Les protéines UBL (Ubiquitin-like) ATG12 et ATG5, sont liées de manière covalente et irréversible par l'intermédiaire d'ATG7 et d'ATG10, qui fonctionnent respectivement comme des enzymes d'activation et de conjugaison de l'ubiquitine (E1 et E2) (18). Le produit de conjugaison ATG12-ATG5 se lie par ATG5 de manière non covalente à ATG16L1 et se dimérise, formant un complexe plus large ancré à la membrane du phagophore en expansion. Ce complexe contribue à structurer géométriquement l'autophagosome en permettant sa courbure afin qu'il adopte une forme sphérique (74). Le complexe ATG12-ATG5-ATG16 se dissocie de la membrane du phagophore une fois que la formation de l'autophagosome est achevée (75).

2) Le système LC3 / GABARAP

Le deuxième système UBL impliqué dans l'élongation du phagophore est le système LC3 / GABARAP. Il comprend deux familles de protéines qui sont les orthologues, chez les mammifères, d'Atg8 chez la levure (76) :

- La famille LC3 contenant : LC3A, LC3B et LC3C
- La famille GABARAP contenant : GABARAP, GABARAPL1 et GABARAPL2

A titre d'exemple, nous allons décrire ci-dessous le système de conjugaison de la protéine LC3.

La protéine LC3 est d'abord clivée à son extrémité C terminale par la protéase ATG4 générant la forme tronquée cytosolique LC3-I. LC3-I se lie de manière covalente aux lipides de la membrane du phagophore en expansion via l'action enzymatique d'ATG7 (réaction de type E1), d'ATG3 (réaction de type E2) et finalement du complexe ATG12-ATG5-ATG16 (réaction de type E3) (77).

La forme lipidée de LC3 se nomme LC3-II (22). Cette réaction de lipitation se produit à la fois sur la membrane interne et sur la membrane externe de l'autophagosome. Les protéines LC3-II présentes sur la membrane externe sont délipidées par ATG4 et recyclées dans le cytosol, tandis que les protéines LC3-II présentes sur la membrane interne seront dégradées après la fusion avec les lysosomes dans l'autophagolysosome (78).

Ce système possède une double fonction : il est à la fois impliqué dans la formation de l'autophagosome et sert de protéine d'ancrage au matériel intracellulaire (le cargo) à dégrader dans l'autophagosome, par l'intermédiaire d'un récepteur faisant le lien entre le cargo et la protéine d'ancrage.

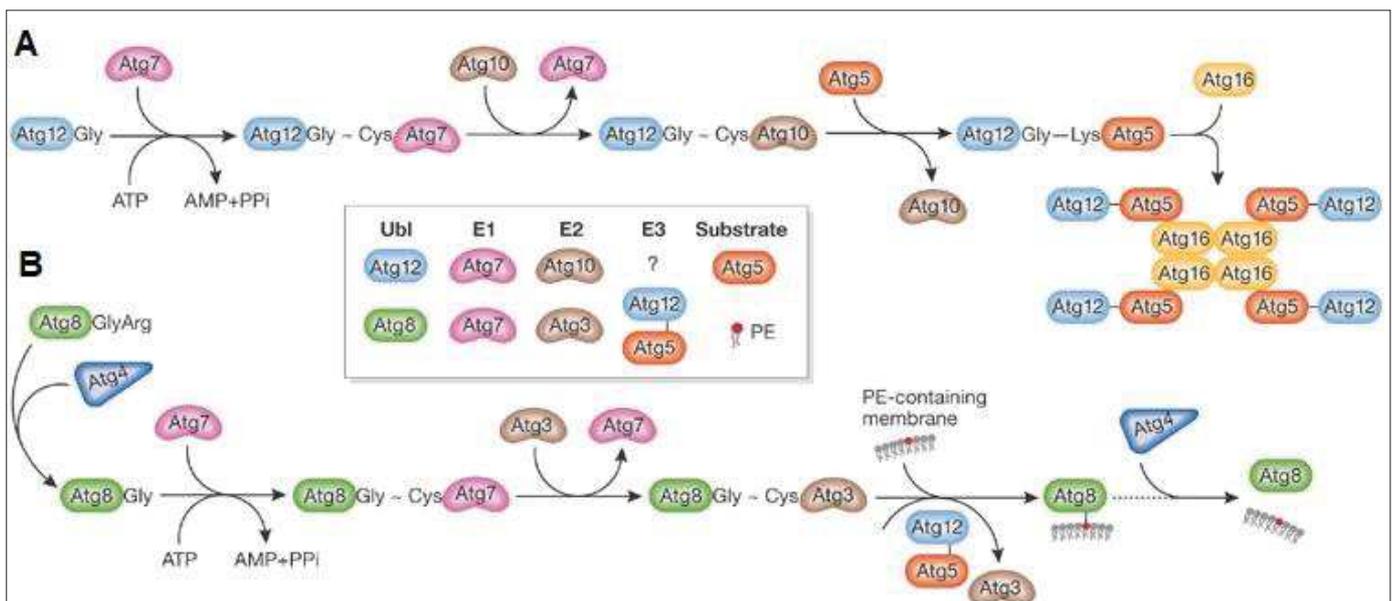


Figure 10. Les systèmes de conjugaison de l'autophagie chez la levure, conservés chez les mammifères (77). A | Système de conjugaison d'Atg12 à Atg5 et formation du complexe Atg12-Atg5-Atg16. B | Système de conjugaison de Atg8/LC3 aux phosphatidyléthanolamine (PE).

3) La séquestration spécifique du contenu cytoplasmique

Un récepteur de l'autophagie est une molécule (protéine ou lipide) définie par sa capacité à lier un organelle à dégrader à la membrane autophagosomale afin de permettre sa séquestration à l'intérieur de l'autophagosome. Certains récepteurs sont spécifiques d'une forme d'autophagie sélective (ex : NIX pour la mitophagie), d'autres sont ubiquitaires (ex : P62, NDP52). Le récepteur se lie directement ou indirectement (via l'ubiquitine) au cargo et à l'autophagosome en liant LC3 (79) (Figure 11).

La protéine LC3 contient une région hydrophobe permettant l'interaction avec un domaine LIR (LC3-interacting region) contenu dans tous les récepteurs autophagiques de nature protéique. Ce domaine est constitué d'une séquence consensus de quatre acides aminés incluant en position 1 un acide aminé aromatique et en position 4 un acide aminé hydrophobe : $[W/F/Y]_1-X_2-X_3-[L/I/V]_4$. Cette région peut être précédée par des résidus sérine ou thréonine dont la phosphorylation intervient dans la régulation de l'activité du récepteur (80).

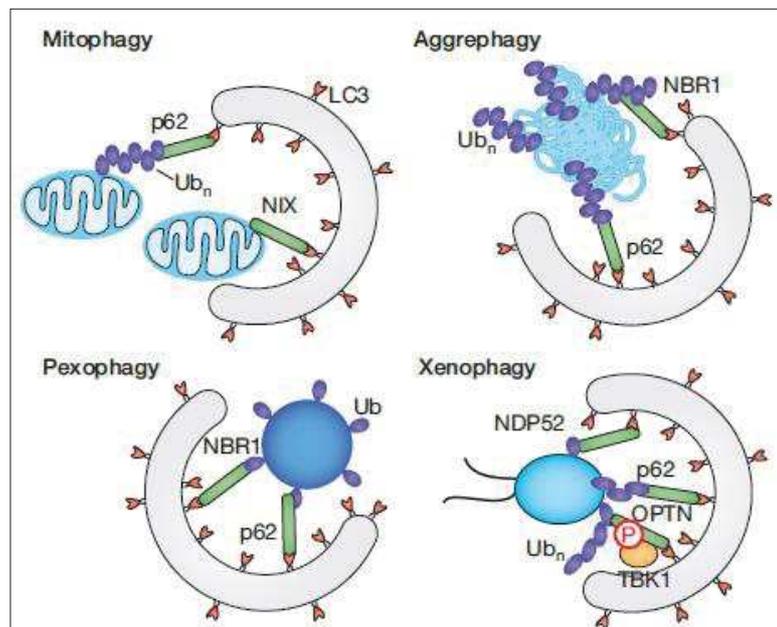


Figure 11. Le recrutement sélectif des phagophores par l'interaction des récepteurs de l'autophagie avec LC3-II dans différents types d'autophagie sélectives (79). Durant la mitophagie, P62 reconnaît les mitochondries poly-ubiquitinylées. Alternativement, les mitochondries peuvent être liées par NIX directement sans nécessiter de poly-ubiquitinylation. Durant l'agrèphagie, les agrégats protéiques poly-ubiquitinylés sont séquestrés par le phagophore via p62 et NBR1. Durant la xénophagie, les récepteurs de l'autophagie NDP52, P62 et OPTN reconnaissent les bactéries poly-ubiquitinylées. Dans ce cas, l'association du motif LIR avec la LC3-II peut être renforcée par une phosphorylation OPTN dépendante de TBK1. Enfin, pour la pexophagie, P62 et NBR1 recrutent le phagophore sur les peroxysomes mono-ubiquitinylés.

D) Fusion et dégradation

La dernière étape de l'autophagie correspond à la fusion de la membrane externe de l'autophagosome : soit directement avec les lysosomes soit avec un endosome tardif, ce qui forme un amphisome, qui fusionnera ensuite avec les lysosomes (30).

Cela aboutit à la formation d'un autophagolysosome et à la dégradation, par les hydrolases acides lysosomales, de la membrane interne et du contenu autophagosomal. Les métabolites issus de cette dégradation sont recyclés dans le cytosol grâce à des perméases lysosomales. Par exemple, l'efflux des acides aminés, chez la levure, se produit grâce à la perméase Atg22 (81).

Pour fusionner, l'autophagosome se déplace le long des microtubules grâce aux protéines motrices dynéines en direction du centre d'organisation des microtubules (COMT), zone dans laquelle s'accumulent les autophagosomes et les lysosomes (82).

Les mécanismes de fusion avec le lysosome sont encore assez mal caractérisés et aucun facteur spécifique à l'autophagie n'a été pour l'instant identifié. Parmi les protéines impliquées, on retrouve celles appartenant au système SNARE (Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment protein receptor) dont dépend le trafic membranaire des cellules eucaryotes. Par exemple la SYNTAXIN17, localisée sur la membrane externe de l'autophagosome complet, permet la fusion avec l'endosome ou le lysosome par interaction avec SNAP29 et VAMP8 (83) (Figure 12).

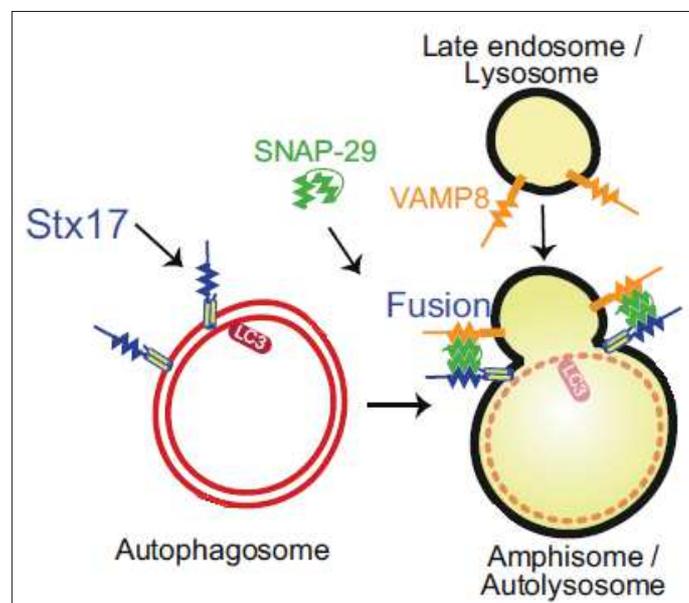


Figure 12. La fusion de l'autophagosome avec le lysosome (83). Elle dépend du système SNARE impliquant les protéines SYNTAXIN17 / SNAP-29 / VAMP8.

III) GÉNÉRALITÉS SUR LES MITOCHONDRIES

Les mitochondries sont des organites intracellulaires des cellules eucaryotes, de morphologie variable selon les types cellulaires (sphères, bâtonnets ou filaments). Elles proviendraient d'une symbiose entre des cellules eucaryotes primitives et des α -protéobactéries, ces dernières ayant progressivement transféré leur génome bactérien au génome nucléaire au cours de l'évolution (84). Tout comme les bactéries, les mitochondries se multiplient par division de mitochondries pré-existantes (85).

A) Structure

Les mitochondries possèdent un génome propre (ADNmt) d'environ 16 Kb comportant 37 gènes codant pour 13 protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale, 22 ARN de transferts et 2 ARN ribosomiques. Le reste de leurs protéines (au moins 1500) est codé par le génome nucléaire puis importé dans la mitochondrie après leur traduction (86).

Leur structure est caractérisée par une double membrane : une membrane externe (OMM) et une membrane interne (IMM) formant des crêtes (invaginations tubulaires dirigées vers la matrice) qui abritent les enzymes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Ces deux membranes délimitent un espace intermembranaire dans lequel sont stockés les protons issus de l'activité de la chaîne respiratoire. L'espace inclus dans la membrane interne se nomme matrice : elle contient plusieurs copies du génome mitochondrial, un grand nombre d'enzymes métaboliques ainsi que les ARN de transferts et ribosomiques responsables de la synthèse des protéines codées par le génome mitochondrial (87) (Figure 13).

B) Fonctions

1) Rôle métabolique

La mitochondrie est l'organite central du métabolisme cellulaire (Figure 13).

La chaîne respiratoire mitochondriale synthétise la majeure partie de l'ATP (adénosine triphosphate) cellulaire, substrat énergétique essentiel à un grand nombre de réactions métaboliques. Pour cela, le cycle de Krebs produit du NADH et du FADH₂ qui, avec le dioxygène (O₂), permettent à la chaîne respiratoire de transférer des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Le gradient de concentration protonique transmembranaire ainsi généré est ensuite utilisé par l'ATP synthase mitochondriale pour phosphoryler l'ADP en ATP. Le cycle de Krebs fonctionne à partir de l'acétyl-CoA qui provient : du pyruvate issu de la glycolyse anaérobie, de la bêta-oxydation des acides gras et du métabolisme de quelques acides aminés tels que la glutamine et les acides aminés à chaîne latérale ramifiée (leucine, isoleucine, valine) (88). Qui plus est, elles participent à la synthèse de nombreuses biomolécules : biosynthèse du cholestérol et des acides gras, des nucléotides, des acides aminés, du glucose par

néoglucogénèse. On les trouve aussi impliquées dans la production de composés chimiques non protéiques que sont les co-facteurs : l'hème par exemple (qui permet la fixation de l'O₂ par l'hémoglobine et la myoglobine).

Les mitochondries contribuent également au catabolisme en favorisant l'élimination de l'ammoniac (NH₃), issu de la dégradation des acides aminés et des nucléotides, par l'intermédiaire du cycle de l'urée (88).

Enfin, les mitochondries sont impliquées dans l'homéostasie du calcium, en coordination avec le réticulum endoplasmique, en stockant le Ca²⁺ au niveau matriciel et en ajustant la concentration intracellulaire par des mécanismes d'influx et d'efflux dépendants de transporteurs calciques spécifiques (89).

2) Mort cellulaire par apoptose

Les mitochondries sont le point de départ de la voie intrinsèque de la mort cellulaire programmée nommée apoptose. En réponse à des dommages cellulaires, les protéines pro-apoptotiques BAX et BAK sont synthétisées et forment un pore au niveau de la membrane externe mitochondriale conduisant à la fuite cytosolique du cytochrome c et de la protéine SMAC (second mitochondria-derived activator of caspases) qui entraînent à leur tour la formation de l'apoptosome et l'activation des caspases (90).

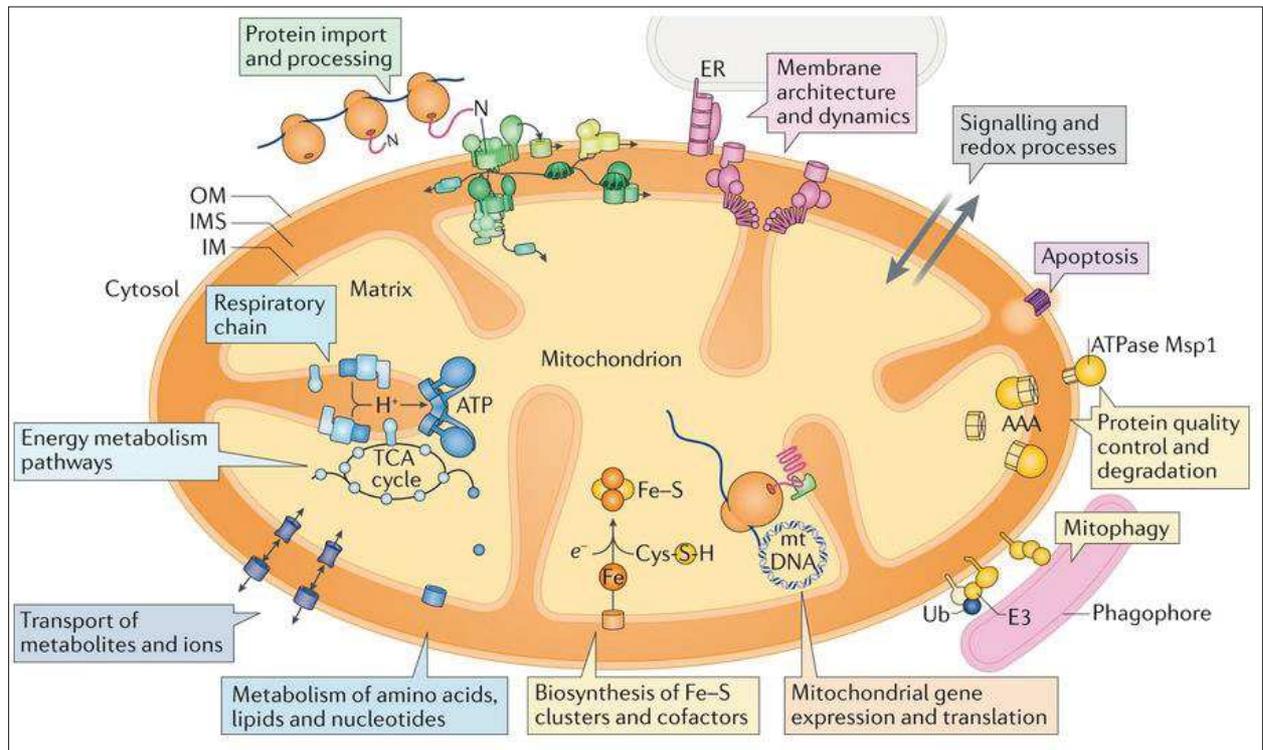


Figure 13. Structure et fonctions de la mitochondrie (91). Les mitochondries se composent de quatre compartiments : la membrane externe (OM), l'espace intermembranaire (IMS), la membrane interne (IM) et la matrice. Elles possèdent leur propre génome et exercent de nombreuses fonctions : métabolisme énergétique (respiration et synthèse de l'ATP) ; métabolisme des acides aminés, des lipides et des nucléotides ; biosynthèse des cofacteurs fer-soufre (Fe-S) ; régulation de l'apoptose. La majeure partie des protéines mitochondriales sont importées depuis le cytosol par des transporteurs membranaires (en vert). Le contrôle de la qualité des mitochondries dépend de mécanismes de dégradation tels que les protéases intra-mitochondriales (AAA) ou la mitophagie. Légende : AAA = protéases de la membrane interne ; E3 = E3 ubiquitine ligase ; ER = réticulum endoplasmique ; ADNmt = ADN mitochondrial ; TCA = acide tricarboxylique ; Ub = ubiquitine.

C) Contrôle qualité des mitochondries

La chaîne respiratoire mitochondriale génère continuellement des espèces réactives de l'oxygène (ERO) telles que l'anion superoxyde (O_2^-), l'anion hydroxyle (OH^-), ou le peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Les ERO sont neutralisées par des enzymes comme la superoxyde dismutase mais lorsqu'elles sont produites en excès elles endommagent les protéines, les lipides, l'ADN mitochondrial et nucléaire. En dehors de stress endogènes, les mitochondries sont soumises à des stress environnementaux comme les radiations ou l'exposition à des toxiques chimiques (92).

Les dysfonctionnements mitochondriaux sont à l'origine d'un stress oxydant toxique mutagène causé par les ERO, d'un défaut de synthèse d'ATP et d'une perturbation des fonctions métaboliques essentielles à la survie cellulaire. Ils contribuent au vieillissement (maladies neurogénératives, sarcopénie) (93,94) voire conduisent à l'apparition de cytopathies mitochondriales héréditaires telles que le syndrome MELAS (Mitochondrial Encephalomyopathy with Lactic Acidosis et Strokelike episodes) ou le syndrome MERRF (Myoclonus Epilepsy with Ragged-Red Fibers) (92).

Ces exemples soulignent l'importance du métabolisme mitochondrial dans l'homéostasie cellulaire ; le contrôle de la qualité des mitochondries est donc essentiel et repose sur différents mécanismes à l'échelle moléculaire et à l'échelle de l'ensemble de l'organite.

1) Contrôle qualité des protéines mitochondriales

a) Dépendant des chaperonnes

La grande majorité des protéines mitochondriales sont synthétisées dans le cytosol puis importées dans la mitochondrie par l'intermédiaire de transporteurs membranaires TOM (Translocase of Outer Membrane) et TIM (Translocase of Inner Membrane). Pour que la translocation soit possible, les protéines importées sont maintenues dans un état déplié et guidées jusqu'à la membrane externe par des protéines chaperonnes de la famille HSP (Heat Shock Protein) incluant les HSP70 et HSP90. Une fois que les protéines ont pénétré dans la matrice, des chaperonnes mitochondriales telles que HSP60 et HSP10 permettent l'obtention d'une conformation fonctionnelle (repliement) (95,96).

b) Dépendant des protéases mitochondriales

Le contrôle exercé sur le repliement des protéines par les chaperonnes n'est pas suffisant, notamment lorsque les protéines sont trop endommagées. En effet, le stress oxydant engendre des anomalies conformationnelles sévères et la formation d'agrégats protéiques toxiques qui doivent pouvoir être éliminés. Les protéines de la matrice et de la membrane interne sont accessibles à des protéases intra-mitochondriales (par exemple les protéines ClpP, AFG3L2 ou encore LON requise pour l'élimination des

peptides dénaturés ou oxydés) ; celles de la membrane externe sont dégradées par le système ubiquitine-protéasome (UPS) après avoir été poly-ubiquitinylées par des ubiquitine-ligases cytosoliques (95,96).

2) Contrôle qualité de l'ensemble de la mitochondrie

a) La complémentation fonctionnelle entre mitochondries

Les mutations du génome mitochondrial surviennent de manière stochastique : il peut donc co-exister à l'intérieur d'une même cellule une hétérogénéité mitochondriale appelée hétéroplasmie, qui consiste en la présence simultanée de mitochondries « sauvages » fonctionnelles avec des mitochondries mutées dont le métabolisme est altéré (92). Le mécanisme de fusion mitochondriale permet aux mitochondries d'une même cellule d'échanger leurs membranes et leur contenu génétique. Les mitochondries mutées peuvent ainsi récupérer un génome sauvage à partir des mitochondries saines et redevenir fonctionnelles. La complémentation fonctionnelle contribue donc au maintien d'une population saine et génétiquement homogène de mitochondries dans chaque cellule (97,98).

L'importance physiologique de ce phénomène a été révélée *in vivo* par l'invalidation de MFN2 (protéine requise pour la fusion mitochondriale) qui entraîne chez la souris l'apparition d'un phénotype neurodégénératif au niveau cérébelleux. *In vitro*, on observe des mitochondries sans nucléoïdes (c'est-à-dire sans génome mitochondrial) et des anomalies de la chaîne respiratoire mitochondriale (99).

b) L'élimination des mitochondries par mitophagie

Lorsque les dommages mitochondriaux sont très importants et que leur neutralisation par complémentation ne suffit pas, voire risquerait d'endommager les mitochondries saines, une autre stratégie de contrôle qualité se met en place : celle de leur élimination dans le lysosome par mitophagie (92). Ce mécanisme est développé plus loin dans le chapitre « Mitophagie » (voir page 36).

D) La dynamique mitochondriale chez les mammifères

Les mitochondries sont des organites dynamiques dont le nombre et la forme dépendent d'un équilibre entre deux phénomènes antagonistes : la fusion et la fission mitochondriale. La morphologie des mitochondries varie ainsi entre un aspect petit et sphérique correspondant à des unités fragmentées isolées et un aspect réticulaire étendu correspondant à des unités fusionnées et interconnectées (85) (Figure 14).

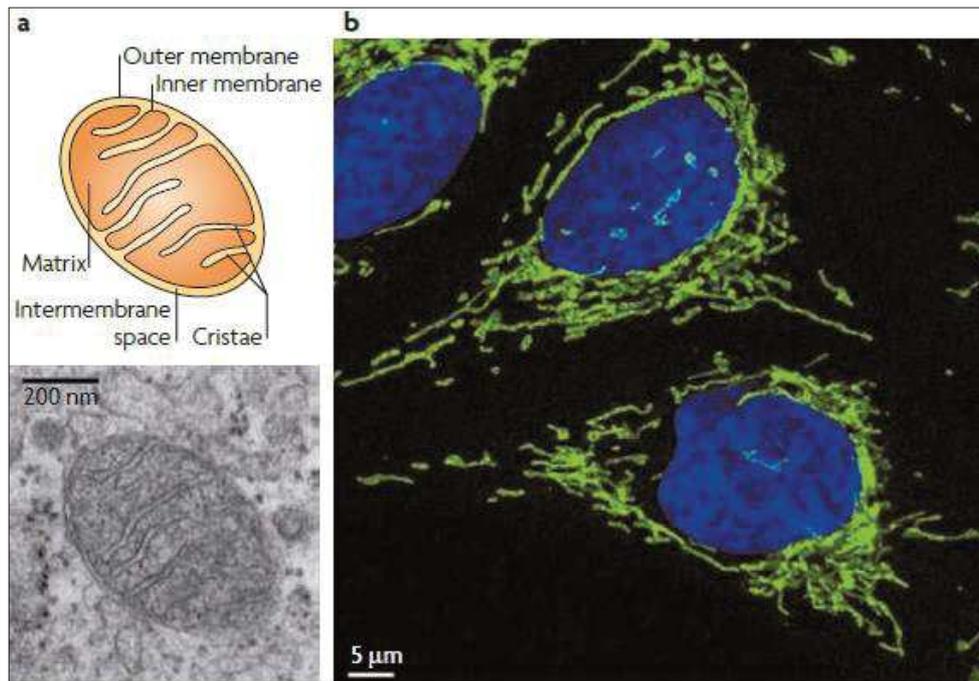


Figure 14. Morphologie mitochondriale (85). **a** | Les mitochondries sont entourées par une double membrane avec des plis caractéristiques de la membrane interne, appelés crêtes. En haut : schéma montrant la structure des mitochondries. En bas : une image de microscopie électronique d'une mitochondrie isolée de fibroblastes humains. **b** | Dans de nombreux types de cellules, les mitochondries apparaissent comme des structures longues, tubulaires et parfois ramifiées et étendues dans tout le cytoplasme. Les mitochondries (en vert) de cellules d'ostéosarcome humain (U2OS) ont été marquées par immunofluorescence à l'aide d'anticorps contre une protéine de la membrane externe (TOM20). Les noyaux (bleus) ont été marqués avec du DAPI. Les cellules ont été analysées par microscopie confocale.

1) Les mécanismes de la dynamique mitochondriale

La dynamique mitochondriale dépend des GTPases (enzymes hydrolysant le GTP) de la famille des dynamines dont l'action combinée permet soit de fusionner, soit de diviser les deux membranes lipidiques qui entourent la mitochondrie (92).

a) La fusion mitochondriale

La fusion mitochondriale consiste en l'union de deux mitochondries pour générer une mitochondrie unique (Figure 15).

La fusion de la membrane externe est assurée par deux GTPases homologues transmembranaires nommées mitofusines (MFN1 et MFN2). Elles s'accumulent au niveau des zones de contact entre mitochondries adjacentes et interagissent entre elles de manière homo ou hétérotypique par des domaines HR (heptad repeat) en formant une superhélice ce qui permet d'ancrer les mitochondries. L'hydrolyse du GTP induit des changements conformationnels des mitofusines rapprochant les deux membranes externes et *in fine* conduisant à leur fusion (100).

La fusion de la membrane interne se déroule après celle de la membrane externe. Elle dépend de la GTPase transmembranaire OPA1 et de lipides membranaires spécifiques que sont les cardiolipines. Les protéines OPA1 d'une membrane interagissent avec les cardiolipines de la membrane opposée ; les membranes se rapprochent et fusionnent de manière dépendante du GTP (100).

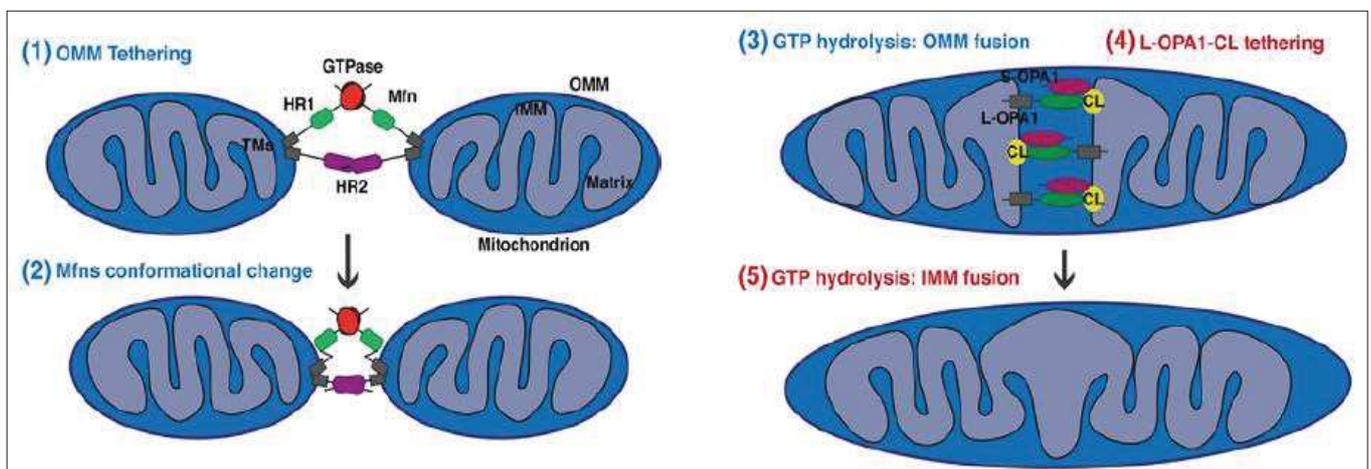


Figure 15. Les étapes successives de la fusion mitochondriale (100). (1) La membrane externe de deux mitochondries opposées est attachée par l'interaction des mitofusines. (2) La liaison au GTP et son hydrolyse induit un changement de conformation des MFN conduisant au rapprochement des membranes. (3) Fusion des membranes externes. (4) Après la fusion externe, OPA1 et les cardiolipines interagissent pour fusionner la membrane interne. (5) GTP hydrolysis: IMM fusion

b) La fission mitochondriale

La fission mitochondriale se caractérise par la division d'une mitochondrie en deux mitochondries filles (Figure 16).

Elle est réalisée par la dynamine cytosolique DRP1 (dynamin-related protein 1) recrutée à la surface de la mitochondrie par liaison à des récepteurs membranaires que sont les protéines MID49, MID51, MFF et FIS1. DRP1 se multimérise et forme un anneau autour de la mitochondrie qui se resserre progressivement et forme d'une zone tubulaire d'étranglement. Cette zone sera finalement scindée par la DYNAMIN 2 (DYN2) (100,101).

L'activité de DRP1 est contrôlée par de multiples événements post-traductionnels (phosphorylation, ubiquitinylation, sumoylation, glycosylation). Par exemple, DRP1 est phosphorylé par la CDK1 (cyclin-dépendant kinase 1) sur la sérine 616 durant la mitose induisant son oligomérisation et la fission du réseau mitochondrial. Inversement, la PKA (proteine kinase A) phosphoryle DRP1 sur la sérine 637 durant la carence nutritionnelle ce qui a un effet inhibiteur sur la fission mitochondriale (100).

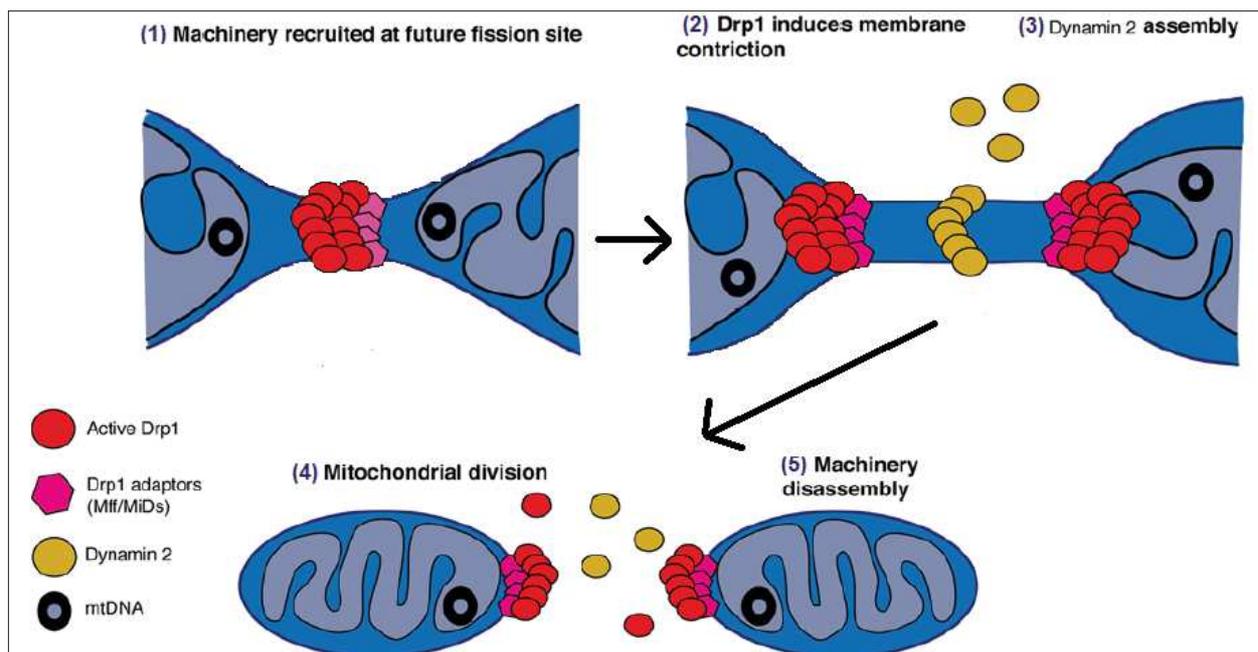


Figure 16. Les étapes successives de la fission mitochondriale (100). (1) DRP1 active est recrutée par ses récepteurs (MIDs, MFF) et s'oligomérisé à la surface de la membrane externe en formant un anneau. (2) L'hydrolyse du GTP entraîne un changement de conformation, renforçant la constriction mitochondriale et formant une zone d'étranglement tubulaire. (3) Puis la DYNAMIN 2 est recruté dans la zone d'étranglement mitochondriale où elle s'assemble et scinde les membranes conduisant à deux mitochondries filles (4). (5) Dissociation de la machinerie de fission.

2) Fonctions de la dynamique mitochondriale

a) La fusion mitochondriale régule le métabolisme cellulaire

La morphologie mitochondriale est conditionnée par les besoins métaboliques de la cellule. Les mitochondries ont tendance à fusionner quand la phosphorylation oxydative est stimulée : soit parce que les besoins en ATP augmentent (stress), soit parce que la glycolyse est inhibée (carence nutritionnelle) et que la production énergétique repose exclusivement sur la respiration mitochondriale.

Des états d'hyperfusion mitochondriale ont été observés dans des cellules exposés à un stress physique (UV) ou chimique (actinomycine D, cycloheximide) conduisant à une augmentation secondaire de la synthèse d'ATP (102). Le même état d'hyperfusion est retrouvé lors du passage de la phase G1 à la phase S (cellules NRK) du cycle cellulaire lorsque les besoins énergétiques augmentent en lien avec la réplication de l'ADN (103).

En plus d'augmenter la production d'ATP, la fusion des mitochondries a pour avantage d'empêcher leur élimination par mitophagie, notamment durant la carence nutritionnelle (104,105). Alors que l'autophagie est globalement activée en situation carencielle, les mitochondries sont préservées du catabolisme en formant un réseau tubulaire soutenant la production énergétique indispensable à la survie cellulaire.

Au total la fusion mitochondriale est un processus d'adaptation métabolique qui potentialise la production énergétique de la mitochondrie en situation de stress. Les mécanismes biologiques expliquant cette potentialisation sont encore hypothétiques (Figure 17). VP. Skulachev a proposé que les réseaux de mitochondries tubulaires se comportent comme des filaments le long desquels se propage le gradient protonique (comme le long de « câbles électriques ») permettant une homogénéisation de la synthèse d'ATP dans l'ensemble du réseau, et non plus seulement une synthèse limitée aux mitochondries en contact avec l'O₂ (c'est-à-dire celles situées sous la membrane plasmique) (106). Nous émettons également l'hypothèse qu'une fusion massive des mitochondries contribue à maintenir leur intégrité fonctionnelle par complémentation, ce qui se traduirait au niveau cellulaire par une synthèse accrue d'ATP.

b) La fission mitochondriale permet la répartition cellulaire des mitochondries

1- Répartition des mitochondries dans les cellules mitotiques

La fission mitochondriale est une étape primordiale de la division cellulaire car elle permet une répartition aléatoire et équitable des mitochondries entre la cellule mère et les cellules filles (92). Par exemple, les cellules cancéreuses humaines HeLa possèdent un réseau mitochondrial tubulaire durant l'interphase, mais voient leurs mitochondries fissionnées sous l'action de la protéine DRP1 phosphorylée durant la phase M du cycle cellulaire (107).

2- Répartition des mitochondries dans les cellules non mitotiques

Dans le cas de cellules post-mitotiques comme les neurones, la fission mitochondriale réduit la taille des mitochondries et autorise leur transport par les microtubules en zone synaptique, métaboliquement très active. Les protéines DRP1 et OPA1 régulent la distribution des mitochondries au niveau dendritique : leur dysfonctionnement limite le développement des dendrites et des connexions synaptiques (108).

c) La fission mitochondriale est un pré-requis à l'apoptose

La structure mitochondriale est importante dans la régulation de l'apoptose. Au cours de l'apoptose, le réseau mitochondrial se fissionne sous l'action de DRP1 et cette étape est indispensable à l'activation de l'apoptose chez *C. Elegans*. Du point de vue mécanistique, le recrutement focal de DRP1 à la surface mitochondriale s'accompagne de la translocation sur le même site des facteurs pro-apoptotiques BAX et BAK dont le rôle est de perforer la membrane externe mitochondriale induisant la libération du cytochrome c et l'activation de l'apoptose (90).

d) La fission mitochondriale est un pré-requis à la mitophagie

Les autophagosomes sont des structures sphéroïdes dont le diamètre maximal est d'environ 1 μm ce qui pose un problème d'encombrement stérique pour la séquestration de mitochondries dont la morphologie peut être très allongée et dépasser cette taille ($> 5 \mu\text{m}$) (102,109).

Plusieurs équipes ont démontré que les mitochondries, dont la production d'ATP est altérée ou dont le potentiel de membrane est diminué (dépolariation), subissent des épisodes de fissions. Ces événements ont pour intérêt de réduire leur taille et sont indispensables à leur élimination par mitophagie (105,110) (Figure 17). Qui plus est, les mitochondries endommagées et fissionnées ne peuvent plus re-fusionner avec le réseau mitochondrial car leurs protéines de fusion sont éliminées protéolytiquement. Ainsi, la protéine de la membrane interne OPA1 est dégradée par la protéase mitochondriale OMA1 (111,112) et les mitofusines situées sur la membrane externe sont dégradées par le protéasome après une ubiquitinylation dépendante de l'ubiquitine ligase PARKIN et de l'ATPase P97 (113).

En conclusion, la fission mitochondriale est un processus de fractionnement du réseau mitochondrial qui lui confère une flexibilité structurelle d'adaptation aux besoins de la cellule. En association avec la biogenèse mitochondriale (non développée ici), elle contribue au maintien d'une population de mitochondries saines en initiant leur élimination par mitophagie.

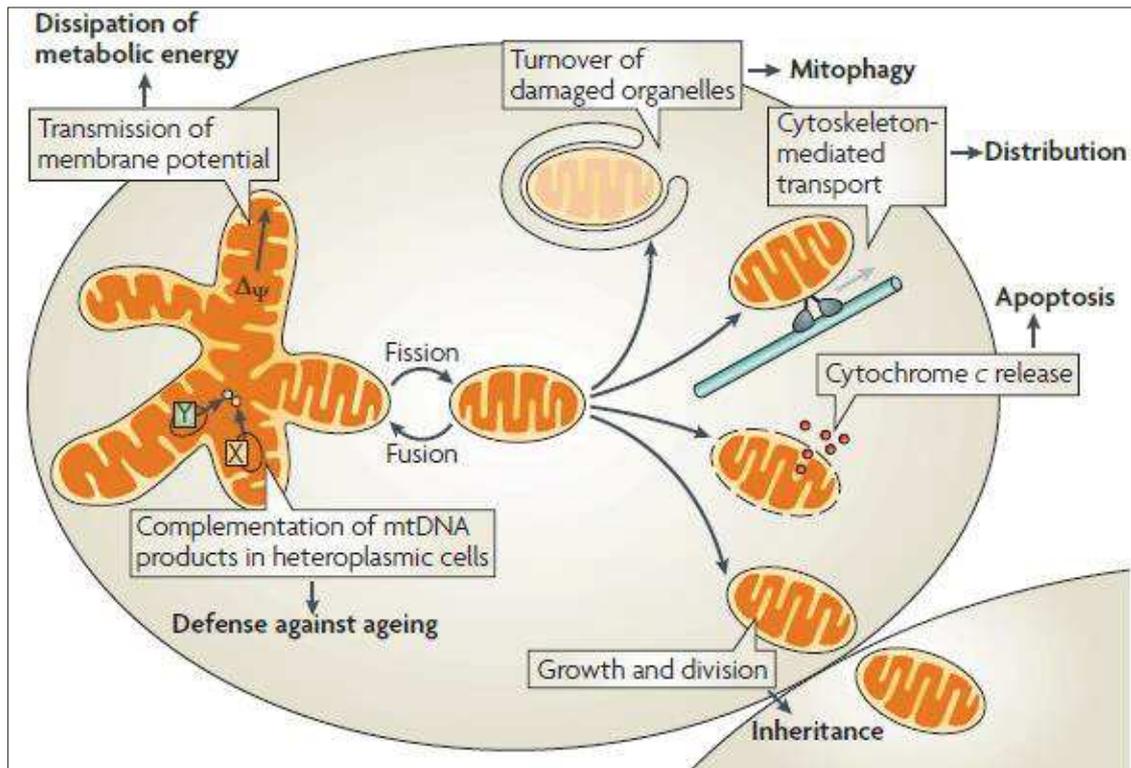


Figure 17. Les fonctions biologiques de la dynamique mitochondriale (85). La fusion et la fission des mitochondries sont importantes pour de nombreuses fonctions biologiques. La fission est nécessaire pour la transmission des mitochondries au cours de la mitose, pour la libération de facteurs pro-apoptotiques de l'espace intermembranaire, pour la distribution intracellulaire *via* le transport par le cytosquelette et pour l'élimination des mitochondries endommagées par mitophagie. Les réseaux mitochondriaux fusionnés sont importants pour la production d'ATP, pour la transmission du potentiel membranaire le long des filaments mitochondriaux, pour la complémentation fonctionnelle des gènes mitochondriaux dans les cellules hétéroplasmiques (X et Y représentent les allèles de différents gènes mitochondriaux).

IV) LA MITOPHAGIE

A) Généralités

La mitophagie est définie comme l'élimination spécifique des mitochondries par autophagie. Elle se déroule constamment en condition basale (mitophagie basale) mais peut également être activée par des stress de différentes natures (mitophagie induite).

Ainsi, la mitophagie est activée lors de la différenciation cellulaire ou de stress environnementaux tels que l'hypoxie, le stress thermique, ou encore au niveau musculaire après un exercice physique intense (114,115). Expérimentalement, l'exposition à des toxiques chimiques tels que les protonophores (CCCP, FCCP) ou les inhibiteurs de la chaîne respiratoire (roténone, oligomycine, antimycine) permettent l'induction de la mitophagie.

La mitophagie s'appuie sur la machinerie autophagique classique telle qu'elle a été décrite dans la première partie de ce mémoire : les protéines ULK1, ATG (ATG14, ATG16, ATG9), WIPI ou encore LC3 et GABARAP ont notamment été décrites comme indispensables à son déroulement (116–119). Cependant, une machinerie qui lui est propre permet de garantir la sélectivité du processus : il s'agit des récepteurs de la mitophagie. On distingue deux types de récepteurs : des récepteurs cytosoliques (ou adaptateurs) devant être recrutés au niveau mitochondrial, et des récepteurs mitochondriaux situés dans les membranes de la mitochondrie (114). Ces récepteurs permettent la séquestration des mitochondries à l'intérieur de l'autophagosome par interaction avec LC3 grâce à un domaine LIR (114). En parallèle, certains d'entre eux stimulent la formation de l'autophagosome en recrutant ULK1 (ex : les récepteurs FUNDC1, NDP52, OPTN ou BCL2L13) (120–123) ou BECLIN1 (ex : AMBRA1) (124,125).

B) Fonctions de la mitophagie

La fonction principale de la mitophagie est la dégradation des mitochondries endommagées lorsque les autres mécanismes de contrôle qualité (chaperonnes, systèmes protéolytiques, complémentation fonctionnelle) ne suffisent pas à restaurer l'intégrité mitochondriale.

L'autre fonction de la mitophagie est l'élimination des mitochondries superflues, alors même que ces mitochondries sont potentiellement saines. Ainsi, la mitophagie permet l'élimination des mitochondries paternelles après la fécondation (126). Elle est également impliquée dans la différenciation cellulaire : durant l'érythropoïèse où la dégradation des mitochondries permet la différenciation des réticulocytes en érythrocytes (127) ou au cours de la transformation du tissu adipeux beige (thermogénique) en tissu adipeux blanc, ce qui favorise le stockage lipidique, l'obésité et l'insulinorésistance (128).

Enfin, en situation d'hypoxie, qui peut avoir lieu *in vivo* au centre d'une tumeur ou dans un tissu ischémique, l'expression du facteur HIF-1 (hypoxia-inductible factor 1) promeut la conversion d'un métabolisme oxydatif vers un métabolisme glycolytique en stimulant l'élimination des mitochondries par mitophagie (129).

C) La mitophagie canonique : dépendante de l'ubiquitylation des protéines mitochondriales

La signalisation des mitochondries endommagées dépend de l'ubiquitylation des protéines mitochondriales de surface par plusieurs E3-ubiquitine ligases telles que MUL1, ARIH1, SIAH1, SMURF1, GP78. Cependant celle dont le fonctionnement est le mieux caractérisé est la protéine PARKIN, raison pour laquelle nous nous focaliserons sur celle-ci dans les chapitres qui suivent (114).

1) La voie de signalisation PINK1-PARKIN

PINK1 (PTEN-induced putative kinase 1) et PARKIN sont deux protéines historiquement identifiées comme responsables de certaines formes héréditaires (autosomiques récessives) de maladie de Parkinson (130,131).

PARKIN possède à son extrémité N-terminale un domaine UBL (UBiquitin-Like) phosphorylable sur la sérine 65 et qui régule son activité. A son extrémité C-terminale, on trouve quatre domaines en doigt de zinc, dont le dernier nommé RING2 supporte l'activité E3 ubiquitine ligase de PARKIN permettant la liaison covalente d'un motif ubiquitine sur la protéine cible (80,132) (Figure 18).

PINK1 est une kinase activée par auto-phosphorylation jouant le rôle de senseur de la polarisation mitochondriale. Elle est localisée en permanence dans les mitochondries grâce à une séquence d'adressage mitochondrial (domaine MTS) située à son extrémité N-terminale (80,132) (Figure 18).

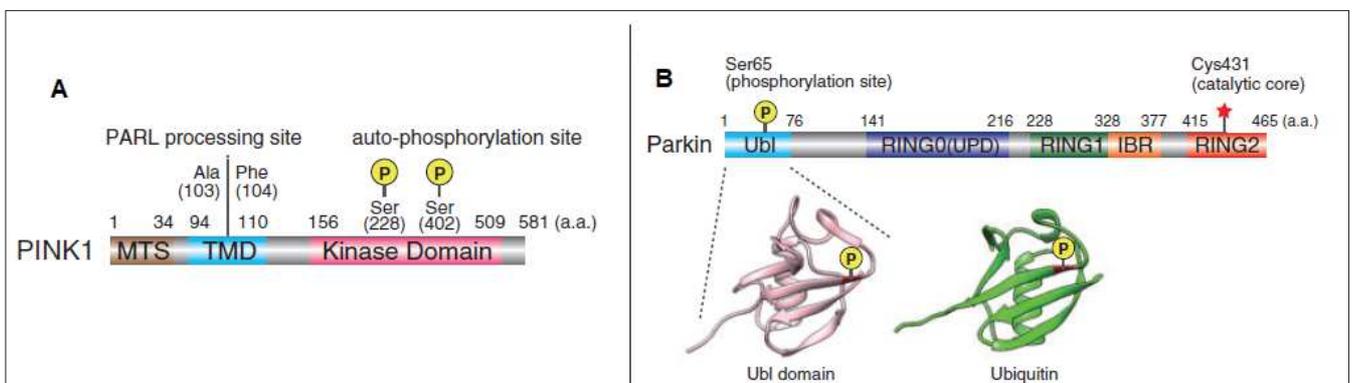


Figure 18. Structure des protéines PINK1 et PARKIN (132). A | Représentation schématique de PINK1. B | Représentation schématique de PARKIN.

Dans les mitochondries saines (polarisées par un gradient protonique), PINK1 pénètre partiellement dans la matrice par les transporteurs de la membrane externe TOM (translocase of the outer membrane) et de la membrane interne TIM (translocase of the inner membrane) puis la protéase matricielle MPP (Mitochondrial Processing Peptidase) clive le domaine MTS. PINK1 se retrouve donc enchâssée dans la membrane interne où elle est clivée par la protéase de la membrane interne PARL (Presenilin-Associated Rhomboid-Like Protein) ce qui libère PINK1 dans le cytosol et la rend accessible à une dégradation par le protéasome. Ainsi, en situation physiologique PINK1 est rapidement éliminée après sa synthèse et son niveau d'expression reste faible (80,132) (Figure 19).

En revanche, lorsque les mitochondries sont dépolarisées (dysfonctionnement de la chaîne respiratoire), PINK1 reste enchâssée dans la membrane externe où elle échappe au clivage par MPP et PARL. Elle s'accumule donc à la surface de la mitochondrie, se dimérise et s'auto-active par phosphorylation. Cette forme active de PINK1 phosphoryle à la fois l'ubiquitine (présente au niveau basal à la surface de la mitochondrie) sur la sérine 65 (S65-phospho-ubiquitine) et PARKIN sur la sérine 65 de son domaine UBL (phospho-PARKIN). La S65-phospho-ubiquitine interagit avec phospho-PARKIN ce qui induit l'activation de son site catalytique par changement conformationnel. PARKIN va alors poly-ubiquitinyler les protéines de la membrane externe puis ces dernières seront phosphorylées par PINK1, générant un motif S65-phospho-ubiquitine caractéristique de cette voie de signalisation (80,132) (Figure 19).

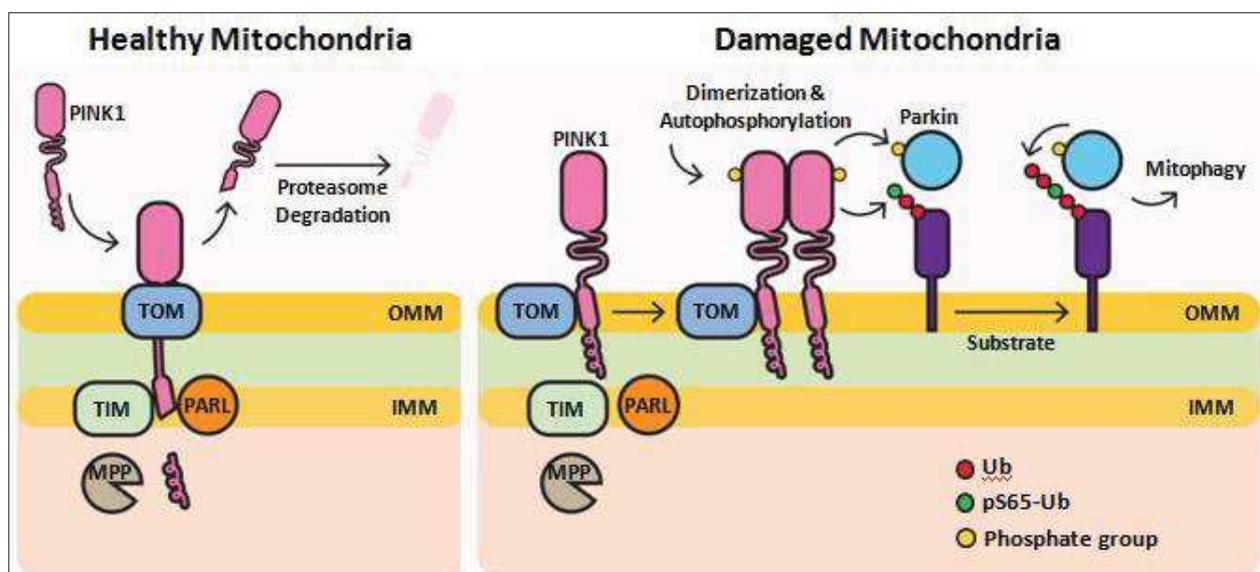


Figure 19. Fonction et régulation des protéines PINK1 et PARKIN (133). Dans les mitochondries saines, PINK1 est clivée par les protéases mitochondriales, MPP et PARL, entraînant sa dégradation par le protéasome. Dans les mitochondries endommagées, PINK1 s'accumule au niveau de la membrane externe (OMM) liée au complexe TOM où elle est activée par dimérisation et autophosphorylation. PINK1 activée phosphoryle l'ubiquitine, entraînant l'activation de PARKIN et son recrutement mitochondrial où elle ubiquitine davantage les substrats mitochondriaux générant un signal S65-phospho-ubiquitine recrutant les récepteurs mitophagiques cytosoliques.

2) Conséquences de l'ubiquitylation des protéines de la membrane externe

a) Recrutement des récepteurs cytosoliques (adaptateurs) de la mitophagie

En règle générale, les récepteurs cytosoliques se lient de manière indirecte à la surface de la mitochondrie par l'intermédiaire de l'ubiquitine grâce à des domaines UBD (Ubiquitin Binding Domain) (80). Ce recrutement est favorisé par les protéines NIPSNAP1 et NIPSNAP2, localisées dans la matrice mitochondriale en conditions basales et qui transloquent dans la membrane externe après une dépolarisation de la mitochondrie (134) (Figure 20).

Les récepteurs documentés de ce type se nomment :

- P62 / SQSTM1 (Sequestosome-1)
- NBR1 (Neighbor of BRCA1 gene 1)
- OPTN (Optineurine)
- NDP52 (Nuclear Domain 10 Protein 52)
- TAX1BP1 (Tax1 binding protein 1)

Soulignons le fonctionnement particulier de AMBRA1. Cette protéine cytosolique active le complexe BECLIN1-PI3K. Elle est recrutée au niveau des mitochondries dépolarisées, non pas en liant l'ubiquitine mais en interagissant avec PARKIN. Elle induit la production par la PI3K du PI3P, dont dépend la formation du phagophore, autour des mitochondries dépolarisées, puis se comporte comme un récepteur de la mitophagie en liant LC3 *via* son domaine LIR (124,125).

b) OMMAD et mise en jeu des récepteurs mitochondriaux de la membrane interne

L'OMMAD (Outer Mitochondrial Membrane-Associated Degradation) correspond à la dégradation des protéines de la membrane externe par le protéasome suite à leur poly-ubiquitylation. Cette élimination sélective joue un rôle important durant l'induction de la mitophagie en permettant la protéolyse des mitofusines (MFN1 et MFN2) ubiquitylées par PARKIN ce qui interdit toute fusion avec des mitochondries saines (114). L'OMMAD contribue par la suite à la rupture de la membrane externe et facilite l'interaction de LC3 avec des récepteurs mitochondriaux de la membrane interne tels que la prohibitine 2 (PHB2) (135) ou, hypothétiquement, les cardiolipines.

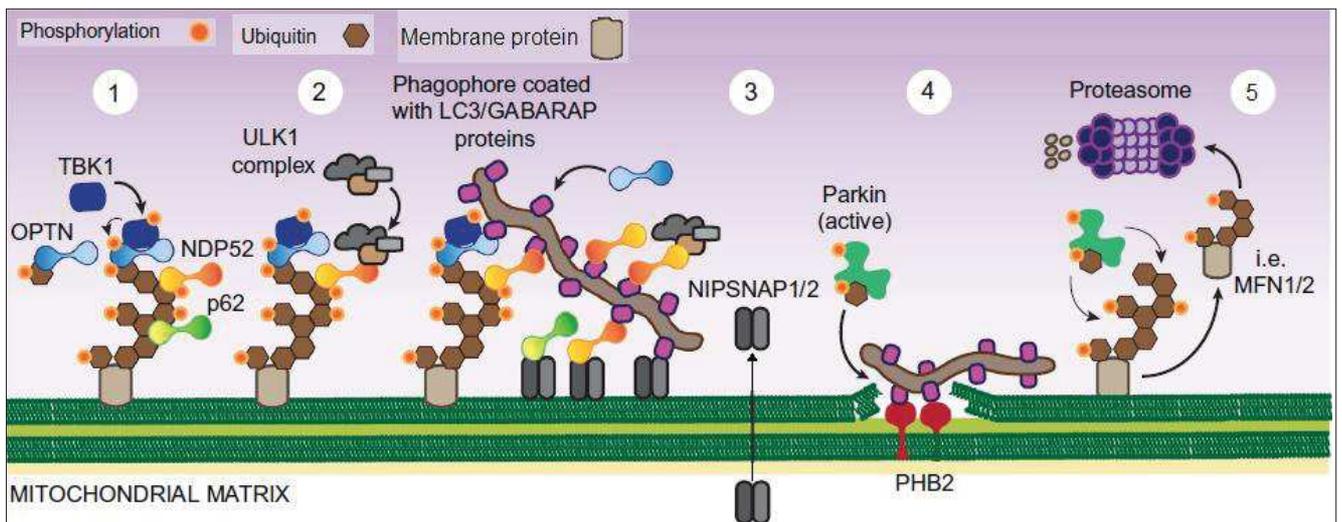


Figure 20. La mitophagie dépendante de l'ubiquitinylation des protéines mitochondriales (114). (1) La poly-ubiquitinylation de la membrane externe conduit au recrutement de récepteurs cytosoliques tels que NDP52, OPTN ou P62. TBK1 (TANK-binding protein 1) phosphoryle OPTN ce qui renforce sa liaison avec l'ubiquitine. (2) Le complexe ULK1 est recruté par les récepteurs de l'autophagie. Puis les récepteurs interagissent avec les protéines LC3/GABARAP qui tapissent le phagophore. (3) Lors de la dépolarisation des mitochondries, les NIPSNAP1/2 transloquent de la matrice vers la membrane externe et favorisent le recrutement des récepteurs cytosoliques. (4) et (5) Grâce à l'activité de PARKIN et d'autres E3-ubiquitine ligases, la membrane externe est dégradée par le protéasome (OMMAD) ce qui entraîne l'exposition du récepteur PHB2 de la membrane interne qui interagit avec LC3/GABARAP (4) et la dégradation des protéines permettant la fusion mitochondriale telles que les mitofusines (MFN1/2).

D) La mitophagie non canonique indépendante de l'ubiquitinylation des protéines mitochondriales

Elle met en jeu des récepteurs mitochondriaux, qui sont soit des protéines transmembranaires de la membrane externe, soit des lipides membranaires tels que les céramides ou les cardiolipines (80).

Les récepteurs protéiques documentés de ce type se nomment :

- BNIP3 (BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3)
- BNIP3L (BCL2/adenovirus E1B 19kDa interacting protein 3-like) / NIX
- FUNDC1 (FUN14 domain containing 1)
- BCL2L13 (BCL2 Like 13)

1) La régulation des récepteurs mitochondriaux protéiques

Leur régulation est bien moins codifiée que celle des récepteurs cytosoliques : elle reposerait sur des modifications transcriptionnelles et post-traductionnelles (Figure 21).

Plusieurs études ont montré que la transcription des gènes codant pour BNIP3, BNIP3L est augmentée durant l'hypoxie sous l'effet du facteur de transcription HIF1 (136,137).

En outre, l'affinité des domaines LIRs de ces récepteurs pour LC3 est modulée par des phosphorylations à proximité du domaine LIR. En conditions basales, FUNDC1 est phosphorylé sur la sérine 13 empêchant son interaction avec LC3 ce qui a un effet inhibiteur sur la mitophagie (138). Au contraire, en situation d'hypoxie ou lorsque les mitochondries sont dépolarisées, BNIP3 et FUNDC1 sont phosphorylés sur la sérine 17 en amont de leur domaine LIR rendant possible l'interaction avec LC3 (122,139).

2) La régulation des récepteurs mitochondriaux de type cardiolipine

Les cardiolipines sont des phospholipides chargés négativement, situés au niveau de la membrane interne de la mitochondrie en conditions basales. En réponse à un stress inducteur de la mitophagie, les cardiolipines sont externalisées enzymatiquement à la surface de la mitochondrie où elles peuvent lier directement LC3 par des interactions électrostatiques avec des résidus chargés positivement (140) (Figure 21).

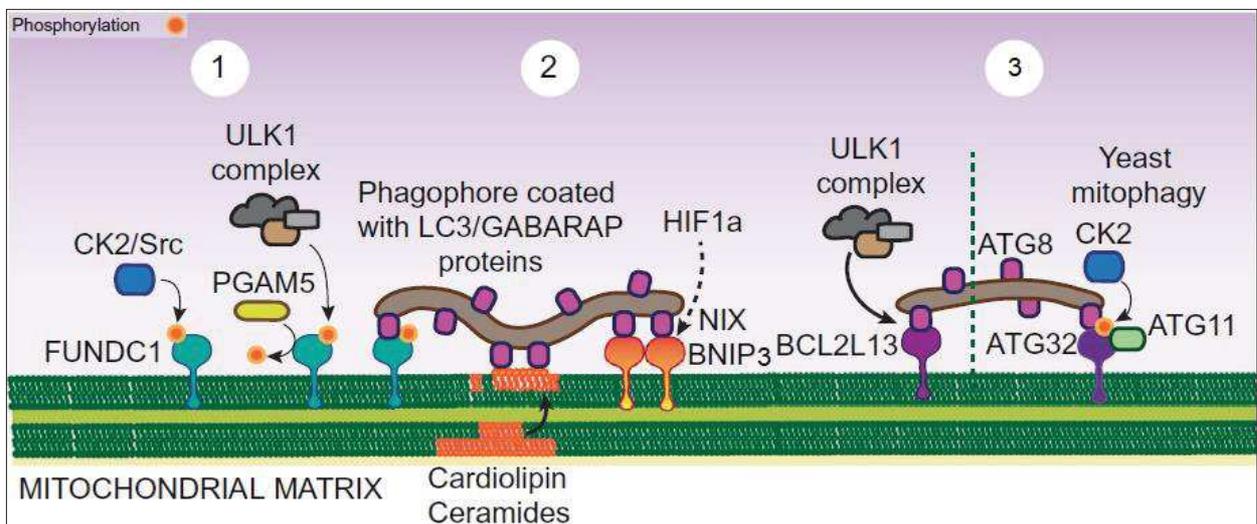


Figure 21. La mitophagie indépendante de l'ubiquitinylation des protéines mitochondriales (114). (1) FUNDC1 est inhibé par la phosphorylation dépendante des kinases CK2 et Src sur son motif LIR. Une fois la mitophagie est activée, la phosphatase PGAM5 déphosphoryle FUNDC1 pour faciliter son interaction avec LC3. ULK1 phosphoryle également FUNDC1 pour renforcer l'interaction avec le phagophore. (2) Les cardiolipines et les céramides transloquent vers la membrane externe pour interagir avec LC3. NIX et BNIP3 sont régulés par HIF1α et s'accumulent dans la membrane externe pour servir de récepteurs de la mitophagie. (3) BCL2L13 interagit avec ULK1 et LC3 pour permettre la mitophagie. Chez la levure, le récepteur de la mitophagie ATG32 est phosphorylée par CK2 pour promouvoir l'interaction avec ATG11, ce qui conduit à l'association avec ATG8 et au recrutement des mitochondries vers le site d'assemblage des phagosomes (PAS).

E) Implications physiopathologiques de la mitophagie

Diverses maladies humaines, dont le cancer, les maladies cardio-vasculaires et certaines maladies neurodégénératives, sont associées à des dysfonctionnements mitochondriaux en lien avec des anomalies de la mitophagie (141).

1) Mitophagie et cancer

Des dysfonctionnements de la mitophagie ont été causalement associés à l'initiation et à la progression de tumeurs cancéreuses : l'accumulation de mitochondries altérées générant un stress oxydant oncogénique conduisant à l'instabilité génomique (141).

Au moins deux gènes impliqués dans le déroulement de la mitophagie ont une activité suppressive de tumeur : c'est le cas des gènes codant pour PARKIN et BNIP3.

Premièrement, l'inactivation de PARKIN augmente la prolifération des hépatocytes et leur confère une résistance à l'apoptose ce qui entraîne l'apparition spontanée de carcinomes hépatiques (142). PARKIN est également réprimé dans plusieurs lignées de neuroblastomes humains en lien avec la fixation du facteur de transcription oncogénique N-MYC, qui se lie au promoteur du gène *PARK2* et inhibe son expression (143). Deuxièmement, l'inactivation épigénétique du récepteur BNIP3 a été identifiée comme un mécanisme de résistance à la mort cellulaire induite par l'hypoxie dans les hémopathies malignes et le cancer du pancréas (144,145). Dans un modèle murin de tumorigenèse mammaire spontanée (MMTV-PyMT), l'inactivation de BNIP3 est associée à une plus grande prolifération tumorale et des métastases pulmonaires plus précoces. Les ERO mitochondriales sont augmentées, ce qui active la transcription du gène HIF1 et de ses gènes cibles incluant ceux de la glycolyse (effet Warburg) et de l'angiogenèse (146). Chez l'Homme, la perte d'expression de BNIP3 implique une plus grande résistance des adénocarcinomes pancréatiques à la chimiothérapie (147,148).

Enfin, du point de vue épidémiologique, PARKIN, BNIP3 et PINK1 sont mutées dans une grande variété de cancer : notamment les cancers gynécologiques (sein, ovaire), les cancers digestifs (colo-rectal, estomac, pancréas), le cancer du poumon, et certaines tumeurs neurologiques (glioblastome, neuroblastome) (141).

2) Mitophagie et cardiopathies

Le cœur est un tissu métaboliquement très actif et la grande majorité de l'énergie est produite par la phosphorylation oxydative. L'altération des capacités mitochondriales est associée au développement de maladies cardiovasculaires (141).

Tout d'abord, les dysfonctionnements de la voie de signalisation PINK1-PARKIN ont été causalement impliqués dans la genèse de cardiopathies vasculaires et dégénératives.

L'inactivation de la kinase PINK1 conduit à l'apparition spontanée d'une cardiomyopathie hypertrophique liée à l'âge avec une augmentation du stress oxydant, des anomalies de la polarisation mitochondriale (149) et une plus grande sensibilité des cardiomyocytes aux lésions d'ischémie-reperfusion (150). De manière intéressante, la diminution de l'expression de PINK1 est une caractéristique de l'insuffisance cardiaque terminale chez l'Homme (149).

L'inactivation de PARKIN n'entraîne pas de cardiopathie à l'état basal mais conduit à l'accumulation de mitochondries morphologiquement anormales (151) aggravant les lésions ischémiques et la mortalité en cas d'infarctus du myocarde (152). Plus physiologiquement, au cours du vieillissement cardiaque, la sénescence induite par P53 est associée à une inhibition de la mitophagie, secondaire à l'interaction de P53 avec PARKIN dans le cytosol, ce qui bloque sa translocation vers les mitochondries endommagées et contribue au dysfonctionnement cardiaque lié à l'âge. Inversement, les souris transgéniques surexprimant PARKIN ont une fonction cardiaque préservée avec le temps (153).

3) Mitophagie et maladies neurodégénératives

Les maladies neurodégénératives sont caractérisées par l'accumulation d'agrégats protéiques toxiques associés à un dysfonctionnement de l'agrégation, cependant des dysfonctions de la mitophagie peuvent être associées (39,141).

a) Maladie de Parkinson

La maladie de Parkinson est caractérisée par une dégénérescence des neurones dopaminergiques de la substance noire associée à des agrégats protéiques intracellulaires nommés corps de Lewy, constitués essentiellement d' α -synucléine (154). Elle survient majoritairement de façon sporadique et idiopathique. La découverte il y a une vingtaine d'années des gènes *PINK1* et *PARK2* comme étant responsables de certaines formes autosomiques récessives (5% des cas) suggère que la mitophagie joue un rôle important dans cette maladie (130,131). Les protéines PINK1 et PARKIN étant ubiquitaires, il est surprenant de constater que seuls les neurones dopaminergiques de la substance noire dégèrent. Or, il semble que la substance noire soit une région cérébrale caractérisée par une instabilité importante du génome mitochondrial. En effet, elle accumule de nombreuses délétions de l'ADN mitochondrial avec l'âge (155). Ces mutations sont plus fréquentes chez les patients Parkinsoniens que chez les sujets sains et elles affectent les protéines de la chaîne respiratoire mitochondriale (156). Cette instabilité génétique serait due à un stress oxydant basal intense en raison d'un métabolisme calcique élevé (157).

En conclusion, leurs mitochondries étant plus facilement altérées, l'homéostasie des neurones dopaminergiques serait particulièrement dépendante de la mitophagie et son dysfonctionnement à la base de la physiopathologie de la maladie de Parkinson.

b) Maladie de Huntington

C'est une maladie autosomique dominante caractérisée par la répétition d'un codon CAG dans le gène *HTT* codant la HUNTINGTINE donnant une forme polyglutaminée qui a tendance à s'agréger (mHTT) (158).

La mHTT provoque des dommages mitochondriaux entraînant une altération du métabolisme énergétique, calcique, et de la dynamique mitochondriale (159). Par ailleurs, le groupe de AM. Cuervo a rapporté une défaillance de l'autophagie dans cette maladie en rapport avec l'incapacité des autophagosomes à séquestrer le contenu cytoplasmique (formation d'autophagosomes « vides »), car le récepteur P62 est inhibé par interaction avec la mHTT. En conséquence, les cellules accumulent des mitochondries dépolarisées à l'origine d'un stress oxydant neurotoxique (160).

Cependant, la surexpression de PINK1 active la mitophagie et suffit à maintenir une population mitochondriale saine conférant une neuroprotection contre la forme mutée de la HUNTINGTINE chez *Drosophila* (158).

Ainsi, la stimulation de la mitophagie à fin thérapeutique pourrait être bénéfique chez les patients en augmentant la clairance des mitochondries endommagées par la mHTT.

F) Conclusion

La mitophagie est un processus d'élimination sélectif des mitochondries par autophagie dont la régulation repose sur des mécanismes complexes. Les mitochondries à digérer sont d'abord individualisées du réseau mitochondrial par fission puis, le recrutement de la machinerie autophagique se fait grâce à l'action de récepteurs spécifiques, eux-mêmes directement régulés par modifications post-traductionnelles ou indirectement *via* l'activation de la voie PINK1-PARKIN. La mitophagie étant dérégulée dans de nombreuses maladies, il est donc important de poursuivre l'exploration des éléments qui entrent en jeu dans son déroulement.

V) LA PROTEINE BAG6

A) Généralités

La famille des protéines BAG (Bcl-2-Associated athanoGene) est composée de six protéines (numérotées de BAG1 à BAG6), dont le premier membre (BAG1) a été identifié en 1995 par criblage des interactants de BCL-2. Elle a été qualifiée « d'athanogene » (du grec « athanos », contre la mort) en raison de sa capacité à favoriser la survie cellulaire en inhibant l'apoptose en synergie avec BCL2 (161).

La caractéristique commune de ces protéines est structurelle : toutes possèdent un domaine BAG situé à l'extrémité C-terminale, à l'exception de BAG5 qui en possède quatre. Ce domaine permet d'interagir et de réguler la chaperonne HSP70 (162).

BAG6 est le représentant de plus haut poids moléculaire de la famille BAG (130 kDa). Son gène appartient à un groupe de neuf gènes situés sur le chromosome 6 nommés BAT (HLA-B-associated transcript) identifiés en 1989 par l'équipe de JL. Strominger au sein du complexe majeur d'histocompatibilité de classe III humain (163,164). La séquence protéique de BAG6 est prédite par la même équipe en 1990 à partir de la séquence d'ADN complémentaire du gène BAT3 (165). BAG6 est redécouverte par Thress et al. en 1998 chez *Xenopus* sous le nom de Scythe, un interactant de la protéine apoptotique REAPER (166).

C'est une protéine relativement conservée chez les vertébrés avec une homologie de séquence de 57% entre la forme humaine et celle de *Xenopus laevis* (167).

B) Localisation

Sa localisation est ubiquitaire, BAG6 est exprimée dans tous les tissus bien que certains tissus tels que le cerveau, les testicules et les organes lymphoïdes soient particulièrement riches en BAG6 (167–169).

A l'échelle cellulaire, elle présente une distribution cytoplasmique et nucléaire. Seule une petite fraction est située dans le noyau, le reste étant majoritairement localisé dans le cytosol ou associé au système endomembranaire (dont le réticulum endoplasmique et la membrane plasmique) (170). BAG6 est également sécrétée dans le milieu extracellulaire sous forme soluble ou associée aux exosomes (171).

Le gène de BAG6 contient 25 exons codant pour la forme entière de la protéine (variant FL ou « full length »). Cinq autres variants issus de l'épissage alternatif des exons 5, 11B et 24 ont été identifiés : tous possèdent des poids moléculaires très proches (de 122 à 130 kDa) (172).

La proportion de chacun de ces variants diffère selon le type de cellule. La localisation subcellulaire de BAG6 dépend de son épissage : par exemple les variants FL ou $\Delta 24$ prédominent au niveau nucléaire tandis le variant $\Delta 11B$ présente une localisation cytosolique plus importante (172). Ces variants n'ont jamais fait l'objet d'une caractérisation fonctionnelle et ils ne sont pas distingués dans les études qui traitent de la protéine BAG6.

C) Structure de la protéine BAG6

BAG6 est une protéine de 1132 acides aminés, d'environ 130 kDa. Elle appartient à un complexe hétérotrimérique qui comprend les protéines BAG6, TRC35 et UBL4A. Elle se comporte comme une plateforme possédant de nombreux interactants (E3 ubiquitine ligases, protéines chaperonnes, protéines hydrophobes) qui lui confèrent des fonctions très variées (173). La séquence de la protéine BAG6 peut être divisée en trois parties (Figure 22).

1) Région N-terminale (acides aminés 1-474)

Elle contient cinq motifs ECI (Evolutionary Conserved Islands) très conservés au cours de l'évolution, organisés en 2 domaines. Ils sont à l'origine d'interactions hydrophobes (167) autorisant BAG6 à lier les domaines transmembranaires de certains peptides ou à interagir avec la sous-unité RPN10C du protéasome (174,175).

Plus particulièrement, le premier motif ECI est un domaine UBL (Ubiquitin-Like) qui permet à BAG6 de recruter des E3-ubiquitine ligases telles GP78 impliquée dans l'ERAD (Endoplasmic-Reticulum-Associated protein Degradation) (176) ou RNF126 impliquée dans l'élimination de peptides défectueux néosynthétisés (177,178).

2) Extrémité C-terminale

Elle contient deux motifs particuliers.

a) Un domaine NLS (Nuclear Localization Sequence)

Il permet la translocation de BAG6 du cytoplasme vers le noyau lors d'un stress (voir chapitre ci-dessous « Fonctions nucléaires de BAG6 »).

b) Un domaine BAG (Bcl-2-Associated AthanoGene)

Les domaines BAG de 110 à 124 acides aminés forment trois alpha-hélices antiparallèles. Leur interaction avec le domaine ATPase des HSP70 active ou inhibe son activité chaperonne. Par rapport aux autres protéines de la même famille, le domaine BAG de BAG6 possède une séquence atypique entraînant une affinité réduite avec la HSP70 (162,167,170).

3) Région centrale

C'est une partie de la protéine qui reste encore structurellement largement indéterminée. Elle contient un domaine DUF3587 (Domain of Unknown Function 3587) liant des protéines mal conformées, lui-même flanqué par deux domaines riches en proline permettant à BAG6 d'interagir avec elle-même (homo-oligomérisation). On note également la présence d'un domaine semblable aux doigts de zinc dont la fonction est inconnue (pas de liaison à l'ADN décrite) (176).

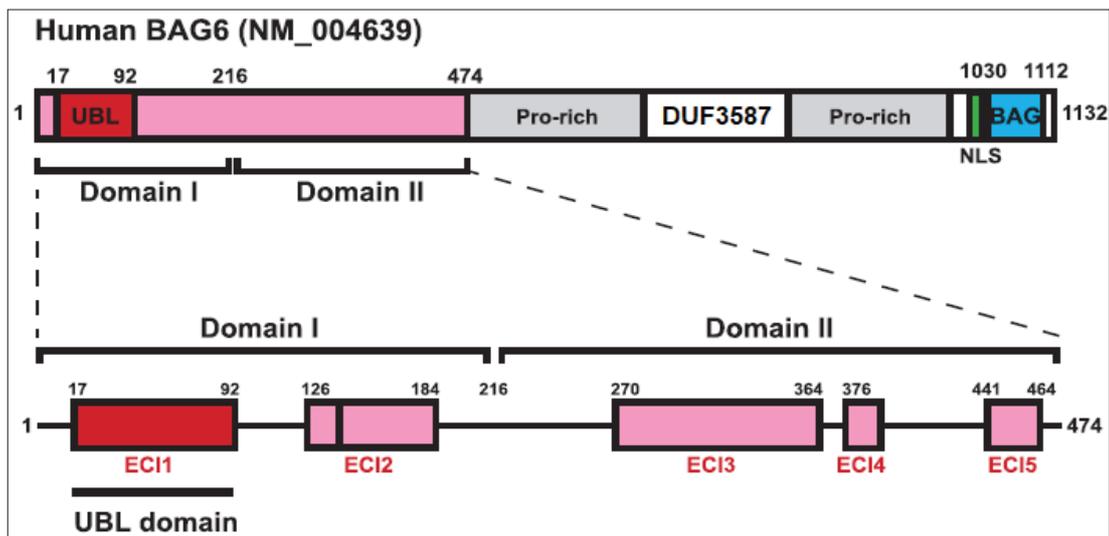


Figure 22. Structure de la protéine BAG6 humaine (167).

C) Fonctions de BAG6

1) Régulation de l'apoptose

L'inactivation de BAG6 chez la souris est létale et se caractérise par des anomalies du développement pulmonaire, rénal et cérébral. Ces malformations sont associées à une dérégulation de l'apoptose hétérogène selon les tissus (179). Dans le rein, l'absence de BAG6 conduit à une activation spontanée de l'apoptose, alors que les neurones sont, au contraire, plus résistants à l'apoptose induite par des agents pharmacologiques tels que la thapsigargine ou la ménadione (179).

Ces résultats illustrent l'importance de BAG6 en tant que régulateur de l'apoptose mais soulignent que son mécanisme de fonctionnement n'est pas unique. En réalité l'effet pro- ou anti-apoptotique de BAG6 est indirect puisqu'il dépend de ses interactants.

Thress et al. sont les premiers à mettre en évidence son effet régulateur de l'apoptose chez *Xenopus*. Ils montrent que l'effet pro-apoptotique de la protéine REAPER dépend de la présence de BAG6 dans les œufs de xénopes. En se liant à BAG6, REAPER induit la libération de facteurs pro-apoptotiques séquestrés par BAG6 ce qui provoque la libération du cytochrome c puis l'activation des caspases (166,180). L'un de ces

facteurs pourrait être la protéine pro-apoptotique AIF (Apoptosis Inducing Factor), qui interagit avec BAG6 ce qui inhibe sa dégradation par le protéasome et rend les MEFs (Mouse Embryonic Fibroblast) plus sensibles à l'apoptose (181).

Inversement, l'interaction de BAG6 avec la protéine pro-apoptotique XEF1AO (Xenopus laevis elongation factor 1 α), entraîne sa poly-ubiquitinylation et sa dégradation par le protéasome ce qui génère un effet anti-apoptotique (182).

BAG6 protège également les macrophages infectés par *Mycobacterium Tuberculosis* de l'apoptose induite par la protéine mycobactérienne ESAT-6 en stabilisant BCL-2 (B-cell lymphoma 2). Il s'agit cependant d'un phénomène transitoire puisque dans ce modèle, BAG6 est ensuite clivée par la caspase 3 et dégradée par le protéasome (183).

Ces résultats montrent que BAG6 module la durée de vie de protéines régulatrices de l'apoptose en les stabilisant ou les dégradant par l'intermédiaire de l'UPS.

2) Contrôle qualité des protéines cytoplasmiques

a) Régulation de l'activité et de l'expression des chaperonnes HSP70

Les chaperonnes HSP70 sont des protéines de choc thermique garantissant l'adoption par les protéines néoformées d'une structure tridimensionnelle fonctionnelle (184). Leur activité de repliement est directement inhibée par BAG6 qui interagit par son domaine BAG avec le domaine ATPase de l'HSP70 et fonctionne dans ce contexte comme une co-chaperonne (185).

En parallèle, BAG6 augmente l'expression de HSP70 lors d'un choc thermique en inhibant sa dégradation par le protéasome (186). Ainsi, l'invalidation de BAG6 dans des cellules germinales testiculaires murines coïncide avec la dégradation protéolytique de HSP70-2 ce qui induit l'apoptose, une hypogénésie testiculaire et une infertilité totale (187).

b) Élimination des polypeptides agrégés ou défectueux

L'élimination des polypeptides mal repliés est importante car leur accumulation conduit à leur agrégation ou à des interactions inappropriées avec d'autres protéines, phénomènes aux conséquences toxiques pour la cellules (178).

L'inhibition de la dégradation des protéines par le protéasome induit la formation d'agrégats insolubles (> 2000 kDa) riches en peptides néoformés incorrectement assemblés et polyubiquitylés. BAG6 et le protéasome sont retrouvés associés à ces structures ce qui suggère l'implication de BAG6 dans leur dégradation par le protéasome (188).

En effet, grâce à son extrémité N-terminale formant des liaisons hydrophobes, BAG6 est recrutée au niveau des protéines néo-synthétisées ayant des anomalies conformationnelles, agrégées ou mal localisées qui laissent apparaître des motifs hydrophobes normalement inaccessibles (par exemple les domaines transmembranaires) (178,189,190). Une fois liés à BAG6, ces peptides sont poly-ubiquitinylés par l'E3 ubiquitine ligase RNF126, recrutée *via* le domaine UBL de BAG6, puis transportés par BAG6 vers le protéasome (interaction démontrée avec la sous-unité RPN10 du protéasome chez le Xénope) (177,178,188) (Figure 23).

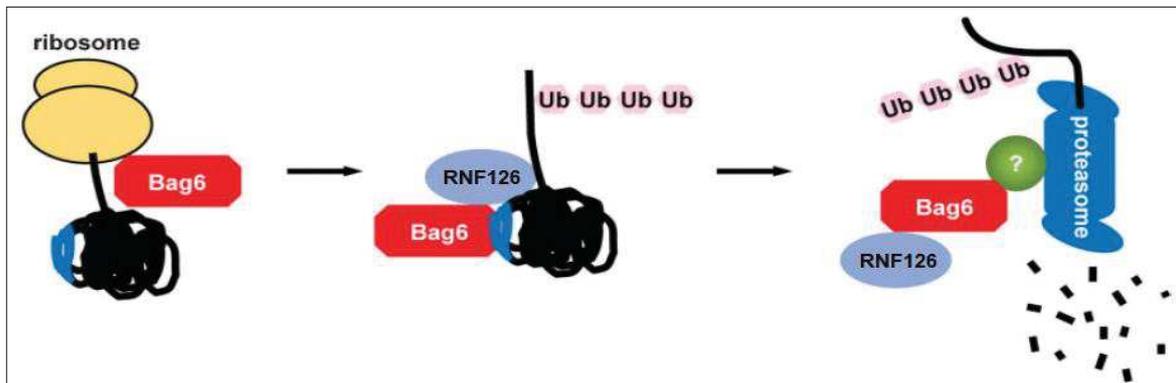


Figure 23. BAG6 favorise l'élimination des polypeptides agrégés ou défectueux (170). Les polypeptides néo-synthétisés mal conformés sont détectés par BAG6 qui recrute l'E3 ubiquitine ligase RNF126 entraînant leur poly-ubiquitinylation. BAG6 escorte ensuite la protéine jusqu'au protéasome où elle sera dégradée.

c) Translocation et rétrotranslocation des protéines ancrées au RE

1- Translocation des protéines ancrées par leur extrémité C-terminale

Les protéines ancrées par leur extrémité C-terminale (ou « Tail-Anchored protein » ou « protéine TA ») possèdent un domaine transmembranaire hydrophobe à leur extrémité C-terminale. Leur extrémité N-terminale est dirigée vers le cytosol.

Elles sont synthétisées dans le cytosol puis ancrées post-traductionnellement dans le RE. BAG6 interagit avec les ribosomes et fixe le domaine transmembranaire dès sa synthèse ce qui prévient l'agrégation des protéines TA par interactions hydrophobes. La protéine TA est ensuite transférée de BAG6 vers la chaperonne TRC40, par l'intermédiaire de ses interactants UBL4A et TRC35. TRC40 reconnaît le domaine transmembranaire, s'homodimérise et insère l'extrémité C-terminale de la protéine TA dans la membrane du RE (190–192) (Figure 24).

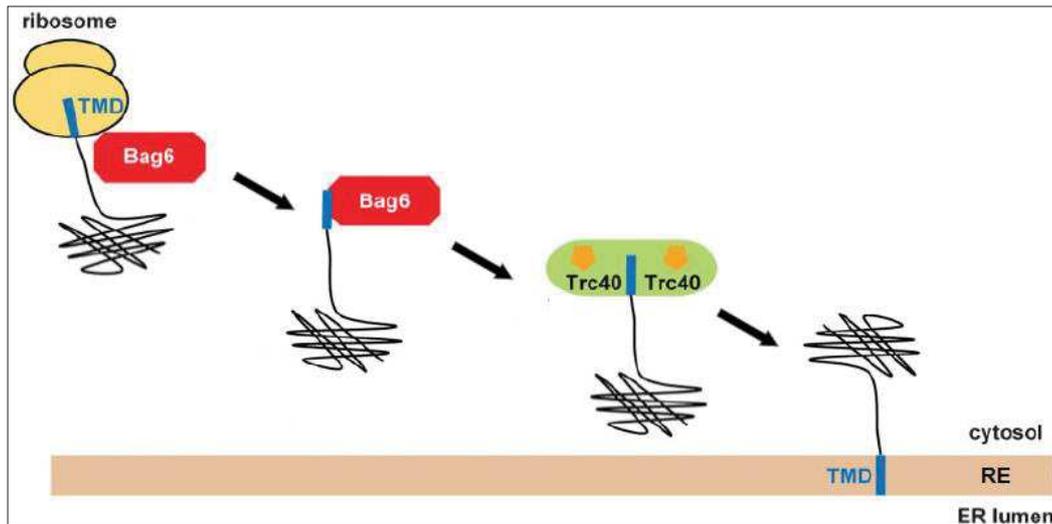


Figure 24. BAG6 permet la translocation post-traductionnelle des protéines ancrées au RE (170). BAG6 se fixe au domaine transmembranaire hydrophobe des protéines, les solubilise et les transfère à TRC40 qui permet leur insertion dans la membrane du RE.

2- Dégradation des protéines associées au RE (ERAD)

L'ERAD (Endoplasmic-Reticulum-Associated protein Degradation) est un mécanisme de rétrotranslocation vers le cytosol des protéines du RE présentant des anomalies conformationnelles suivi de leur dégradation par l'UPS. Il est essentiel à l'homéostasie du RE afin de prévenir l'agrégation de ces polypeptides défectueux.

L'ERAD repose sur un système de chaperonnes de la lumière du RE qui détectent les protéines anormales, et sur un complexe de rétrotranslocation comprenant l'ATPase P97 et l'E3 ubiquitine ligase membranaire GP78 qui poly-ubiquitine les peptides à éliminer.

BAG6 est associé au complexe de rétrotranslocation en interagissant avec GP78 par son domaine UBL ainsi qu'avec les substrats de l'ERAD, ce qui prévient leur agrégation en les maintenant dans un état soluble, puis contribue à leur élimination en les transportant vers le protéasome (167,170,176,193) (Figure 25).

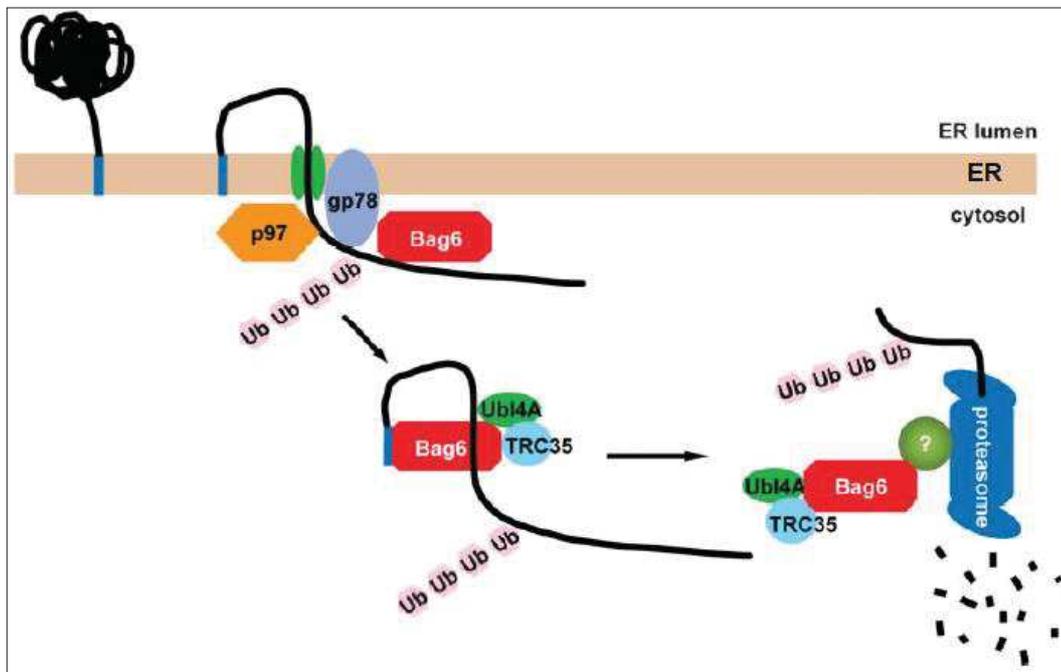


Figure 25. Le complexe BAG6-UBL4A-TRC35 est impliqué dans la dégradation des protéines associées au RE (ERAD) (170). La rétrotranslocation des protéines du RE dépend de P97 et GP78. Puis BAG6 escorte et solubilise les substrats de l'ERAD après leur rétrotranslocation du RE jusqu'au protéasome.

Au total, à travers son activité co-chaperonne de la HSP70 et son activité d'élimination des peptides via l'UPS on constate que BAG6 est un acteur central du contrôle qualité des protéines cytoplasmiques.

3) Fonctions nucléaires

a) Régulation épigénétique

Dans le noyau, BAG6 interagit avec deux méthyltransférases (SET1A et DTO1L) ayant pour substrat l'histone H3. Cette activité favorise l'expression de certains oncogènes comme *MYC* ou *BRCA1* (194) ainsi que le recrutement de 53BP1 au niveau des foyers d'ADN endommagés par des irradiations (195).

BAG6 joue donc un rôle important dans la réparation des dommages à l'ADN.

b) Régulation du cycle cellulaire

P21^{Cip1} est une protéine nucléaire inhibant le cycle cellulaire par interaction avec les complexes Cycline/CDK (cyclin-dépendant kinase) de la phase G1. Elle est induite par P53 en réponse à des dommages de l'ADN et prévient donc sa réplication qui a lieu en phase S (196).

Durant la phase G1, BAG6 induit la dégradation de P21^{Cip1} ce qui active la réplication de l'ADN et favorise le passage en phase S. En phase G2, BAG6 induit l'expression du complexe Cycline A/CDK2 responsable de la phosphorylation de P21^{Cip1}. Phospho-P21^{Cip1} active alors le complexe Cycline B/CDK1 requis pour la transition G2/M puis est dégradé, permettant la sortie de la phase M et l'entrée dans un nouveau cycle. Les mécanismes responsables de la dégradation de P21^{Cip1} et de l'expression de Cycline A/CDK2 ne sont pas décrits pas les auteurs (196).

Ainsi, BAG6 stimule la progression du cycle cellulaire en modulant l'expression et l'activité de la protéine P21^{Cip1} ce qui favorise la transition entre les phase G1/S et G2/M.

4) BAG6 est une navette pour l'acétyl-transférase EP300

Le domaine NLS de BAG6 est masqué en conditions basales par TRC35, ainsi BAG6 prédomine dans le cytosol. Toutefois, en réponse à un stress, BAG6 peut se délocaliser dans le noyau et contribuer indirectement à la régulation de l'expression génique (167,170,193).

Ainsi, de par son interaction, BAG6 permet la translocation nucléaire de l'acétyl-transférase EP300 ; autrement dit, BAG6 fonctionne comme une navette nucléocytoplasmique pour EP300. Une fois dans le noyau, EP300 interagit avec le facteur de transcription P53 et augmente son acétylation conduisant à l'expression de gènes spécifiques de l'apoptose ou de l'autophagie (197,198).

Suite à un stress génotoxique (irradiation), l'acétylation de P53 dépendante de BAG6 favorise l'expression de gènes impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN (*PUMA* et *P21*) ainsi que l'apoptose (197).

La translocation du couple BAG6-EP300 est également induite par la carence nutritionnelle, et active l'expression de gènes pro-autophagiques comme *Sestrin 1*. Simultanément, la déplétion d'EP300 dans le cytoplasme, réduit l'acétylation d'ATG7, ATG5, ATG12 et LC3 ; modification post-traductionnelle inhibitrice de l'autophagie (199). Au contraire, lorsque BAG6 est invalidée ou constitutivement localisée dans le cytoplasme suite à une mutation du domaine NLS, l'accumulation cytoplasmique d'EP300 conduit à l'hyperacétylation des protéines ATGs et une inhibition de l'autophagie (198).

Cette dernière étude, menée sous la direction de S. Pattingre, a mis en évidence le rôle essentiel de BAG6 en tant que régulateur de l'autophagie (Figure 26).

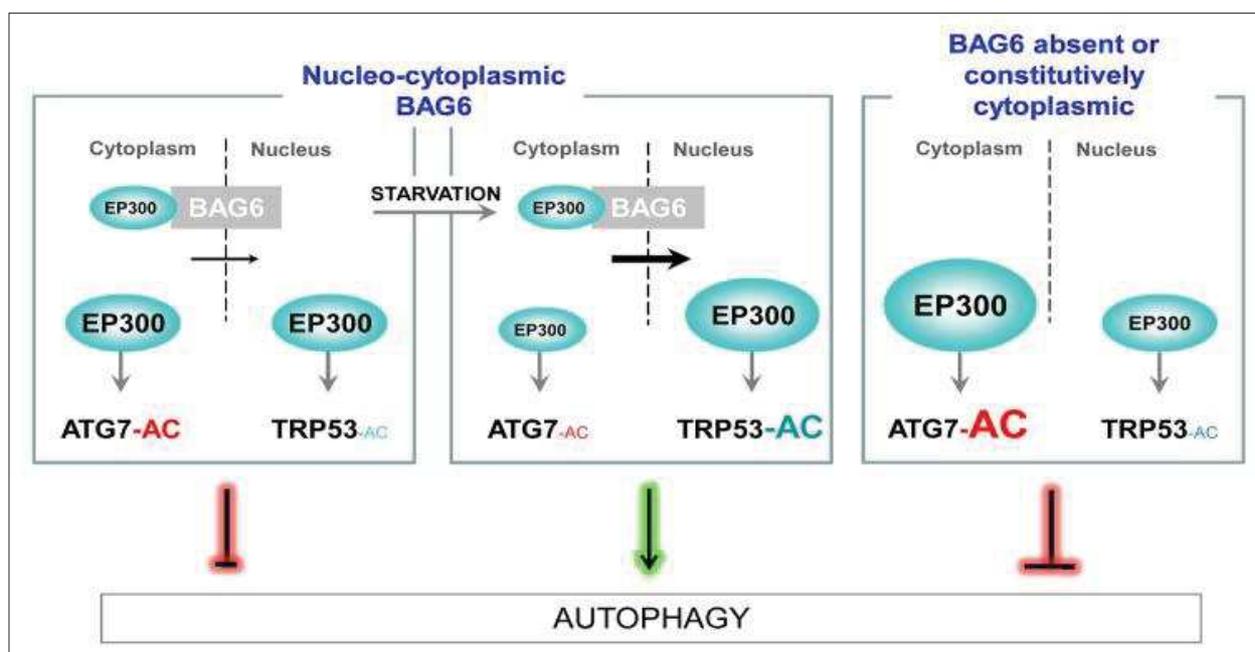


Figure 26. BAG6 inhibe l'acétylation cytosolique d'ATG7 dépendante de P300 mais active l'acétylation nucléaire de P53 durant la carence nutritionnelle (voir texte ci-dessus) (198).

5) Fonctions mitochondriales

Plusieurs études font état d'une translocation et d'une agrégation des mitochondries en région périnucléaire en réponse à leur dépolérisation par le protonophore CCCP. Ce phénomène dépend de P62 et de PARKIN (200,201). Récemment, il a été montré que BAG6 participe également à cette translocation périnucléaire induite par le CCCP mais les mécanismes moléculaires n'ont pas été identifiés (202).

En outre, BAG6 a été identifié comme interagissant avec les mitofusines (MFN1 et MFN2), responsables de la fusion mitochondriale, et favorise leur dégradation par le protéasome (203).

Ces deux études sont les premières à évoquer le rôle de BAG6 au niveau mitochondrial. Cependant, sa caractérisation fonctionnelle reste encore très incomplète, et nécessite des expérimentations complémentaires.

OBJECTIFS DE LA THESE

L'autophagie est un processus d'autodigestion du matériel intracellulaire qui repose sur la formation de vésicules à double membrane nommées autophagosomes qui séquestrent les organites et macromolécules puis fusionnent avec les lysosomes pour permettre leur dégradation (30).

La dégradation sélective des mitochondries par autophagie se nomme mitophagie. En éliminant les mitochondries superflues ou endommagées à l'origine d'un stress oxydant toxique et mutagène, elle contribue au maintien de l'homéostasie cellulaire. Sa régulation met en jeu des voies de signalisations telles que la voie PINK1-PARKIN et des récepteurs spécifiques appelés récepteurs de la mitophagie (114).

La protéine BAG6 est une co-chaperonne des HSP70 et possède des fonctions variées : régulation de l'apoptose, modifications épigénétiques, repliement des protéines, élimination de peptides par le système ubiquitine-protéasome (167).

Les travaux antérieurs de l'équipe ont montré que BAG6 est également essentielle pour l'autophagie en régulant la localisation intracellulaire de l'acétyltransférase EP300 (198).

Par ailleurs, deux publications récentes ont suggéré que BAG6 intervient au niveau mitochondrial en favorisant la dégradation des mitofusines par le protéasome et en permettant la translocation périnucléaire des mitochondries endommagées par le CCCP (200,201).

Compte-tenu de l'importance physiopathologique de la mitophagie en terme de maladies dégénératives et de cancer, il nous est apparu primordial d'approfondir le rôle de BAG6 dans le contrôle qualité des mitochondries. Nous étudierons d'abord son implication dans la dynamique mitochondriale puis dans la mitophagie.

Les résultats et les procédures expérimentales seront présentés sous la forme d'un article original actuellement en révision dans la revue FASEB (Federation of American Societies for Experimental Biology).

RESULTATS

BAG6 promotes mitochondrial fission, PINK1/PARKIN signaling and mitophagy in a LIR domain dependent manner

Romain Ragimbeau^{1*}, Leila El Kebriti^{1*, 2}, Elise Fourgous¹, Abdelhay Boulahtouf¹, Giuseppe Arena³, Lucile Espert⁴, Céline Gongora¹, Nadine Houédé^{1, 2}, Sophie Patingre^{1, ‡}

1: IRCM, Institut de Recherche en Cancérologie de Montpellier, INSERM U1194, Université de Montpellier, Institut régional du Cancer de Montpellier, Montpellier, F-34298, France.

2: CHU de Nîmes, F-30900 Nîmes;

3: Luxembourg Center for Systems Biomedicine, University of Luxembourg, 6, avenue du Swing, L-4367 Belvaux, Luxembourg;

4: IRIM, University of Montpellier, UMR 9004 CNRS, 34293 Montpellier, France.

* Equal contribution

‡ Corresponding author: sophie.patingre@inserm.fr

Keywords: Mitophagy, BAG6, Fission, Signaling

Abbreviations

ATG proteins	Autophagy-related proteins
BAG6	Bcl-2-associated Athanogen-6
BNIP3	BCL2-interacting protein 3
CCCP	Carbonyl Cyanide m-ChloroPhenyl hydrazine
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DRP1	Dynamin-Related Protein 1
EBSS	Earle's Balanced Salt Solution
EV	Empty Vector
ER	Endoplasmic Reticulum
FCS	Fetal Calf Serum
IMM	Inner Mitochondrial Membrane
LC3	protein light chain 3
LIR	LC3 Interacting Region
MEFs	Mouse Embryonic Fibroblast
MFN2	MitoFusiN-2
NIX	NIP3-like protein X
NT	Non Treated
OMM	Outer Mitochondrial Membrane
PINK1	PTEN-Induced putative Kinase 1
PK	Proteinase K
TFAM	Transcription Factor A, Mitochondrial
TOMM20	Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 20

BAG6 promotes mitochondrial fission, PINK1/PARKIN signaling pathway and mitophagy by interacting with LC3 through a LIR domain

Abstract

Bcl-2-associated athanogen-6 (BAG6) is a nucleocytoplasmic shuttling protein involved in protein quality control. We previously demonstrated that BAG6 is essential for autophagy by regulating the intracellular localization of the acetyltransferase EP300 and thus modifying accessibility to its substrates: (TP53 in the nucleus and autophagy-related proteins in the cytoplasm). Here, we investigated BAG6 localization and function in the cytoplasm. First, we demonstrated that BAG6 is localized in the mitochondria. Specifically, BAG6 is expressed in the mitochondrial matrix under basal conditions, and translocates to the outer mitochondrial membrane after mitochondrial depolarization with carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine, a mitochondrial uncoupler that induces mitophagy. Moreover, BAG6 ectopic expression in LoVo colon cancer cells, which do not express endogenous BAG6, leads to the activation of the PINK1/PARKIN pathway and to the phospho-ubiquitination of mitochondrial proteins. Finally, BAG6 contains two LIR (LC3-interacting Region) domains specifically found in receptors for selective autophagy and responsible for the interaction with LC3 and for autophagosome selectivity. Site-directed mutagenesis showed that BAG6 requires wild type LIRs domains for its ability to stimulate mitophagy. In conclusion, we propose that BAG6 is a novel mitophagy regulator that induces mitochondrial fragmentation, a prerequisite for mitophagy and PINK1/PARKIN signaling.

Introduction

Mitochondria are found in the cytoplasm of all eukaryotic cells, and are essential for the maintenance of cell homeostasis. They provide energy through ATP production *via* oxidative phosphorylation, and are involved in many crucial cell functions, such as signaling, metabolism, calcium homeostasis and intrinsic apoptosis. Due to their major functions in cell fate and homeostasis, the structure, biogenesis and degradation of mitochondria need to be tightly regulated. Mitochondria are highly dynamic organelles that oscillate constantly between fusion and fission, depending on the cellular needs. For instance, the lysosomal degradation of mitochondria only occurs when the organelles are fragmented, which facilitates their engulfment by autophagosomes [1–3].

Macroautophagy, called thereafter autophagy, is regulated by autophagy-related proteins (ATG) and allows the degradation of intracellular material into the lysosomes after its sequestration in a vacuole, called autophagosome. Autophagy occurs in physiological conditions and ensures cellular homeostasis by renewing the cytoplasm. It is also a stress response mechanism and its induction allows cell survival. Upon stress, a selective form of autophagy enables the specific degradation of aggregates (aggrephagy), organelles (e.g. pexophagy in the case of peroxisomes), or intracellular pathogens (xenophagy). Organelles are selectively targeted to autophagosomes through receptors or adaptors that bind to autophagosomal bound form of protein light chain 3 (LC3). These receptors/adaptors harbor a LC3 Interacting Region (LIR domain) defined by the W/F/YxxL/I sequence that is essential for the interaction with LC3-II [4].

On the other hand, mitophagy is the process by which damaged or depolarized mitochondria are degraded through selective autophagy. It has been shown that several mitophagic receptors, located on mitochondria, participate in this process, including BNIP3L/NIX [5], BNIP3 [6], BCL2L13 [7], PHB2 [8], and FKBP8 [9] in mammalian cells, as well as Atg32 in yeast [10]. The specific degradation of mitochondria is also ensured by cytoplasmic adaptors [5] that can bring together the autophagosome, *via* LC3, and the mitochondria *via* specific signaling events [11]. Upstream of the core mitophagy machinery, the most characterized signaling pathway specific for mitophagy induction involves the PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1) and the E3 ubiquitin protein ligase PARKIN. After mitochondrial depolarization, PINK1 accumulates at the outer

mitochondrial membrane (OMM) and activates PARKIN by phosphorylation, thus allowing its mitochondrial recruitment [12]. Once activated, PARKIN ubiquitinates OMM proteins and then PINK1 phosphorylates ubiquitin on serine 65 [13]. Then, specific adaptors, such as Sequestosome 1/P62, can recognize the tagged mitochondria for autophagic elimination.

Bcl-2-associated athanogen-6 (BAG6; also known as BAT3/Scythe) is a nucleocytoplasmic shuttling ubiquitin-like protein involved in many physiological and pathological processes, such as apoptosis, antigen presentation and T-cell response. It acts as a co-chaperone for HSP/HSC70 proteins to allow the recognition of misfolded proteins and their proteasomal degradation [14,15]. We previously demonstrated that BAG6 is essential for autophagy by regulating the intracellular localization of the acetyltransferase EP300, thus modifying accessibility to its substrates (TP53 in the nucleus, and ATG5, AGT7, ATG12 and LC3 in the cytoplasm). During autophagy induction, BAG6 sequesters EP300 in the nucleus, leading to increased acetylation of TP53 and expression of pro-autophagic TP53 target genes. The reduced EP300 level in the cytoplasm maintains a low level of cytoplasmic ATG protein acetylation that allows autophagy induction [16,17]. It has been recently reported that BAG6 has a role also in the physiology of mitochondria. Specifically, BAG6 is involved in the proteasomal degradation of the OMM GTPases mitofusin 1 and 2 (MFN1 and 2) in cells that do not express Dynamin-Related Protein 1 (DRP-1), a protein involved in mitochondrial fission [18]. BAG6 is also involved in the PARKIN-dependent cytoplasmic redistribution of damaged mitochondria [19].

In this work, we investigated BAG6 role in the regulation of mitophagy after mitochondrial depolarization. We first demonstrated that BAG6 is present in mitochondria in the tested cell lines. In LoVo cells that do not express endogenous BAG6, its ectopic expression induced mitophagy after mitochondrial depolarization. Then, we observed that BAG6 plays a crucial role in all mitophagy execution. Indeed, BAG6 regulated the mitochondrial structure and induced fission, a prerequisite for mitophagy. BAG6 stimulated PINK1/PARKIN signaling and ubiquitin phosphorylation on mitochondrial proteins. Finally, we found that BAG6 harbors two LIR domains, LIR1 (N-terminal position) and LIR2 (C-terminal position). After site directed mutagenesis, we demonstrated that both LIR domains are essential for mitophagy induction. In addition,

when mutated on its LIR2 domain, BAG6 loses its interaction with LC3 suggesting that it may behave like a mitophagy adaptor or receptor.

Results

BAG6 is localized in mitochondria

To investigate BAG6 role in autophagy, we first analyzed its intracytoplasmic localization after subcellular fractionation in SW480 colon cancer cells. We observed that BAG6 was present also in the mitochondrial fraction, similar to the mitochondrial marker TOMM20 (Fig. 1A). Endogenous BAG6 was localized in mitochondria in HEK293T cells (Fig. S1A) and in mouse embryonic fibroblasts (MEFs) (Fig. S1B). Immunofluorescence staining of SW480 cells confirmed BAG6 co-localization with TOMM20 (Fig 1B).

To precisely determine BAG6 sub-mitochondrial localization, we carried out limited proteolysis of isolated mitochondria from SW480 cells to sequentially degrade mitochondrial membranes. Specifically, incubation with proteinase K (PK) leads to OMM degradation, while PK and swelling target the inner mitochondrial membrane (IMM), and PK, swelling and Triton X-100 degrade the entire mitochondria [20]. In basal conditions, the BAG6 protein displayed a degradation pattern similar to that observed for the Mitochondrial Transcription Factor A (TFAM), indicative of its localization in the mitochondrial matrix (Fig. 1C).

Human LoVo cells do not express BAG6 (Fig. 1D). Subcellular fractionation of BAG6-transfected LoVo cells confirmed the presence of BAG6 in the mitochondrial fraction (Fig. 1D). As BAG6 may also be localized in the Endoplasmic Reticulum (ER) [21], we incubated the different cell fractions with calnexin, an ER marker, to exclude the presence of mitochondrion-associated ER membranes in the mitochondrial fraction (Fig. 1D). After limited proteolysis of isolated mitochondria from BAG6-expressing LoVo cells cultured in complete media (NT), BAG6 resistance to PK treatment and swelling suggested again that BAG6 was localized in the mitochondrial matrix. Conversely, after induction of mitochondrial depolarization with carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP), BAG6 was degraded upon incubation with PK alone, like the OMM protein TOMM20 (Fig. 1E).

These results suggest that BAG6 is located in the mitochondrial matrix in basal conditions, and that it is relocated to the OMM after mitochondrial damage. However, BAG6 does not possess a transmembrane domain or a canonical mitochondrial targeting signal, and the mechanism of its targeting to mitochondria remains unknown.

BAG6 induces mitophagy

Mitochondria are highly dynamic organelles and their homeostasis is tightly regulated by a balance between biogenesis and degradation. On the basis of our findings that BAG6 has a role in autophagy [16,17] and is relocated to the OMM after incubation with CCCP (Fig. 1E), we asked whether BAG6 participates in the maintenance of the mitochondrial mass and in mitophagy. First, we performed a morphological analysis by transmission electron microscopy (TEM) of LoVo cells transfected with empty vector (EV) or a BAG6-encoding plasmid after incubation in the presence or absence of CCCP (Fig. 2A). The quantification of the number of mitochondria in 200 cells indicated that their number per cell was significantly decreased in BAG6-expressing cells after exposure to CCCP (Fig. 2B). Moreover, mitochondrial staining using MitoTracker™ Red FM [22] of EV- and BAG6-transfected LoVo cells after incubation with CCCP showed that the fluorescence intensity, which reflects the mitochondrial mass, was decreased only in BAG6-expressing cells, suggesting that BAG6 is involved in mitochondrial mass regulation (Figure 2C). Importantly, incubation with CCCP and chloroquine (CQ), an inhibitor of autophagic flux that impairs the fusion between autophagosome and lysosome, restored the mitochondrial mass in BAG6-expressing cells (Fig. 2C). We then conclude that BAG6 induces the degradation of mitochondria in lysosomes by mitophagy.

TFAM, a mitochondrial matrix marker, is commonly used to monitor the degradation of mitochondria by mitophagy because OMM and IMM markers might also be degraded through the proteasome pathway [8,23,24]. After incubation with CCCP, TFAM expression was reduced by 58% in BAG6-expressing LoVo cells compared with control (EV) (Fig. 2D, 2E). Co-incubation with CQ restored TFAM expression level in BAG6-expressing cells to what observed in control cells (untreated EV), showing that mitophagy is involved in BAG6-dependent degradation of TFAM (Fig. 2D, 2E). Altogether, these findings indicate that BAG6 stimulates mitophagy after mitochondrial depolarization.

BAG6 favors mitochondrial fission

Recently, it has been suggested that BAG6 might have a role in mitochondrial morphology through its interaction and ability to modulate the turnover of the GTPase MFN2, a mitochondrial protein involved in fusion [18]. Moreover, mitochondrial fission is considered a pre-requisite for mitophagy [1]. Therefore, to investigate BAG6 role in mitochondrial morphology, we performed immunofluorescence staining of mitochondria with the MitoTracker™ Red FM dye and observed mitochondrial fragmentation only in BAG6-transfected LoVo cells (Fig. 3A). During mitochondrial fission, the cytosolic GTPase DRP1 translocates to the mitochondria and is phosphorylated on serine 616. Cell fractionation of EV- or BAG6-transfected LoVo cells showed that DRP1 and its phosphorylated active form accumulated only in mitochondria of BAG6-transfected cells (Fig. 3B, 3C). We confirmed this finding by ultrastructural analysis by TEM of EV- and BAG6-transfected LoVo cells after incubation or not with CCCP (Fig. 3D). We measured the size of 200 mitochondria using ImageJ software and observed that their size was significantly decreased in BAG6-expressing cells, independently of CCCP treatment (Fig. 3E). Although significant, this result is underestimated because of the random selection of mitochondria. Altogether, these data suggest that BAG6 induces mitochondrial fission.

The PINK1/PARKIN pathway is activated during BAG6-dependent mitophagy

Mitophagy induction requires precise signaling events that target the mitochondria for their lysosomal degradation. Specifically, after membrane depolarization, the mitochondrial kinase PINK1 is stabilized at the OMM where it recruits the E3 ubiquitin-protein ligase PARKIN. Then, PINK1 and PARKIN cooperate to assemble phosphorylated ubiquitin chains (S65-phospho-ub) on proteins at the OMM that in turn recruit adaptors. Adaptors bind to S65-phospho-ub mitochondrial proteins through their ubiquitin-binding/ubiquitin-associated (UBD/UBA) domain, and to LC3-II via their LIR domain. Alternatively, mitophagy also relies on integral mitochondrial membrane receptors that contain a LIR domain, such as PHB2, FUNDC1, NIX, BNIP3, and BCL2L13 [5,7,8,25,26]. In this case, the PINK1/PARKIN pathway should be dispensable. However, some mitochondrial receptors, such as PHB2, use the

PINK1/PARKIN pathway to enhance mitophagy induction or to induce the OMM proteasomal degradation [8].

To determine the role of the PINK1/PARKIN pathway in BAG6-dependent mitophagy, we first showed that BAG6 expression in LoVo cells promoted PINK1/PARKIN mitochondrial localization in LoVo cells (Fig. 4A, 4B, 4C). Then, using an antibody against ubiquitinated proteins phosphorylated on S65 we observed a 40% increase in the level of S65-phospho-ub mitochondrial proteins in BAG6-transfected LoVo cells compared with EV-transfected cells after incubation with CCCP (Fig. 4D, 4E). These results suggest that BAG6 stimulates the PINK1/PARKIN pathway.

The LIR2 domain of BAG6 is responsible for its interaction with LC3 and for mitophagy induction

Our data showed that BAG6 induces mitophagy, mitochondrial fission, and the PINK1/PARKIN pathway. To further investigate the mechanism by which BAG6 stimulates mitophagy, we analyzed BAG6 sequence and observed the presence of two LIR domains (amino acids 274-279 named LIR1 and 1016-1021 named LIR2) (<https://ilir.warwick.ac.uk/index.php>,[4]) (Fig. 5A). LIR domains have a conserved consensus signal of six amino acids required for the interaction with LC3-II. Receptor or adaptor proteins bearing an inactivating mutation in their LIR domain cannot interact with LC3-II, leading to mitophagy inhibition. Therefore, to test whether BAG6 interacts with LC3 through its LIR domains, we transfected LoVo cells with EV, wild type (WT) BAG6, or BAG6 variants with mutations in the first (BAG6 LIR1) or second LIR domain (BAG6 LIR2) (Fig. 5A). After immunoprecipitation with an anti-BAG6 antibody, analysis with an anti-LC3b antibody showed that WT BAG6 and BAG6 LIR1 interacted with LC3, but not BAG6 LIR2 (Fig. 5B). This data suggests that BAG6 might act as a mitophagy receptor or adaptor.

Next, we investigated the role of BAG6 LIR domains in mitochondrial mass regulation after incubation or not with CCCP by TEM. By counting the number of mitochondria per cell, we observed that their number was similarly reduced in WT BAG6- and BAG6 LIR1-transfected LoVo cells. Conversely, CCCP effect on mitochondrial mass was less important in BAG6 LIR2-transfected cells (Fig. 5C, 5D).

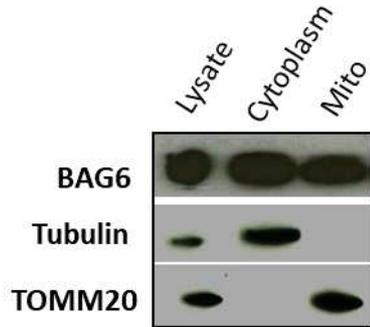
Finally, we analyzed TFAM expression in LoVo cells transfected with EV, WT BAG6, BAG6 LIR1 or BAG6 LIR2 (Fig. 5E, 5F). As previously showed, after incubation with

CCCP, TFAM expression was decreased in WT BAG6 cells compared with control (EV). Conversely, TFAM strongly accumulated both in BAG6 LIR1 and BAG6 LIR2-transfected cells after incubation with CCCP, suggesting that the LIR mutation inhibited TFAM degradation.

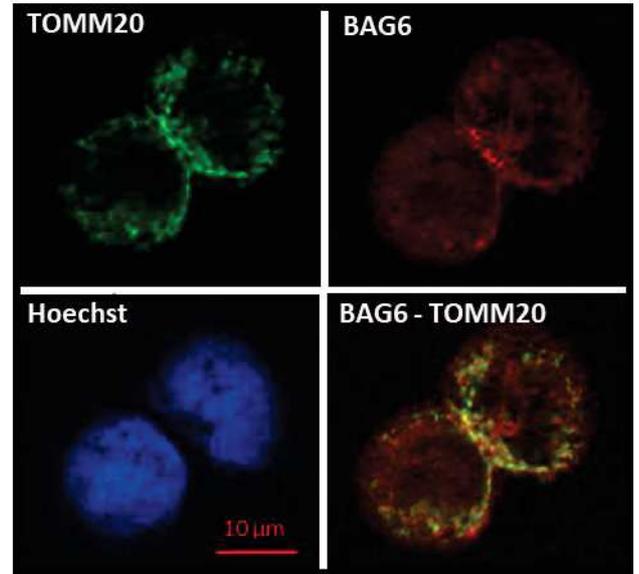
These data showed that the LIR domains are essential for mitophagy. LIR2 domain of BAG6 is crucial for its interaction with LC3 and for its pro-mitophagy effect and suggests that BAG6 is a new mitophagy receptor or adaptor.

Figure 1

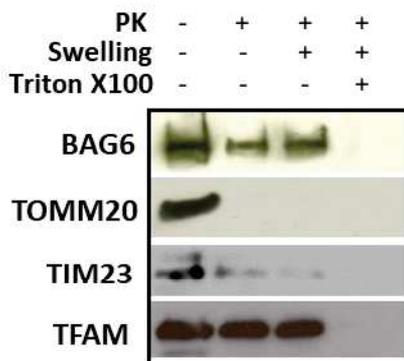
A



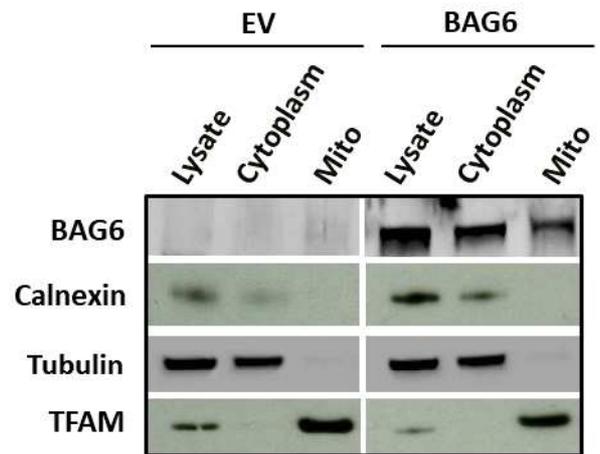
B



C



D



E

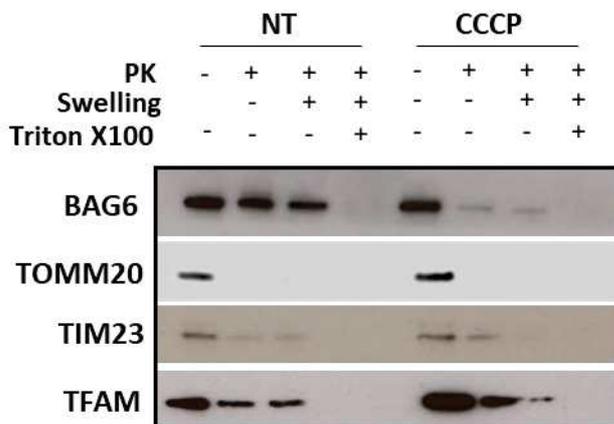


Figure 2

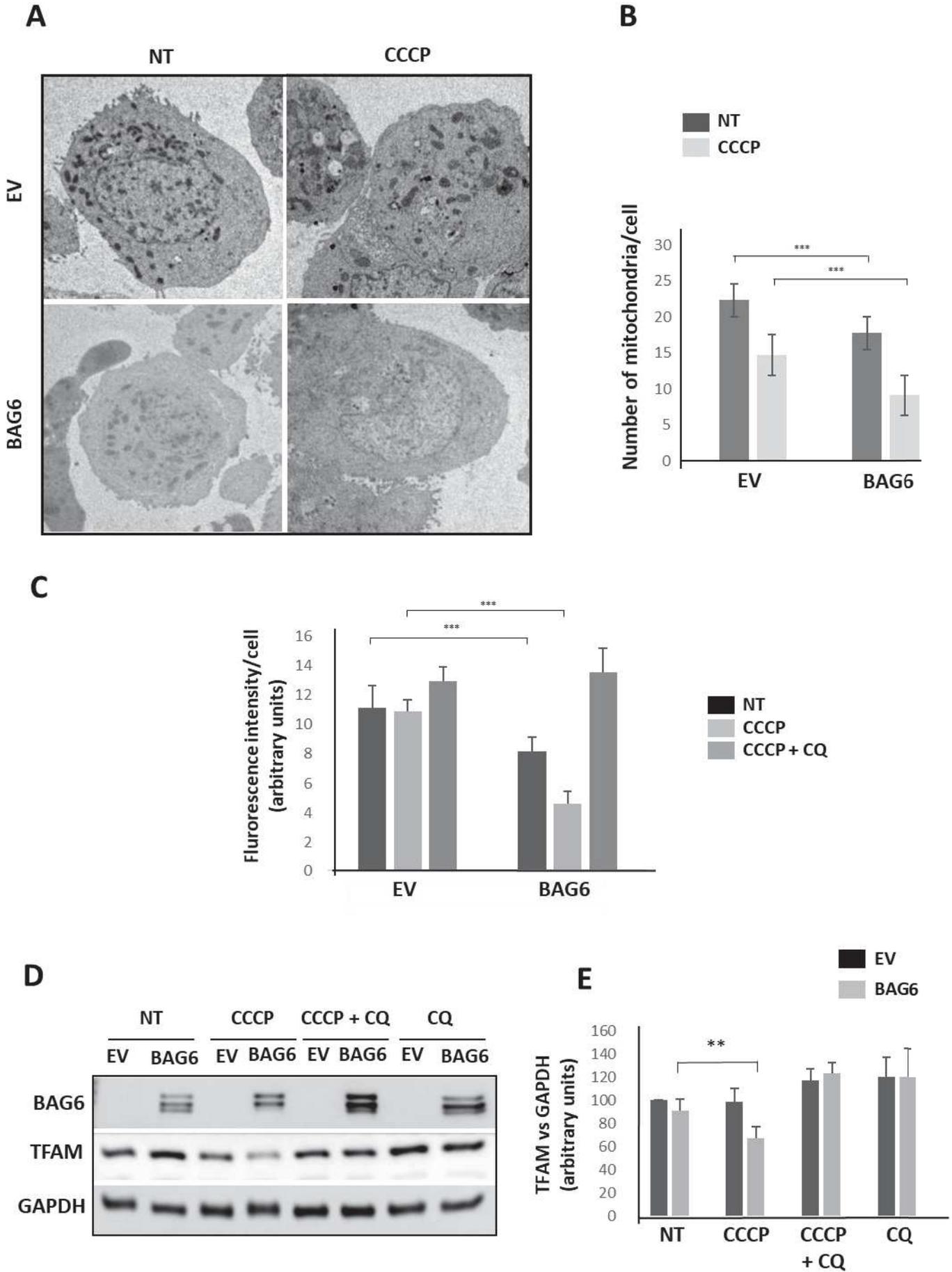


Figure 3

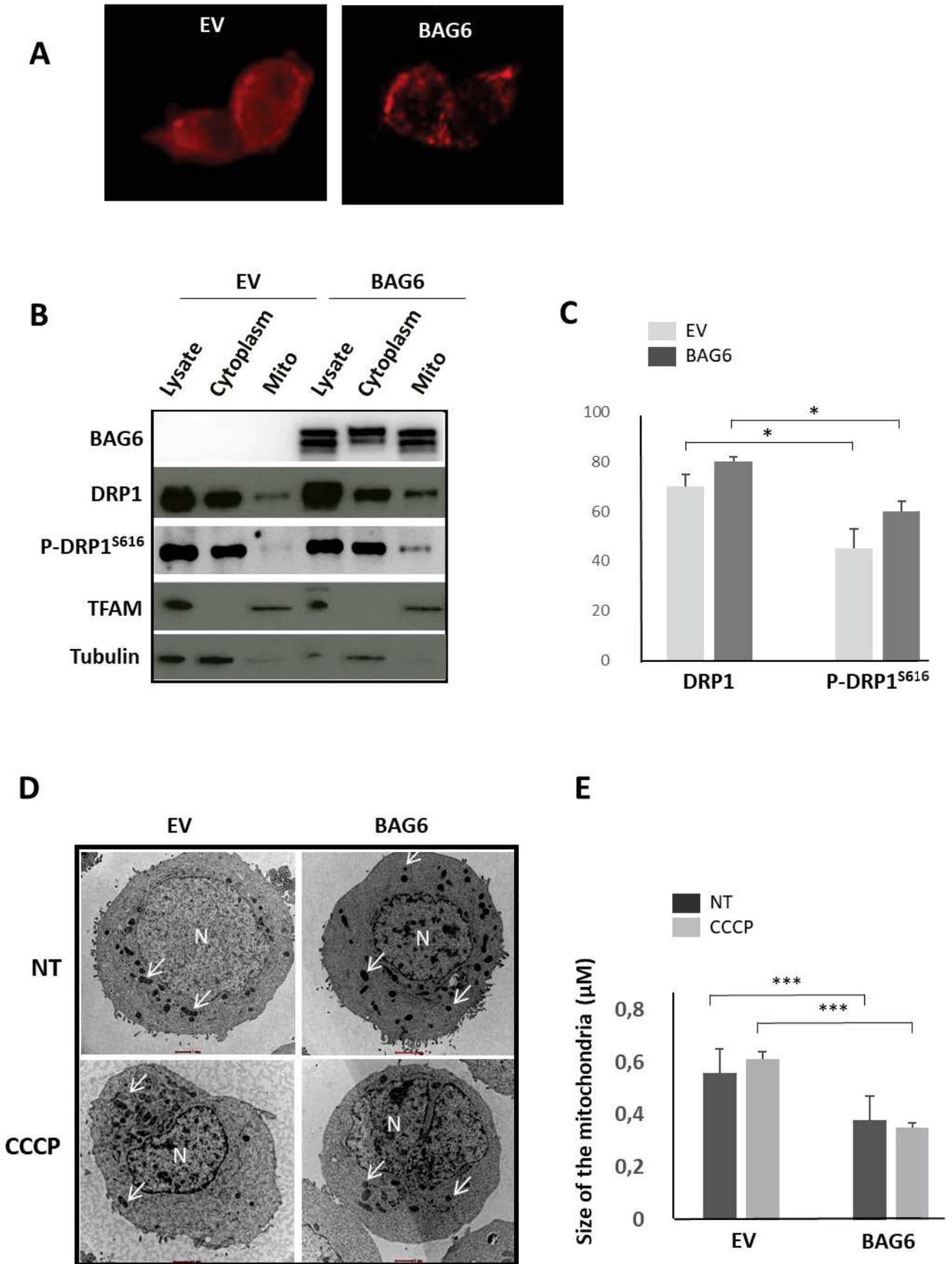


Figure 4

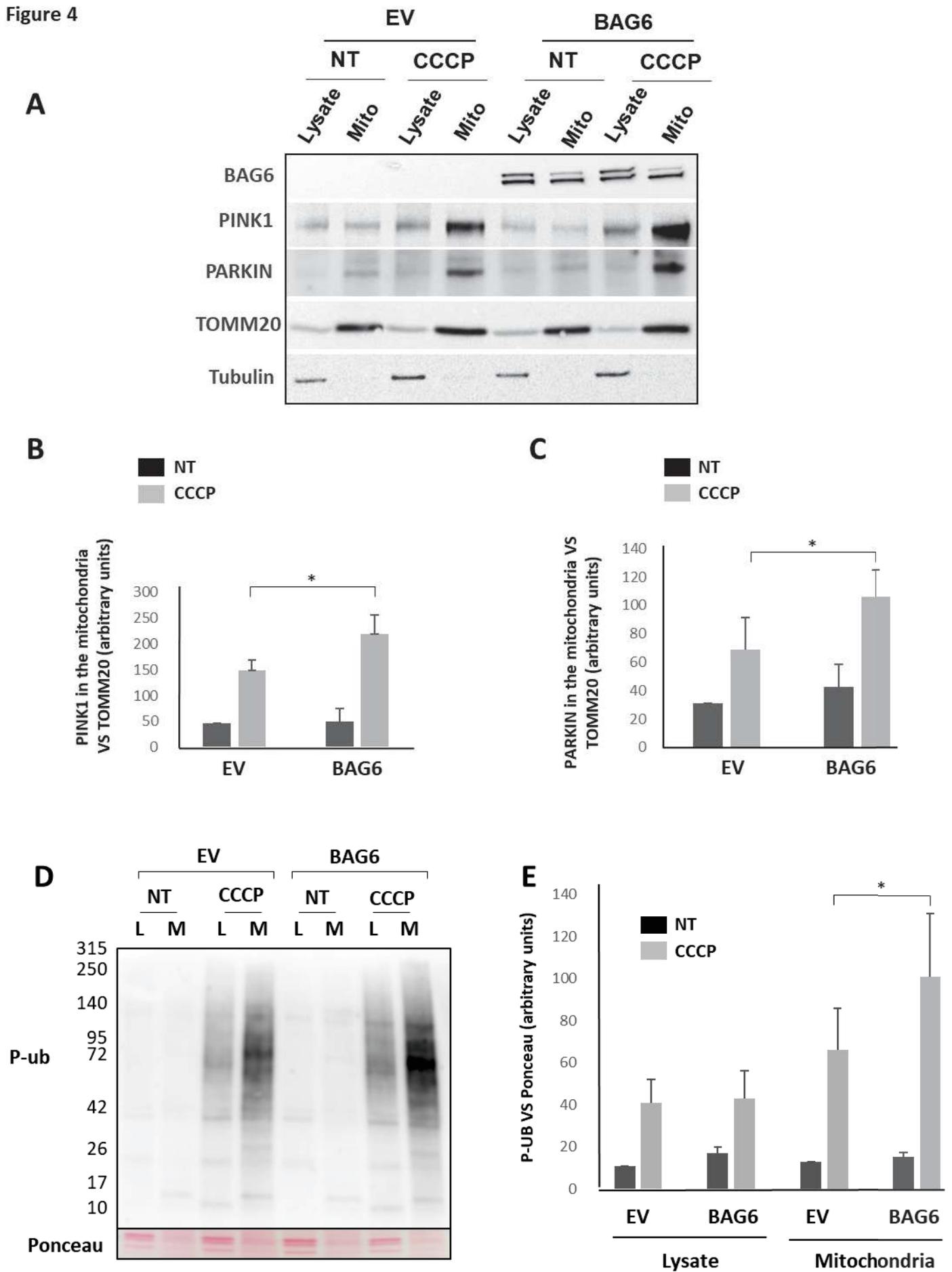
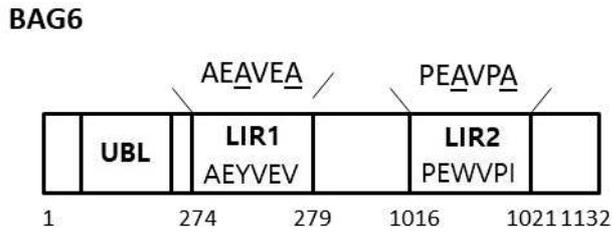
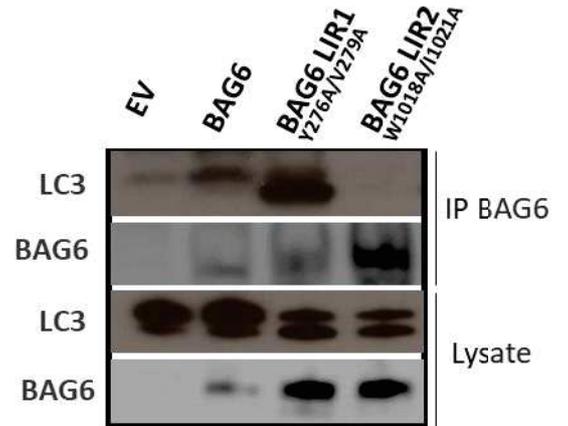


Figure 5

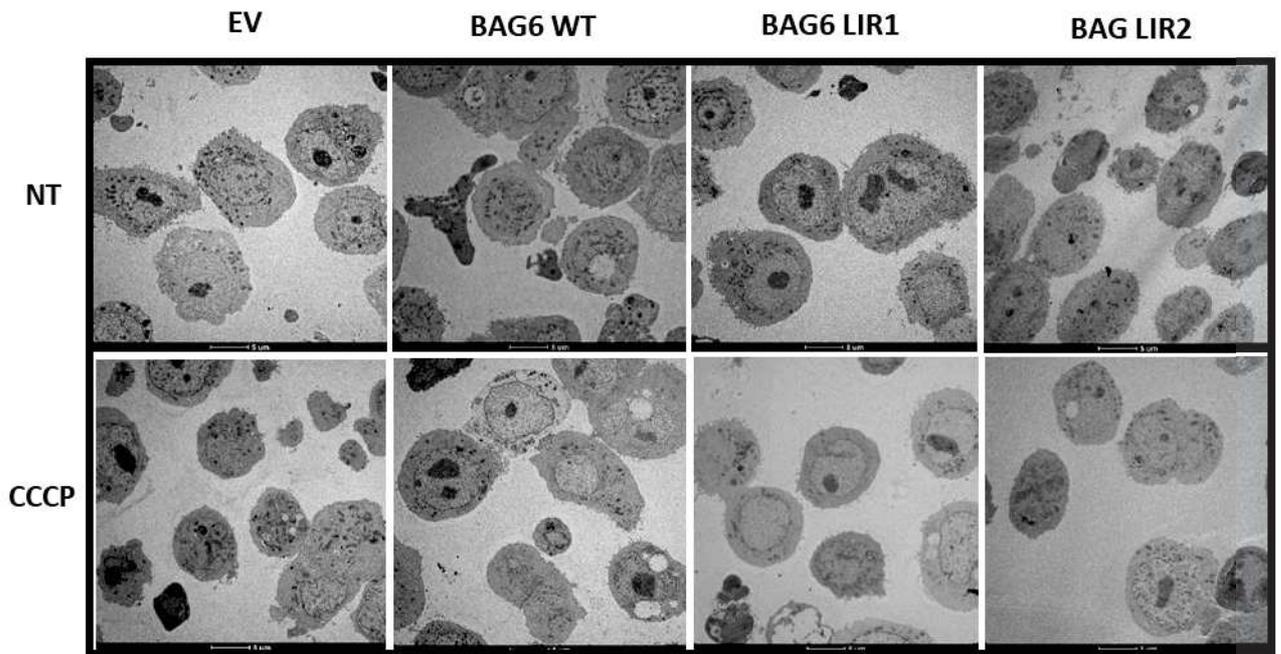
A



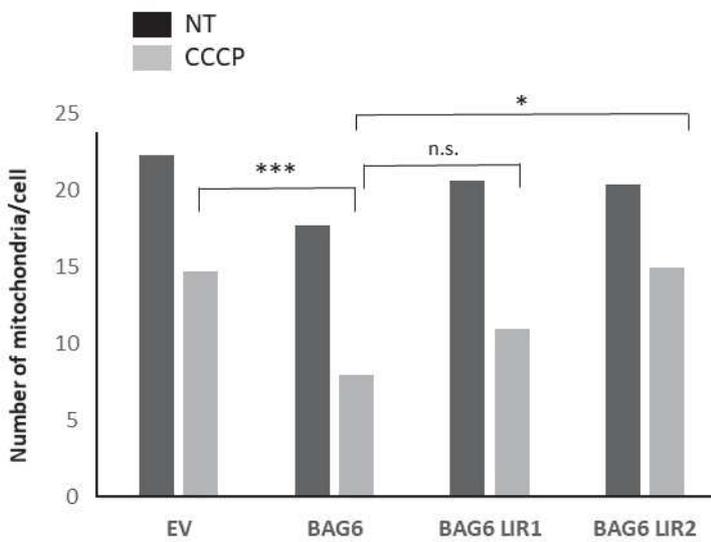
B



C



D



E



F

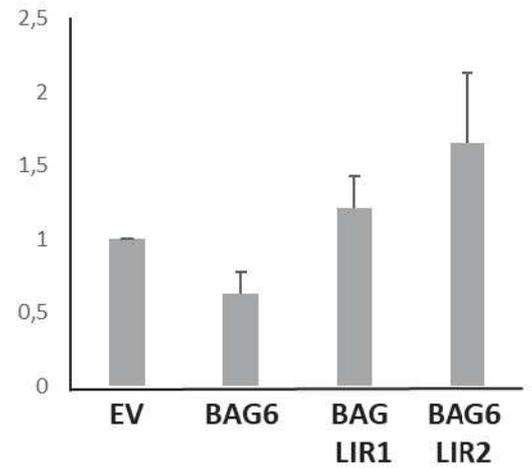
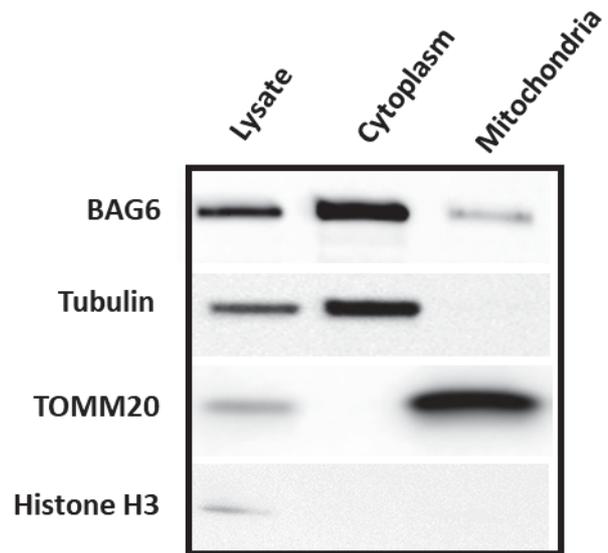
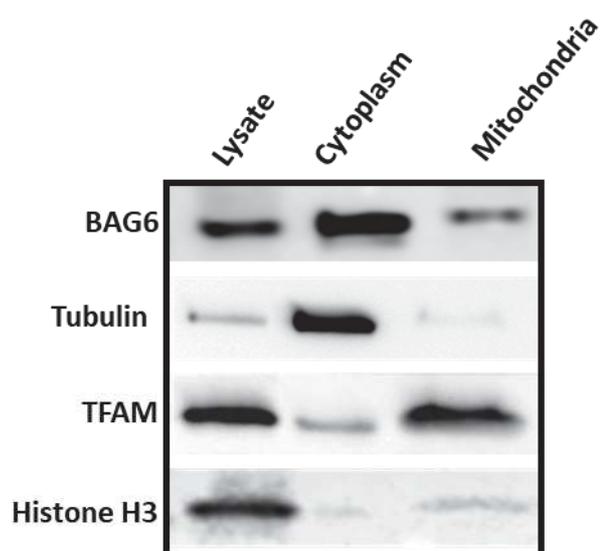


Figure S1

A HEK293T



B MEFs



Legends

Figure 1: BAG6 is localized in mitochondria in SW480 and BAG6-transfected LoVo cells.

(A) Cell fractions from SW480 colon cancer cells were immunoblotted with anti-BAG6, anti-tubulin (cytoplasmic marker) and anti-TOMM20 (mitochondrial marker) antibodies. Mito, mitochondrial fraction.

(B) SW480 cells were incubated with anti-TOMM20 (green) and anti-BAG6 (red) antibodies. Nuclei were stained with Hoechst. Images were acquired with a Zeiss AxioCam MRm digital camera and the Axiovision software. Size bar represents 10 μm .

(C) Mitochondria from SW480 cells cultured in complete medium were isolated and fractionated in the presence or absence of 0.25 μM PK, after or not swelling and incubation with 0.1% Triton X-100 for 30 min (as indicated). Immunoblotting was performed with anti-BAG6, anti-TOMM20 (OMM protein), anti-TIM23 (IMM protein), and anti-TFAM (mitochondrial matrix protein) antibodies.

(D) The indicated cell fractions from LoVo cells transfected with EV or BAG6 plasmids were immunoblotted with anti-BAG6, anti-calnexin (ER marker), and anti-tubulin (cytoplasm marker) antibodies.

(E) BAG6-transfected LoVo cells were incubated or not with 20 μM CCCP for 6h. Mitochondria were isolated and fractionated in the presence or absence of 0.25 μM PK, after or not swelling and incubation with 0.1% Triton X-100 for 30min, as indicated. Immunoblotting was performed by using anti-BAG6, anti-TOMM20 (OMM protein), anti-TIM23 (IMM protein), and anti-TFAM (mitochondrial matrix protein) antibodies.

Figure 2: BAG6 decreases the number of mitochondria in a chloroquine-dependent manner

(A) Representative ultrastructural images of EV- or and BAG6-transfected LoVo cells after incubation or not (NT) with 20 μM CCCP for 8h.

(B) The number of mitochondria per cell was quantified in 200 cells transfected with EV or PCI-BAG6 and incubated or not (NT) with 20 μM CCCP for 8h.

(C) Quantification of the fluorescence signal (MitoTrackerTM Red FM) in LoVo cells transfected with EV or BAG6 and incubated or not (NT) with 20 μM CCCP for 6h and with or without 40 μM CQ for 6h (Celigo Cytometer imager, Nexcelom).

(D) LoVo cells transfected with EV or BAG6 were incubated or not (NT) with 30 μ M CCCP and/or μ M CQ for 24h. Total protein extracts were immunoblotted with anti-BAG6, anti-TFAM, - and anti-GAPDH antibodies.

(E) Quantification of (D) using the ImageJ software.

Figure 3: BAG6 promotes mitochondrial fission.

(A) LoVo cells transfected with a BAG6 construct or EV were stained with the MitoTracker™ Red FM dye. Images were acquired with a Zeiss AxioCam MRm digital camera.

(B) 30 μ g of indicated cell fractions of LoVo cells transfected with EV or a BAG6 construct were immunoblotted with antibodies against DRP1, DRP1 phosphorylated (P) at S616, TFAM (mitochondrial marker), and tubulin (cytoplasmic marker).

(C) Quantification of (B) by using Image J software.

(D) Representative ultrastructural images of EV- and BAG6-transfected LoVo cells. Arrows indicate mitochondria. N, nucleus.

(E) Quantification of the size of 200 mitochondria using the ImageJ software (\square M). *** $P \leq 0.001$ vs. BAG6 versus EV transfected cells.

Fig.4: BAG6 induces the PINK1/PARKIN signaling pathway

(A) 30 μ g of indicated cell fractions of LoVo cells transfected with EV or BAG6 and incubated or not (NT) with 30 μ M CCCP for 8h were immunoblotted with anti-BAG6, anti-PINK1, anti-PARKIN, anti-TOMM20, anti-tubulin and anti-histone H3 antibodies.

(B) Quantification of the signal intensity of mitochondrial PINK1 in (A) using the Image J software.

(C) Quantification of the signal intensity of mitochondrial PARKIN in (A) using the Image J software.

(D) Cell lysates (L) and mitochondria (M) extracted from LoVo cells transfected with EV or a BAG6 plasmid and incubated or not (NT) with 30 μ M CCCP for 8h were immunoblotted with an anti-phospho-ubiquitin antibody. LC, loading control (Ponceau staining of the blot).

(E) Quantification of the signal intensity in (D) using the Image J software.

Fig.5: The LIR2 domain of BAG6 is responsible for its interaction with LC3 and for mitophagy induction

(A) Schematic representation of BAG6 sequence with the UBL domain and the two LIR domains with the mutations introduced by site-directed mutagenesis.

(B) Protein extracts from LoVo cells transfected with EV, WT BAG6, or mutant BAG6 (BAG6 LIR1 Y276A/V279A, or BAG6 LIR2W1018A/1021A) were immunoprecipitated with an anti-BAG6 antibody. Immunoprecipitated proteins were revealed with anti-LC3 and anti-BAG6 antibodies.

(C) Representative ultrastructural images of EV-, BAG6 WT-, BAG6 LIR1- and BAG6 LIR2- transfected LoVo cells incubated or not (NT) with 20 μ M CCCP.

(D) The number of mitochondria per cell was quantified in 200 cells from the different conditions.

(E) Protein extracts from LoVo cells transfected with EV, WT BAG6, or mutant BAG6 (BAG6 LIR1 Y276A/V279A, or BAG6 LIR2W1018A/1021A) treated with 30 μ M for 24 h were immunoblotted with anti-BAG6, anti-TFAM and anti-GAPDH antibodies.

(F) Quantification of (E) using the ImageJ software.

Legend Supplemental Figures

Figure S1: BAG6 is localized in mitochondria.

(A) The indicated cell fractions from HEK293T cells were immunoblotted with anti-BAG6, anti-tubulin (cytoplasmic marker), anti-TOMM20 (mitochondrial marker), and anti-histone H3 (nuclear marker) antibodies. **(B)** The indicated cell fractions from MEFs were immunoblotted with anti-BAG6, anti-tubulin (cytoplasmic marker), anti-TFAM (mitochondrial marker), and anti-histone H3 (nuclear marker) antibodies.

Discussion

In this work, we described a new function for the co-chaperone BAG6. Specifically, BAG6 is localized in mitochondria and regulates mitophagy by acting at different steps of this process. Indeed, when ectopically expressed in LoVo cells, BAG6 induced mitochondrial fragmentation, considered a prerequisite for mitochondrial engulfment into autophagosomes [27]. In these cells, BAG6 expression also led to a reduction of the mitochondrial mass in a chloroquine-dependent manner, indicating that BAG6 induces mitophagy. BAG6 also induced PINK1/PARKIN signaling after mitochondrial depolarization and the phosphorylation-ubiquitination of mitochondrial proteins, an “eat me signal” for mitophagy. Finally, the BAG6 sequence includes two LIR domains that are considered essential for the interaction with LC3 and the selective sequestration of mitochondria in autophagosomes [4]. Using site-directed mutagenesis, we found that LIR1 and LIR2 domains are essential for mitochondrial degradation even if the interaction between BAG6 LIR1 and LC3 is maintained. However, the LIR2 domain of BAG6 is required for both its interaction with LC3 and mitophagy induction suggesting that BAG6 is a new mitophagy receptor or adaptor. The mechanism by which the LIR1 domain of BAG6 modulates mitophagy requires additional studies.

Recent literature data also showed that BAG6 is important for the maintenance of mitochondrial physiology. Indeed, in the absence of DRP1 (i.e. in conditions that favor mitochondrial fusion), BAG6 allows the degradation of MNF2, probably to suppress fusion events [18]. It would be interesting to determine the role of BAG6-mediated proteasomal degradation of MNF2 in mitophagy, especially because OMM proteasomal degradation is an early event in mitophagy [8,24].

It is also established that BAG6 is important for the cytoplasmic redistribution of damaged mitochondria in a PARKIN-dependent manner [19]. Interestingly, other BAG family members are also involved in PINK1/PARKIN signaling and mitochondrial quality control. BAG2 stabilizes PINK1 by decreasing its ubiquitination and allowing mitophagy induction [28,29]. BAG3, also known for its role in autophagy, maintains mitochondrial homeostasis by increasing PARKIN expression level [30]. Conversely, BAG5 impairs mitophagy by inhibiting PARKIN recruitment and favoring apoptosis [31]. BAG5 role in mitophagy is controversial because another study reported that the interaction between BAG5 and PINK1 decreases PINK1 ubiquitination and degradation [32]. These data

indicate that the co-chaperones of the BAG family are involved in mitochondrial homeostasis, but the underlying mechanisms remain largely unknown. However, it appears that BAG2, BAG5 and BAG6 (this works) all stabilizes PINK1, suggesting a common mechanism.

To better understand how BAG6 affects mitophagy, the role of BAG6 intracellular localization needs to be better studied. Here, we showed that BAG6 is localized at the mitochondrial matrix in basal conditions, but relocates to the OMM after CCCP treatment. This relocation is compatible with the proposed BAG6 receptor function through its LIR2 domain. Similarly, the mitophagy receptor cardiolipin relocates from the IMM to the OMM after mitophagy induction [33]. However, on the basis of our results, we cannot exclude that BAG6 acts as an adaptor rather than a receptor and that its cytoplasmic form is recruited to the OMM after mitochondrial depolarization. However, its direct interaction with mitochondrial proteins seems improbable because BAG6 does not harbor a UBA or a UBD domain involved in the recognition of ubiquitylated mitochondrial proteins and essential for the adaptor function.

Another important question is how BAG6 is targeted to mitochondria. Indeed, the import of most mitochondrial proteins requires a pre-protein translocase at the outer mitochondrial membrane that cleaves the target protein after its translocation in the TOMM20 complex [34]. However, BAG6 has no mitochondrial targeting sequence. We cannot exclude that BAG6 might interact with a cytoplasmic co-factor responsible for its transport to the TOMM20 complex. Indeed, yeast two hybrid screening using TOMM20 as bait showed that BAG6 interacts with TOMM20 [35].

Our previous and current findings demonstrated the importance of BAG6 intracellular localization. In basal conditions, BAG6 maintains a pool of EP300 in the cytoplasm, leading to acetylation of ATG5, ATG7, ATG12 and LC3, thus inhibiting autophagy. After starvation, BAG6 induces the nuclear localization of EP300, decreasing ATG protein acetylation, but allowing TP53 acetylation and the expression of the pro-autophagic protein SESTRIN1 [17]. Here, we showed that mitochondrial BAG6 has a role in regulating mitochondrial structure and degradation. As mitophagy is inhibited during starvation [36] to limit mitochondrial degradation and prevent ATP deficiency, BAG6 role in the regulation of the links between autophagy and mitophagy should be investigated in the future.

To conclude, our work highlights new activities of BAG6 in regulating the mitochondrial structure and in mitophagy induction. As BAG6 is abnormally distributed during colon cancer ([37] and our unpublished data), it is important to determine the role of its intracellular localization and the consequences on both autophagy and mitophagy in physiological and pathological conditions.

Materials and Methods

Cells, plasmids, and reagents

MEFs were obtained and cultured as previously described [38].

LoVo cells, isolated from a left supraclavicular metastasis of colon cancer, were cultured in Roswell Park Memorial Institute medium supplemented with 10% FCS (NT), and SW480 cells were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% fetal calf serum (NT).

CQ (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) was used at 40 μ M for 6h or 24h depending on the experiment (see legends). CCCP (Abcam, Cambridge, UK) was used at 30 μ M for the indicated time (see figures) depending on the experiment. Indeed, the measurement of the degradation of mitochondrial markers by western blot required a 24h treatment.

LoVo cells were transfected with Lipofectamine 2000 according to the manufacturer's instructions (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

Plasmids

Plasmids encoding WT and mutant BAG6 variants were obtained as previously described (Sebti et al., 2014b). The PCI-BAG6 WT plasmid was used for site-directed mutagenesis of the LIR domains using the Phusion Site-Directed Mutagenesis Kit (ThermoFisher) and the following primers: BAG6 LIR1 Forward: 5' CCT TCC CCT GCG GAG GCT GTC GAG GCG CTC CAG GAG CTA CAG C 3' and BAG6 LIR1 Reverse: 5' GCT GTA GCT CCT GGA GCG CCT CGA CAG CCT CCG CAG GGG AAG G 3'; BAG6 LIR2 Forward: 5' GCA GCT GCA GTC CCC CCA GAA GCG GTC CCT GCT ATC CAG CAG GAC ATT C 3', and BAG6 LIR2 Reverse: 5' GAA TGT CCT GCT GGA TAG CAG GGA CCG CTT CTG GGG GGA CTG CAG CTG C 3'.

Mitochondrial and cytoplasmic fraction isolation

The protocol for isolation of mitochondrial and cytoplasmic cell fractions was adapted from that described by Christian Frezza, et al. [39]. Briefly, cells were resuspended in mitochondrial isolation buffer (0.2M sucrose, 0.1mM TRIS/MOPS, 10 μ M EGTA/Tris) and disrupted with a dounce homogenizer, followed by centrifugation at 600 g at 4°C for 10min to discard nuclei and cell debris. The resulting pellets contained nuclei, whereas supernatants were centrifuged again at 7000 g at 4°C for 10min. Pellets contained the crude mitochondrial-enriched fractions, whereas supernatants contained the cytoplasmic/microsomal fractions. For experiments using cytoplasmic and crude mitochondrial fractions, equal amounts of proteins (quantified with the BCA Kit, Thermo Fisher Scientific) were analyzed by western blotting and probed with the indicated antibodies.

Proteinase K assay – Sub-mitochondrial localization

After mitochondrial isolation, mitochondria were incubated with 2.5 μ g/ml of PK for 10min after, or not, swelling in 10mM HEPES-KOH pH 7.4 that contained 1mM EDTA. PK digestion of mitochondrial proteins was stopped with 1mM PMSF. When indicated, 0.5% (v/v) Triton X-100 was added before PK treatment. Samples were precipitated by addition of trichloroacetic acid and analyzed by SDS–PAGE and immunoblotting using antibodies against mitochondrial markers as controls.

Fluorescence imaging

SW480 cells were fixed in Paraformaldehyde 1% for 10 min and then permeabilized in 0.1% Triton X-100 (room temperature, 30 min), then incubated in 5% BSA (37°C, 1h), and stained with an anti-mouse TOMM20 (Santa Cruz sc-17764, 1/100) and anti-BAG6 antibody (rabbit polyclonal, 26417-1-AP, Proteintech, 1/100). Nuclei were stained with 5 μ g/ml Hoechst dye (#33342 ThermoFisherScientific) at 37°C for 1h. Goat anti-rabbit Alexa Fluor 568 (red) (#A-11011, 1/1000; ThermoFisherScientific, Waltham, MA, USA) and goat anti-mouse Alexa Fluor 488 (green) (#A-11029, 1/1000; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) (diluted in 5% BSA) were added for 1h to detect BAG6 and TOMM20, respectively. Images were acquired with a Zeiss AxioCam MRm digital camera and analyzed with the Axiovision software.

Mitochondrial mass was measured by co-staining LoVo cells with the MitoTracker™ Red FM dye (20 μ M) and DAPI for 1h. When required, cells were incubated with 40 μ M

chloroquine for 6h. The intensity of the red fluorescence per cell was quantified with a Celigo Imaging cytometer (Nexcelom).

Immunoprecipitation

To immunoprecipitate WT or mutant (LIR1 and LIR2) BAG6, cells were lysed in lysis buffer [50mM Hepes pH 7.5, 150mM NaCl, 1.5mM MgCl₂, 100mM NaF, 10mM NaPPi, 1mM EDTA, 10% glycerol, 1% Triton X-100, and protease inhibitors) (Complete, Roche Applied Science, Indianapolis, IN, USA] at 4°C for 1h, and then overnight immunoprecipitation was performed at 4°C with a rabbit polyclonal anti-BAG6 antibody (1:2000; [38]). Protein A Sepharose beads (Amersham Biosciences, GE Healthcare, Waukesha, WI, USA) were added at 4°C for 2h and then washed three times with washing buffer (50mM Hepes pH 7.5, 150mM NaCl, 1mM EDTA, 10% glycerol and 1% Triton X-100). Immunoprecipitated proteins were separated on SDS-PAGE, and BAG6 and LC3 were detected by immunoblotting.

Western blotting

Western blotting was performed with antibodies against PINK1 (1:1000; #BC100-494, Novus Biotechnologies), LC3 (1:5000, #L7543; Sigma-Aldrich Aldrich, St Louis, MO, USA), TFAM (#8076), DRP-1 (#8570), DRP-1 phosphorylated at S616 (#4494), PARKIN (#2132), GAPDH (14C10, #2118), histone H3 (D1H2, #4499) and phosphorylated-ubiquitinated proteins on S65 (#37642) (all 1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA), TOMM20 (1:1000, #sc-17764; Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA, USA), TIM23 (1:1000; #611223) and calnexin (#610523) from BD Biosciences, and tubulin (1:1000; #62204, Pierce, Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA), For all figures, the anti-BAG6 antibody was Santa Cruz (1:2000; #sc-365928) except for Fig 2D and Fig 4A (SDIX, #3023.00.02 (1:1000)). Similarly, the anti-TOMM20 antibody was #sc-17764 from Santa Cruz Biotechnology (1:1000) for all figures, but for Fig. 4A (#sc-11415, 1:500).

Images were acquired with the GBOX imaging system (Syngene, Cambridge, USA) and the GeneSys software that allows the acquisition during the linear phase, avoiding saturation.

Transmission Electron Microscopy

Cells were immersed in a solution of 2.5% glutaraldehyde in Sorensen's buffer (0.1M, pH 7.4) overnight at 4 °C. After a rinse in Sorensen's buffer, cells were postfixed in a 0.5% osmic acid for 2 h in the dark at room temperature. After two rinses in Sorensen's buffer, the cells were dehydrated in a graded series of ethanol solutions (30–100%). The cells were embedded in EMbed 812 using a Leica EM AMW automated microwave tissue processor for electron microscopy. Thin sections (70 nm, obtained with a Leica-Reichert Ultracut E microtome) were collected at different levels of each block. These sections were counterstained with uranyl acetate and observed with a Hitachi 7100 transmission electron microscope at the Centre de Ressources en Imagerie Cellulaire de Montpellier, Montpellier, France.

Statistical analysis

Data were analyzed using the Student's *t*-test. P values <0.001, 0.01, and 0.05 versus controls were considered significant and were noted as ***, **, and *, respectively. All results were reported as the mean ± standard deviation (SD), with error bars to show the SD.

Acknowledgements

We thank the Centre de Ressources en Imagerie Cellulaire and C. Cazevieille, for her technical assistance with ultrastructural data. We thank Patrice Codogno (INEM, Paris, France) for helpful discussions. We are also grateful to Claude Sardet and Andrei Turtoi for their support during the redaction of the manuscript.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the authors.

Funding

This work is supported by the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale, by the ARC fondation (S.P.), La Ligue Régionale contre Le Cancer (Comité de l'Hérault; S.P.). Dr Leila. El Kebriti is a recipient of a Nimes University Hospital graduate program fellowship

References

1. Gomes LC, Scorrano L (2013) Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy. *Biochim Biophys Acta* **1833**: 205–212.
2. Morita M, Prudent J, Basu K, Goyon V, Katsumura S, Hulea L, Pearl D, Siddiqui N, Strack S, McGuirk S, et al. (2017) mTOR Controls Mitochondrial Dynamics and Cell Survival via MTFP1. *Mol Cell* **67**: 922-935.e5.
3. Rambold AS, Lippincott-Schwartz J (2011) Mechanisms of mitochondria and autophagy crosstalk. *Cell Cycle* **10**: 4032–4038.
4. Kalvari I, Tsompanis S, Mulakkal NC, Osgood R, Johansen T, Nezis IP, Promponas VJ (2014) iLIR: A web resource for prediction of Atg8-family interacting proteins. *Autophagy* **10**: 913–925.
5. Novak I, Kirkin V, McEwan DG, Zhang J, Wild P, Rozenknop A, Rogov V, Löhr F, Popovic D, Occhipinti A, et al. (2010) Nix is a selective autophagy receptor for mitochondrial clearance. *EMBO Rep* **11**: 45–51.
6. Hanna RA, Quinsay MN, Orogo AM, Giang K, Rikka S, Gustafsson ÅB (2012) Microtubule-associated Protein 1 Light Chain 3 (LC3) Interacts with Bnip3 Protein

- to Selectively Remove Endoplasmic Reticulum and Mitochondria via Autophagy. *J Biol Chem* **287**: 19094–19104.
7. Murakawa T, Yamaguchi O, Hashimoto A, Hikoso S, Takeda T, Oka T, Yasui H, Ueda H, Akazawa Y, Nakayama H, et al. (2015) Bcl-2-like protein 13 is a mammalian Atg32 homologue that mediates mitophagy and mitochondrial fragmentation. *Nat Commun* **6**: 7527.
 8. Wei Y, Chiang W-C, Sumpter R, Mishra P, Levine B (2017) Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell* **168**: 224-238.e10.
 9. Bhujabal Z, Birgisdottir AB, Sjøttem E, Brenne HB, Øvervatn A, Habisov S, Kirkin V, Lamark T, Johansen T (2017) FKBP8 recruits LC3A to mediate Parkin-independent mitophagy. *EMBO reports* **18**: 947–961.
 10. Okamoto K, Kondo-Okamoto N, Ohsumi Y (2009) Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell* **17**: 87–97.
 11. Montava-Garriga L, Ganley IG (2019) Outstanding Questions in Mitophagy: What We Do and Do Not Know. *J Mol Biol*.
 12. Kazlauskaitė A, Kondapalli C, Gourlay R, Campbell DG, Ritorto MS, Hofmann K, Alessi DR, Knebel A, Trost M, Muqit MMK (2014) Parkin is activated by PINK1-dependent phosphorylation of ubiquitin at Ser65. *Biochem J* **460**: 127–139.
 13. Koyano F, Okatsu K, Kosako H, Tamura Y, Go E, Kimura M, Kimura Y, Tsuchiya H, Yoshihara H, Hirokawa T, et al. (2014) Ubiquitin is phosphorylated by PINK1 to activate parkin. *Nature* **510**: 162–166.
 14. Kawahara H, Minami R, Yokota N (2013) BAG6/BAT3: emerging roles in quality control for nascent polypeptides. *J Biochem* **153**: 147–160.
 15. Lee J-G, Ye Y (2013) Bag6/Bat3/Scythe: a novel chaperone activity with diverse regulatory functions in protein biogenesis and degradation. *Bioessays* **35**: 377–385.
 16. Sebti S, Prébois C, Pérez-Gracia E, Bauvy C, Desmots F, Gongora C, Pirot N, Bach A-S, Hubberstey A, Palissot V, et al. (2014) BAG6/BAT3 modulates autophagy by affecting EP300/p300 intracellular localization. *Autophagy* **10**: 0--1.
 17. Sebti S, Prébois C, Pérez-Gracia E, Bauvy C, Desmots F, Pirot N, Gongora C, Bach A-S, Hubberstey AV, Palissot V, et al. (2014) BAT3 modulates p300-dependent acetylation of p53 and autophagy-related protein 7 (ATG7) during autophagy. *Proc Natl Acad Sci USA* **111**: 4115–4120.

18. Saita S, Ishihara T, Maeda M, Iemura S-I, Natsume T, Mihara K, Ishihara N (2016) Distinct types of protease systems are involved in homeostasis regulation of mitochondrial morphology via balanced fusion and fission. *Genes Cells* **21**: 408–424.
19. Hayashishita M, Kawahara H, Yokota N (2019) BAG6 deficiency induces mis-distribution of mitochondrial clusters under depolarization. *FEBS Open Bio* **9**: 1281–1291.
20. Wai T, Saita S, Nolte H, Müller S, König T, Richter-Dennerlein R, Sprenger H-G, Madrenas J, Mühlmeister M, Brandt U, et al. (2016) The membrane scaffold SLP2 anchors a proteolytic hub in mitochondria containing PARL and the i-AAA protease YME1L. *EMBO Rep* **17**: 1844–1856.
21. Claessen JHL, Ploegh HL (2011) BAT3 guides misfolded glycoproteins out of the endoplasmic reticulum. *PLoS ONE* **6**: e28542.
22. Mauthe M, Orhon I, Rocchi C, Zhou X, Luhr M, Hijlkema K-J, Coppes RP, Engedal N, Mari M, Reggiori F (2018) Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy* **14**: 1435–1455.
23. Klionsky DJ, Abdelmohsen K, Abe A, Abedin MJ, Abeliovich H, Acevedo Arozena A, Adachi H, Adams CM, Adams PD, Adeli K, et al. (2016) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy (3rd edition). *Autophagy* **12**: 1–222.
24. Yoshii SR, Kishi C, Ishihara N, Mizushima N (2011) Parkin mediates proteasome-dependent protein degradation and rupture of the outer mitochondrial membrane. *J Biol Chem* **286**: 19630–19640.
25. Liu L, Feng D, Chen G, Chen M, Zheng Q, Song P, Ma Q, Zhu C, Wang R, Qi W, et al. (2012) Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol* **14**: 177–185.
26. Zhu Y, Massen S, Terenzio M, Lang V, Chen-Lindner S, Eils R, Novak I, Dikic I, Hamacher-Brady A, Brady NR (2013) Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis. *J Biol Chem* **288**: 1099–1113.
27. Twig G, Elorza A, Molina AJA, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, et al. (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* **27**: 433–446.

28. Che X, Tang B, Wang X, Chen D, Yan X, Jiang H, Shen L, Xu Q, Wang G, Guo J (2013) The BAG2 protein stabilises PINK1 by decreasing its ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun* **441**: 488–492.
29. Qu D, Hage A, Don-Carolis K, Huang E, Joselin A, Safarpour F, Marcogliese PC, Rousseaux MWC, Hewitt SJ, Huang T, et al. (2015) BAG2 Gene-mediated Regulation of PINK1 Protein Is Critical for Mitochondrial Translocation of PARKIN and Neuronal Survival. *J Biol Chem* **290**: 30441–30452.
30. Tahir FG, Knezevic T, Gupta MK, Gordon J, Cheung JY, Feldman AM, Khalili K (2017) Evidence for the Role of BAG3 in Mitochondrial Quality Control in Cardiomyocytes. *J Cell Physiol* **232**: 797–805.
31. De Snoo ML, Friesen EL, Zhang YT, Earnshaw R, Dorval G, Kapadia M, O'Hara DM, Agapova V, Chau H, Pellerito O, et al. (2019) Bcl-2-associated athanogene 5 (BAG5) regulates Parkin-dependent mitophagy and cell death. *Cell Death Dis* **10**: 907.
32. Wang X, Guo J, Fei E, Mu Y, He S, Che X, Tan J, Xia K, Zhang Z, Wang G, et al. (2014) BAG5 protects against mitochondrial oxidative damage through regulating PINK1 degradation. *PLoS ONE* **9**: e86276.
33. Chu CT, Ji J, Dagda RK, Jiang JF, Tyurina YY, Kapralov AA, Tyurin VA, Yanamala N, Shrivastava IH, Mohammadyani D, et al. (2013) Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol* **15**: 1197–1205.
34. Harbauer AB, Zahedi RP, Sickmann A, Pfanner N, Meisinger C (2014) The protein import machinery of mitochondria—a regulatory hub in metabolism, stress, and disease. *Cell Metab* **19**: 357–372.
35. Stelzl U, Worm U, Lalowski M, Haenig C, Brembeck FH, Goehler H, Stroedicke M, Zenkner M, Schoenherr A, Koeppen S, et al. (2005) A human protein-protein interaction network: a resource for annotating the proteome. *Cell* **122**: 957–968.
36. Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L (2011) During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol* **13**: 589–598.
37. Wu W, Song W, Li S, Ouyang S, Fok KL, Diao R, Miao S, Chan HC, Wang L (2012) Regulation of apoptosis by Bat3-enhanced YWK-II/APLP2 protein stability. *J Cell Sci* **125**: 4219–4229.

38. Desmots F, Russell HR, Lee Y, Boyd K, McKinnon PJ (2005) The reaper-binding protein scythe modulates apoptosis and proliferation during mammalian development. *Mol Cell Biol* **25**: 10329–10337.
39. Frezza C, Cipolat S, Scorrano L (2007) Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat Protoc* **2**: 287–295.

DISCUSSION

La protéine BAG6, également nommée BAT3 ou Scythe, est une co-chaperonne conservée au cours de l'évolution impliquée dans des processus cellulaires variés tels que l'apoptose, le contrôle qualité des protéines cytoplasmiques, l'épigénétique, le cycle cellulaire ou encore la régulation de l'autophagie. Cette étude est la première à mettre en avant l'implication de BAG6 dans la mitophagie.

Nous avons d'abord observé qu'une fraction de la protéine BAG6 est située au niveau de la mitochondrie. Plus précisément, BAG6 est localisée en conditions basales dans la matrice mitochondriale puis se délocalise dans la membrane externe après dépolarisation par le CCCP. Cette translocation intramitochondriale est similaire à celle effectuée par les régulateurs de la mitophagie que sont les protéines NIPSNAPs. Ces protéines sont localisées dans la matrice en conditions basales et se délocalisent à la surface de la mitochondrie après dépolarisation afin de recruter les récepteurs cytosoliques de la mitophagie (134). Tout comme les NIPSNAPs, BAG6 promeut le recrutement d'éléments cytosoliques essentiels au déroulement de la mitophagie. Cependant, contrairement aux NIPSNAPs, BAG6 ne possède pas de domaine MTS (Mitochondrial Targeting Sequence) et le processus par lequel BAG6 pénètre dans la mitochondrie reste à déterminer. Sur la base de nos résultats, nous ne pouvons pas non plus exclure que ce soit la fraction cytosolique de BAG6 qui soit recrutée à la membrane externe après dépolarisation mitochondriale. Néanmoins, son interaction avec les protéines mitochondriales poly-ubiquitinylées semble improbable car BAG6 ne possède pas de domaine de liaison à l'ubiquitine.

En premier lieu, BAG6 favorise le recrutement mitochondrial du complexe de fission DRP1 sous forme activée par phosphorylation (S616-phospho-DRP1). En conséquence, le réseau mitochondrial apparaît fragmenté en microscopie à fluorescence et la taille moyenne des mitochondries est plus petite en microscopie électronique. Le recrutement de DRP1 pourrait se faire de façon directe par interaction avec BAG6 (mais nous n'avons pas mis en évidence cette interaction) ou bien de façon indirecte en régulant l'activation de DRP1 par phosphorylation. Justement, la CDK1 phosphoryle DRP1 durant la mitose (100), permettant son activation et la fragmentation du réseau mitochondrial. La CDK1 est inhibée par P21^{Cip}, dont la dégradation est favorisée par BAG6 durant la phase G1 du cycle cellulaire (196). BAG6 pourrait donc induire la phosphorylation de DRP1 et la fission mitochondriale en levant l'inhibition exercée par P21^{Cip} sur la CDK1. La structure du réseau mitochondrial reposant sur un équilibre en fusion et fission, il faut également prendre en considération l'effet de BAG6 sur la fusion mitochondriale. Nous savons déjà que BAG6 provoque la dégradation des mitofusines (MFN1 et MFN2) par le protéasome (203), renforçant l'idée que BAG6 exerce un effet fissiogène sur les mitochondries. L'OMMAD étant une étape essentielle de la mitophagie, il serait intéressant de déterminer si la dégradation des mitofusines induite par BAG6 est nécessaire au déroulement de la mitophagie car seules les plus petites mitochondries peuvent être séquestrées dans l'autophagosome (voir « Introduction » page 34).

Puisque la fission mitochondriale est un pré-requis à la mitophagie et que BAG6 a déjà été caractérisé comme régulateur de l'autophagie, nous nous sommes intéressés au rôle de BAG6 sur la mitophagie. Comme la mitophagie implique la diminution du nombre de mitochondries par cellule, nous avons cherché à savoir si BAG6 avait un effet sur la masse mitochondriale. Nous avons activé la mitophagie par CCCP et observé l'effet de BAG6 sur différents marqueurs de masse mitochondriale. En microscopie électronique, BAG6 réduit le nombre de mitochondries par cellule ; en cytométrie, BAG6 réduit la fluorescence des cellules marquées par des sondes spécifiques des mitochondries (Mitotracker) ; par Western-Blot, BAG6 diminue l'expression de la protéine mitochondriale TFAM. Dans chacune de ses expériences, l'effet de BAG6 est neutralisé par la chloroquine (un inhibiteur de la fusion entre autophagosome et lysosome) ce qui indique que son mécanisme d'action dépend de l'autophagie et donc que BAG6 est un régulateur de la mitophagie.

De manière intéressante, tous les autres membres de la famille BAG sont également impliqués dans l'autophagie. BAG1 interagit avec LC3 et active l'autophagie (par des mécanismes indéterminés) ce qui confère aux cardiomyocytes une résistance aux lésions d'ischémie / reperfusion (204). BAG3 est impliquée dans l'agrégation : elle permet le regroupement des protéines mal conformées en agrésomes puis leur séquestration dans l'autophagosome en formant un complexe multimérique impliquant les protéines HSP70, HSPB8 (heat shock protein beta 8), CHIP (C terminus of HSC70-interacting protein) et P62 (205). Plus spécifiquement, certaines protéines BAGs interviennent dans la mitophagie. BAG2 et BAG5 interagissent avec PINK1 et la stabilise en inhibant sa dégradation par l'UPS (206–208). En conséquence, BAG2 favorise le recrutement mitochondrial de PARKIN et possède un rôle pro-mitophagique. Le rôle de BAG5 est plus controversé car une étude rapporte qu'il inhibe la mitophagie en prévenant la translocation mitochondriale de PARKIN en réponse au CCCP (209). Enfin, BAG3 et BAG4 inhibent le recrutement de PARKIN (210,211). Paradoxalement BAG3 stimule la mitophagie dans les cardiomyocytes ce qui souligne la complexité de la régulation de ce processus (210).

Par analogie avec les autres protéines BAGs, nous avons étudié le rôle de BAG6 sur la voie de signalisation PINK1-PARKIN afin d'expliquer son effet pro-mitophagique. Dans les mitochondries dépolarisées par le CCCP, BAG6 augmente l'expression de PINK1 et PARKIN. En conséquence, la S65-phospho-ubiquitylation des protéines mitochondriales, modification post-traductionnelle activatrice de la mitophagie, est plus importante. BAG6 est donc impliquée dans la mitophagie dépendante de l'ubiquitylation des protéines mitochondriales. Comme c'est le cas pour BAG2 et BAG5, nous avons recherché une interaction entre BAG6 et PINK1. En effet, il est bien établi que la kinase PINK1, détecteur de la dépolarisation mitochondriale, contribue au recrutement mitochondrial de PARKIN par phosphorylation (114). En travaillant sur les formes endogènes de ces deux protéines, nous n'avons pas mis en évidence d'interaction par co-immunoprécipitation. Cependant, en surexprimant des formes étiquetées (BAG6-V5 et PINK1-GFP), Verma et al. ont très récemment démontré cette

interaction dans une lignée de neuroblastome (212). De manière surprenante, BAG6 favorise la dégradation de PINK1 dans ce modèle et accroît la toxicité du MPP+ (un neurotoxique mitochondrial), ce qui contraste avec nos observations. M. Hayashishita et al. ont montré que BAG6 contribue au rassemblement péri-nucléaire des mitochondries après leur dépolarisation induite par le CCCP mais qu'il n'affecte pas le recrutement mitochondrial de PARKIN (202). Ce résultat diffère des effets observés dans les cellules LoVo. Il pourrait s'expliquer par le fait que les auteurs ont surexprimé PARKIN dans des cellules HeLa (exprimant peu PARKIN à l'état basal), alors que nous avons observé, dans un modèle plus physiologique, une translocation de la forme endogène de PARKIN en présence de BAG6.

Il reste donc à préciser les mécanismes moléculaires impliqués dans l'activation de la voie PINK1-PARKIN dans la lignée LoVo. Le fonctionnement de BAG6 étant dépendant de ses interactants (comme c'est le cas pour la régulation de l'apoptose), il serait pertinent de les cribler dans ce modèle par une méthode associant immunoprécipitation et spectrométrie de masse (en condition basale et d'induction mitophagique). Pour l'heure, nous émettons l'hypothèse qu'il puisse favoriser le recrutement de PINK1 et de PARKIN par l'intermédiaire de modifications post-traductionnelles. Nous savons que durant la carence nutritionnelle, BAG6 induit la translocation nucléaire d'EP300, diminuant l'acétylation des protéines ATGs et permettant l'expression de gènes tels que *SESTRIN1* conduisant à une activation globale de l'autophagie (198). Au contraire la mitophagie est inhibée en situation carentielle afin de maintenir la production d'ATP (104,105). Il existe donc un découplage entre régulation de l'autophagie et de la mitophagie. Nos données non publiées montrent qu'une fraction d'EP300 est localisée dans la mitochondrie. Il serait donc intéressant d'étudier la façon dont le couple BAG6 / EP300 régule l'acétylation et l'expression de PINK1 et de PARKIN, en présence ou en l'absence de nutriments, notamment parce que la désacétylation de ces protéines par SIRT3 a déjà été décrite comme un événement activateur de la mitophagie (213). Une comparaison des acétylomes cytosoliques et mitochondriaux et présence ou en l'absence de BAG6 permettrait de répondre à cette question.

Enfin, comme BAG6 est une protéine mitochondriale intervenant dans la régulation de la mitophagie, dont nous savons qu'elle repose sur la mise en jeu de récepteurs spécifiques, il est pour nous essentiel de déterminer si BAG6 possède également les caractéristiques d'un récepteur de la mitophagie. En étudiant sa séquence protéique nous avons identifié qu'elle contient deux domaines LIR (notés LIR1 et LIR2), nécessaires pour l'interaction avec LC3 et la séquestration des mitochondries dans l'autophagosome. Par mutagenèse dirigée puis co-immunoprécipitation nous avons observé que BAG6 interagit avec LC3 par son domaine LIR2 et que son effet pro-mitophagique dépend de cette interaction. Ces résultats suggèrent donc que BAG6 est un nouveau récepteur de la mitophagie. Cependant, les deux domaines LIR1 et LIR2 sont essentiels pour la mitophagie et le mécanisme par lequel le domaine LIR1 de BAG6 module la mitophagie, nécessite des études supplémentaires.

Considérant l'ensemble des résultats que nous avons présenté dans ce mémoire, nous proposons un modèle de fonctionnement de BAG6 en tant que régulateur de la mitophagie résumé dans le schéma ci-dessous (Figure 27).

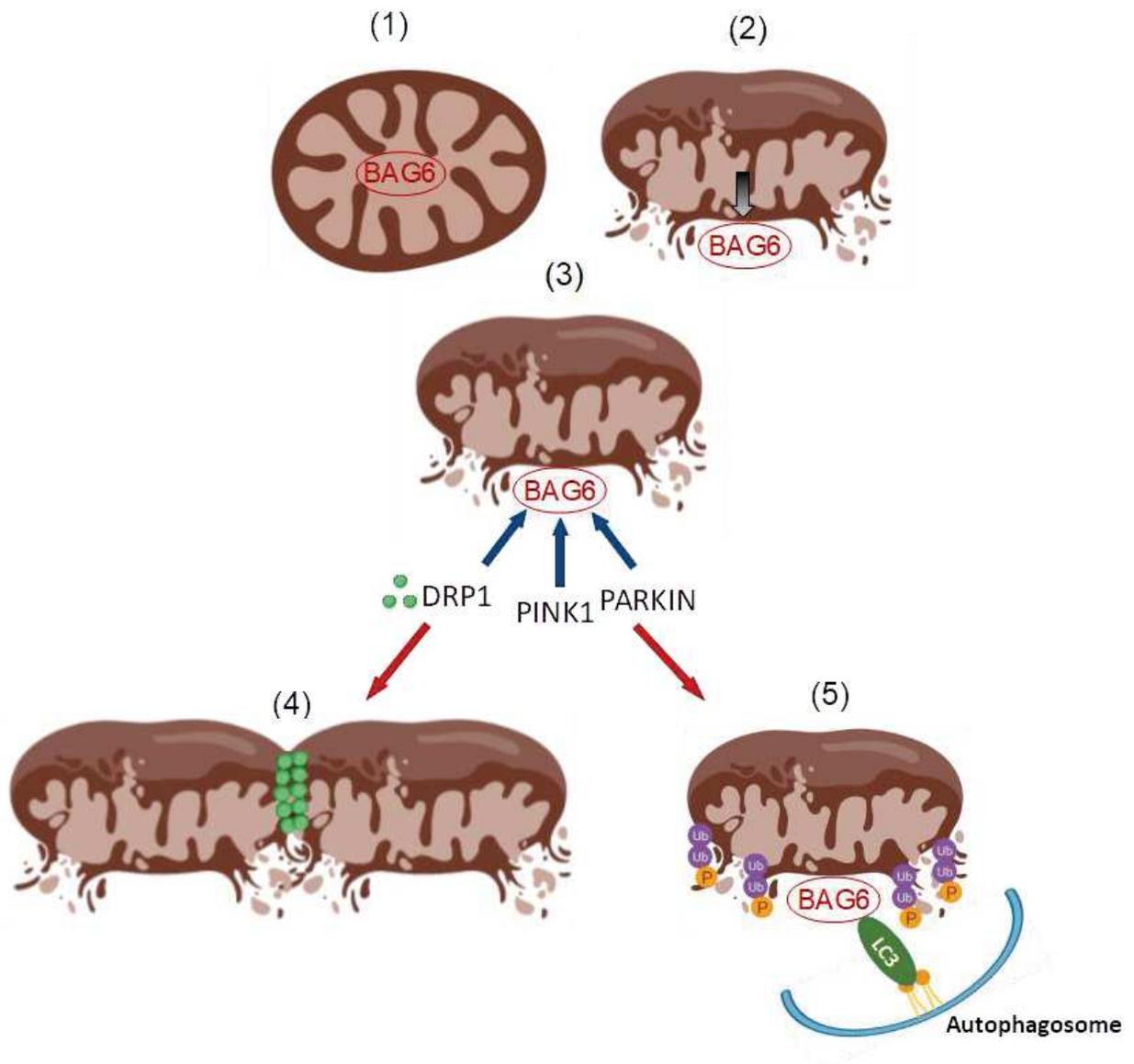


Figure 27. La co-chaperonne BAG6 est un régulateur de la mitophagie. (1) En conditions basales (mitochondries saine), BAG6 est localisé dans la matrice mitochondriale. (2) Lorsque les mitochondries sont endommagées, BAG6 transloque de la matrice vers la membrane externe de la mitochondrie. (3) BAG6 favorise le recrutement du complexe de fission DRP1 et des protéines PINK1 et PARKIN. (4) DRP1 forme un anneau de constriction autour des mitochondries endommagées afin de les fissionner ce qui réduit leur taille afin qu'elles puissent être séquestrées dans l'autophagosome. (5) PINK1 et PARKIN sont responsables de la S65-phospho-ubiquitinylation des protéines de la membrane externe mitochondriale ce qui permet l'OMMAD, la mise en jeu des récepteurs de la membrane interne et le recrutement des récepteurs cytosoliques de la mitophagie. Finalement BAG6 interagit avec LC3-II, en tant que récepteur de la membrane externe.

Au-delà des ces aspects fondamentaux, il est important de considérer le rôle de BAG6 sur le plan physiopathologique. Chez l'Homme, BAG6 est principalement impliquée dans diverses maladies inflammatoires et dans le cancer.

Plusieurs variants génétiques de *BAG6* ont été associé au risque de développer le diabète de type 1 (auto-immun), la polyarthrite rhumatoïde, le syndrome de Kawasaki (vascularite) ou encore la sclérose en plaque (214–216). BAG6 possède un effet pro-inflammatoire en activant les lymphocytes T4 par interaction avec le récepteur membranaire TIM3 (T-cell immunoglobulin and mucin domain 3) ce qui lève l'inhibition de GAL9 (galectine 9) favorisant la survie des T4, leur prolifération et la synthèse de cytokines pro-inflammatoires (IFN γ et IL17) (217–219). A l'avenir, il serait pertinent d'étudier comment l'interaction de TIM3 avec BAG6 influence l'autophagie et la mitophagie dans les lymphocytes T4, d'autant plus qu'il a été montré que l'effet immunosupresseur de TIM3 dépend de l'activation de l'autophagie (220). Par son rôle de régulateur autophagique, la protéine BAG6 pourrait donc être un élément central de la physiopathologie des maladies dysimmunitaires.

Sur le plan oncologique, certains variants de *BAG6* favorisent le développement de cancers du poumon (221–223) et plusieurs travaux ont souligné que la localisation intracellulaire de BAG6 varie au cours de la tumorigenèse. Par exemple, dans le cancer du colon une étude rapporte que BAG6 est surexprimé dans la totalité des tumeurs coliques analysées (11 tumeurs au total), et délocalisé du noyau vers le cytoplasme pour les tumeurs dysplasiques de haut grade (15% des tumeurs), comparativement au tissu sain (224). Au contraire, la lignée cellulaire LoVo issue d'une métastase ganglionnaire de cancer colique, que nous avons utilisé dans cette étude, est caractérisée par une inactivation bi-allélique de *BAG6* (225). Dans le cas de l'ostéosarcome, la situation est l'inverse de celle observée dans le colon. En effet, BAG6 n'est plus exprimé dans 56% des tumeurs étudiées et s'accumule dans le noyau alors qu'il est localisé en intégralité au niveau cytoplasmique dans les tissus sains (226). BAG6 est également impliquée dans l'immunité anti-tumorale puisque la forme sécrétée de BAG6 régule l'activité des lymphocytes NK. Associée aux exosomes, BAG6 interagit avec le récepteur membranaire NKp30 et promeut l'activation des NK et l'élimination de la cellule cible (227). Au contraire, sécrétée sous forme soluble par des cellules tumorales, BAG6 induit l'anergie lymphocytaire NK et favorise l'échappement tumoral, notamment dans le cas de la leucémie lymphoïde chronique (171). Ces données suggèrent que la localisation intra et extracellulaire de BAG6 est impliquée dans la progression tumorale. Or nos résultats montrent que BAG6 module l'autophagie en fonction de sa localisation nucléocytoplasmique et qu'elle se délocalise de la matrice mitochondriale vers la membrane externe lors de la mitophagie. Il est donc possible que les variations d'expression et de localisation de BAG6 observées dans ces différents types de cancer affectent l'autophagie et la mitophagie des cellules tumorales, ces mécanismes étant dérégulés durant l'oncogenèse (voir « Introduction » pages 17 et 42). Il serait également pertinent d'étudier la façon dont BAG6 régule le flux autophagique dans le système immunitaire et ses conséquences pour l'immunité anti-tumorale.

Enfin, il reste encore à comprendre le rôle de BAG6 dans le développement des maladies dégénératives. A l'heure actuelle, très peu d'études ont abordé cette question. Nous savons seulement, qu'un variant de BAG6 prédispose au développement de l'arthrose de hanche et de genou (228) et que BAG6 interagit avec l'ostéopontine, dont l'expression est diminuée dans les neurones dopaminergiques des patients atteints de maladie de Parkinson (229). Pourtant, par sa capacité à promouvoir le recrutement des protéines PINK1 et PARKIN au niveau mitochondrial BAG6 est susceptible d'être impliqué dans cette maladie, et plus généralement dans diverses maladies liées à l'âge compte tenu du rôle protecteur de l'autophagie et de la mitophagie contre les dommages cellulaires survenant au cours du vieillissement.

Pour conclure, nos travaux mettent en évidence une nouvelle fonction de BAG6 dans la régulation de la dynamique mitochondriale et dans la mitophagie. Comme BAG6 possède des fonctions très variées est qu'elle est associée à de nombreuses maladies (inflammation, cancer) il sera important à l'avenir de déterminer sa localisation intracellulaire et les conséquences sur l'autophagie et la mitophagie qui en résultent en conditions physiologiques et pathologiques.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

1. Levine B, Klionsky DJ. Autophagy wins the 2016 Nobel Prize in Physiology or Medicine: Breakthroughs in baker's yeast fuel advances in biomedical research. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 10 2017;114(2):201-5.
2. Clark SL. CELLULAR DIFFERENTIATION IN THE KIDNEYS OF NEWBORN MICE STUDIED WITH THE ELECTRON MICROSCOPE. *J Biophys Biochem Cytol*. 25 mai 1957;3(3):349-62.
3. Ashford TP, Porter KR. CYTOPLASMIC COMPONENTS IN HEPATIC CELL LYSOSOMES. *J Cell Biol*. 1 janv 1962;12(1):198-202.
4. Novikoff AB, Essner E. CYTOLYSOMES AND MITOCHONDRIAL DEGENERATION. *J Cell Biol*. 1 oct 1962;15(1):140-6.
5. de Duve C, Wattiaux R. Functions of Lysosomes. *Annu Rev Physiol*. 1 mars 1966;28(1):435-92.
6. Mortimore G, Schworer C. Induction of autophagy by amino-acid deprivation in perfused rat liver [Internet]. 1977 [cité 16 févr 2020]. Disponible sur: <https://www-nature-com.proxy.insermbiblio.inist.fr/articles/270174a0>
7. Pfeifer U. Inhibition by insulin of the physiological autophagic breakdown of cell organelles. - Abstract - Europe PMC [Internet]. 1977 [cité 16 févr 2020]. Disponible sur: <https://europepmc.org/article/med/616715>
8. Blommaart EFC, Luiken JJFP, Blommaart PJE, Woerkom GM van, Meijer AJ. Phosphorylation of Ribosomal Protein S6 Is Inhibitory for Autophagy in Isolated Rat Hepatocytes. *J Biol Chem*. 2 mars 1995;270(5):2320-6.
9. Holen I, Gordon PB, Seglen PO. Protein kinase-dependent effects of okadaic acid on hepatocytic autophagy and cytoskeletal integrity. *Biochem J*. 15 juin 1992;284 (Pt 3):633-6.
10. Ogier-Denis E, Couvineau A, Maoret JJ, Houry JJ, Bauvy C, De Stefanis D, et al. A heterotrimeric Gi3-protein controls autophagic sequestration in the human colon cancer cell line HT-29. *J Biol Chem*. 6 janv 1995;270(1):13-6.
11. Takeshige K, Baba M, Tsuboi S, Noda T, Ohsumi Y. Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J Cell Biol*. oct 1992;119(2):301-11.
12. Tsukada M, Ohsumi Y. Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 25 oct 1993;333(1-2):169-74.
13. Thumm M, Egner R, Koch B, Schlumpberger M, Straub M, Veenhuis M, et al. Isolation of autophagocytosis mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*. 1 août 1994;349(2):275-80.
14. Harding TM. Isolation and characterization of yeast mutants in the cytoplasm to vacuole

protein targeting pathway. *J Cell Biol.* 1 nov 1995;131(3):591-602.

15. Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD, Sakai Y, Sandoval IV, et al. A Unified Nomenclature for Yeast Autophagy-Related Genes. *Dev Cell.* 1 oct 2003;5(4):539-45.
16. Kametaka S, Matsuura A, Wada Y, Ohsumi Y. Structural and functional analyses of APG5 a gene involved in autophagy in yeast. *Gene.* 1 janv 1996;178(1):139-43.
17. Schlumpberger M, Schaeffeler E, Straub M, Bredschneider M, Wolf DH, Thumm M. AUT1, a gene essential for autophagocytosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol.* févr 1997;179(4):1068-76.
18. Mizushima N, Sugita H, Yoshimori T, Ohsumi Y. A New Protein Conjugation System in Human THE COUNTERPART OF THE YEAST Apg12p CONJUGATION SYSTEM ESSENTIAL FOR AUTOPHAGY. *J Biol Chem.* 18 déc 1998;273(51):33889-92.
19. Mizushima N, Noda T, Yoshimori T, Tanaka Y, Ishii T, George MD, et al. A protein conjugation system essential for autophagy. *Nature.* sept 1998;395(6700):395-8.
20. Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K, Kempkes B, Hibshoosh H, et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature.* déc 1999;402(6762):672-6.
21. Ichimura Y, Kirisako T, Takao T, Satomi Y, Shimonishi Y, Ishihara N, et al. A ubiquitin-like system mediates protein lipidation. *Nature.* nov 2000;408(6811):488-92.
22. Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, et al. LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosome membranes after processing. *EMBO J.* 1 nov 2000;19(21):5720-8.
23. Qu X, Yu J, Bhagat G, Furuya N, Hibshoosh H, Troxel A, et al. Promotion of tumorigenesis by heterozygous disruption of the beclin 1 autophagy gene. *J Clin Invest.* déc 2003;112(12):1809-20.
24. Yue Z, Jin S, Yang C, Levine AJ, Heintz N. Beclin 1, an autophagy gene essential for early embryonic development, is a haploinsufficient tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 9 déc 2003;100(25):15077-82.
25. Meléndez A, Tallóczy Z, Seaman M, Eskelinen E-L, Hall DH, Levine B. Autophagy Genes Are Essential for Dauer Development and Life-Span Extension in *C. elegans*. *Science.* 5 sept 2003;301(5638):1387-91.
26. Kuma A, Hatano M, Matsui M, Yamamoto A, Nakaya H, Yoshimori T, et al. The role of autophagy during the early neonatal starvation period. *Nature.* déc 2004;432(7020):1032-6.
27. Kissová I, Deffieu M, Manon S, Camougrand N. Uth1p Is Involved in the Autophagic Degradation of Mitochondria. *J Biol Chem.* 9 oct 2004;279(37):39068-74.
28. Lemasters JJ. Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging. *Rejuvenation Res.* mars 2005;8(1):3-5.
29. Hong T, Feng X, Tong W, Xu W. Bibliometric analysis of research on the trends in autophagy. *PeerJ.* 5 juin 2019;7:e7103.

30. Parzych KR, Klionsky DJ. An Overview of Autophagy: Morphology, Mechanism, and Regulation. *Antioxid Redox Signal*. 20 janv 2014;20(3):460-73.
31. Mijaljica D, Prescott M, Devenish RJ. Microautophagy in mammalian cells: Revisiting a 40-year-old conundrum. *Autophagy*. juill 2011;7(7):673-82.
32. Kaushik S, Cuervo AM. The coming of age of chaperone-mediated autophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol*. juin 2018;19(6):365-81.
33. Hayashi-Nishino M, Fujita N, Noda T, Yamaguchi A, Yoshimori T, Yamamoto A. A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat Cell Biol*. déc 2009;11(12):1433-7.
34. Ylä-Anttila P, Vihinen H, Jokitalo E, Eskelinen E-L. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy*. 16 nov 2009;5(8):1180-5.
35. Ravikumar B, Moreau K, Jahreiss L, Puri C, Rubinsztein DC. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol*. août 2010;12(8):747-57.
36. Takahashi Y, Meyerkord CL, Hori T, Runkle K, Fox TE, Kester M, et al. Bif-1 regulates Atg9 trafficking by mediating the fission of Golgi membranes during autophagy. *Autophagy*. janv 2011;7(1):61-73.
37. Hailey DW, Rambold AS, Satpute-Krishnan P, Mitra K, Sougrat R, Kim PK, et al. Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. *Cell*. mai 2010;141(4):656-67.
38. Kiel JAKW, Komduur JA, Klei IJ van der, Veenhuis M. Macropexophagy in *Hansenula polymorpha*: facts and views. *FEBS Lett*. 14 août 2003;549(1-3):1-6.
39. Menzies FM, Fleming A, Rubinsztein DC. Compromised autophagy and neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci*. juin 2015;16(6):345-57.
40. Galluzzi L, Baehrecke EH, Ballabio A, Boya P, Bravo-San Pedro JM, Cecconi F, et al. Molecular definitions of autophagy and related processes. *EMBO J*. 3 juill 2017;36(13):1811-36.
41. Cuervo AM. Chaperone-mediated autophagy: Dice's « wild » idea about lysosomal selectivity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. août 2011;12(8):535-41.
42. Galluzzi L, Pietrocola F, Levine B, Kroemer G. Metabolic Control of Autophagy. *Cell*. 4 déc 2014;159(6):1263-76.
43. Kroemer G, Mariño G, Levine B. Autophagy and the integrated stress response. *Mol Cell*. 22 oct 2010;40(2):280-93.
44. Mizushima N, Yamamoto A, Matsui M, Yoshimori T, Ohsumi Y. In Vivo Analysis of Autophagy in Response to Nutrient Starvation Using Transgenic Mice Expressing a Fluorescent Autophagosome Marker. *Mol Biol Cell*. mars 2004;15(3):1101-11.
45. Boya P, González-Polo R-A, Casares N, Perfettini J-L, Dessen P, Larochette N, et al. Inhibition of Macroautophagy Triggers Apoptosis. *Mol Cell Biol*. févr 2005;25(3):1025-40.

46. Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW. Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 13 juill 2018;1.
47. Colman RJ, Anderson RM, Johnson SC, Kastman EK, Kosmatka KJ, Beasley TM, et al. Caloric Restriction Delays Disease Onset and Mortality in Rhesus Monkeys. *Science.* 10 juill 2009;325(5937):201-4.
48. Madeo F, Zimmermann A, Maiuri MC, Kroemer G. Essential role for autophagy in life span extension. *J Clin Invest.* 2 janv 2015;125(1):85-93.
49. Levine B, Kroemer G. Biological Functions of Autophagy Genes: A Disease Perspective. *Cell.* 10 janv 2019;176(1):11-42.
50. Juhász G, Érdi B, Sass M, Neufeld TP. Atg7-dependent autophagy promotes neuronal health, stress tolerance, and longevity but is dispensable for metamorphosis in *Drosophila*. *Genes Dev.* 12 janv 2007;21(23):3061-6.
51. Fernández ÁF, Sebtí S, Wei Y, Zou Z, Shi M, McMillan KL, et al. Disruption of the beclin 1–BCL2 autophagy regulatory complex promotes longevity in mice. *Nature.* 30 mai 2018;1.
52. García-Prat L, Martínez-Vicente M, Perdiguero E, Ortet L, Rodríguez-Ubrea J, Rebollo E, et al. Autophagy maintains stemness by preventing senescence. *Nature.* janv 2016;529(7584):37-42.
53. Chen K, Dai H, Yuan J, Chen J, Lin L, Zhang W, et al. Optineurin-mediated mitophagy protects renal tubular epithelial cells against accelerated senescence in diabetic nephropathy. *Cell Death Dis.* 24 janv 2018;9(2):1-18.
54. Joffre C, Djavaheri-Mergny M, Pattingre S, Giuriato S. L'autophagie : le yin et le yang des cancers. *médecine/sciences.* mars 2017;33(3):328-34.
55. Takamura A, Komatsu M, Hara T, Sakamoto A, Kishi C, Waguri S, et al. Autophagy-deficient mice develop multiple liver tumors. *Genes Dev.* 15 avr 2011;25(8):795-800.
56. Mathew R, Kongara S, Beaudoin B, Karp CM, Bray K, Degenhardt K, et al. Autophagy suppresses tumor progression by limiting chromosomal instability. *Genes Dev.* 6 janv 2007;21(11):1367-81.
57. Degenhardt K, Mathew R, Beaudoin B, Bray K, Anderson D, Chen G, et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell.* 1 juill 2006;10(1):51-64.
58. Nitta T, Sato Y, Ren XS, Harada K, Sasaki M, Hirano S, et al. Autophagy may promote carcinoma cell invasion and correlate with poor prognosis in cholangiocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 15 juill 2014;7(8):4913-21.
59. Peng Y-F, Shi Y-H, Ding Z-B, Ke A-W, Gu C-Y, Hui B, et al. Autophagy inhibition suppresses pulmonary metastasis of HCC in mice via impairing anoikis resistance and colonization of HCC cells. *Autophagy.* déc 2013;9(12):2056-68.
60. Kim YH, Baek SH, Kim EK, Ha JM, Jin SY, Lee HS, et al. Uncoordinated 51-like kinase 2 signaling pathway regulates epithelial-mesenchymal transition in A549 lung cancer cells. *FEBS Lett.* 2016;590(9):1365-74.

61. Mitou G, Frentzel J, Desquesnes A, Le Gonidec S, AlSaati T, Beau I, et al. Targeting autophagy enhances the anti-tumoral action of crizotinib in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma. *Oncotarget*. 17 août 2015;6(30):30149-64.
62. Bellodi C, Lidonnici MR, Hamilton A, Helgason GV, Soliera AR, Ronchetti M, et al. Targeting autophagy potentiates tyrosine kinase inhibitor-induced cell death in Philadelphia chromosome-positive cells, including primary CML stem cells. *J Clin Invest*. 1 mai 2009;119(5):1109-23.
63. Search of: hydroxychloroquine | Recruiting, Not yet recruiting, Active, not recruiting, Enrolling by invitation Studies | Interventional Studies | Cancer - List Results - ClinicalTrials.gov [Internet]. [cité 29 mars 2020]. Disponible sur: https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=hydroxychloroquine&cond=Cancer&recrs=b&recrs=a&recrs=f&recrs=d&age_v=&gndr=&type=Intr&rslt=&Search=Apply
64. Jung CH, Jun CB, Ro S-H, Kim Y-M, Otto NM, Cao J, et al. ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Schmid SL, éditeur. Mol Biol Cell*. avr 2009;20(7):1992-2003.
65. Suzuki SW, Yamamoto H, Oikawa Y, Kondo-Kakuta C, Kimura Y, Hirano H, et al. Atg13 HORMA domain recruits Atg9 vesicles during autophagosome formation. *Proc Natl Acad Sci*. 17 mars 2015;112(11):3350-5.
66. Orsi A, Razi M, Dooley HC, Robinson D, Weston AE, Collinson LM, et al. Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol Biol Cell*. 28 mars 2012;23(10):1860-73.
67. Obara K, Sekito T, Niimi K, Ohsumi Y. The Atg18-Atg2 Complex Is Recruited to Autophagic Membranes via Phosphatidylinositol 3-Phosphate and Exerts an Essential Function. *J Biol Chem*. 29 août 2008;283(35):23972-80.
68. Polson HEJ, de Lartigue J, Rigden DJ, Reedijk M, Urbé S, Clague MJ, et al. Mammalian Atg18 (WIPI2) localizes to omegasome-anchored phagophores and positively regulates LC3 lipidation. *Autophagy*. 16 mai 2010;6(4):506-22.
69. Proikas-Cezanne T, Waddell S, Gaugel A, Frickey T, Lupas A, Nordheim A. WIPI-1 alpha (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*. 16 déc 2004;23(58):9314-25.
70. He C, Levine B. The Beclin 1 interactome. *Curr Opin Cell Biol*. avr 2010;22(2):140-9.
71. Di Bartolomeo S, Corazzari M, Nazio F, Oliverio S, Lisi G, Antonioli M, et al. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *J Cell Biol*. 4 oct 2010;191(1):155-68.
72. Pattingre S, Tassa A, Qu X, Garuti R, Liang XH, Mizushima N, et al. Bcl-2 Antiapoptotic Proteins Inhibit Beclin 1-Dependent Autophagy. *Cell*. sept 2005;122(6):927-39.
73. Maiuri MC, Le Toumelin G, Criollo A, Rain J-C, Gautier F, Juin P, et al. Functional and physical interaction between Bcl-XL and a BH3-like domain in Beclin-1. *EMBO J*. 16 mai 2007;26(10):2527-39.

74. Nguyen N, Shteyn V, Melia TJ. Sensing Membrane Curvature in Macroautophagy. *J Mol Biol.* 17 févr 2017;429(4):457-72.
75. Mizushima N, Kuma A, Kobayashi Y, Yamamoto A, Matsubae M, Takao T, et al. Mouse Apg16L, a novel WD-repeat protein, targets to the autophagic isolation membrane with the Apg12-Apg5 conjugate. *J Cell Sci.* 1 mai 2003;116(9):1679-88.
76. Weidberg H, Shvets E, Shpilka T, Shimron F, Shinder V, Elazar Z. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *EMBO J.* 2 juin 2010;29(11):1792-802.
77. Geng J, Klionsky DJ. The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series. *EMBO Rep.* sept 2008;9(9):859-64.
78. Tanida I, Ueno T, Kominami E. LC3 conjugation system in mammalian autophagy. *Int J Biochem Cell Biol.* 1 déc 2004;36(12):2503-18.
79. Stolz A, Ernst A, Dikic I. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nat Cell Biol.* juin 2014;16(6):495-501.
80. Hamacher-Brady A, Brady NR. Mitophagy programs: mechanisms and physiological implications of mitochondrial targeting by autophagy. *Cell Mol Life Sci.* 1 févr 2016;73(4):775-95.
81. Yang Z, Huang J, Geng J, Nair U, Klionsky DJ. Atg22 Recycles Amino Acids to Link the Degradative and Recycling Functions of Autophagy. *Mol Biol Cell.* déc 2006;17(12):5094-104.
82. Jahreiss L, Menzies FM, Rubinsztein DC. The Itinerary of Autophagosomes: From Peripheral Formation to Kiss-and-Run Fusion with Lysosomes. *Traffic Cph Den.* 1 avr 2008;9(4):574-87.
83. Itakura E, Kishi-Itakura C, Mizushima N. The Hairpin-type Tail-Anchored SNARE Syntaxin 17 Targets to Autophagosomes for Fusion with Endosomes/Lysosomes. *Cell.* 7 déc 2012;151(6):1256-69.
84. Gray MW, Burger G, Lang BF. Mitochondrial Evolution. *Science.* 5 mars 1999;283(5407):1476-81.
85. Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol.* déc 2010;11(12):872-84.
86. Wallace DC. Mitochondrial genetic medicine. *Nat Genet.* déc 2018;50(12):1642-9.
87. Antico Arciuch VG, Elguero ME, Poderoso JJ, Carreras MC. Mitochondrial Regulation of Cell Cycle and Proliferation. *Antioxid Redox Signal.* 15 mai 2012;16(10):1150-80.
88. Spinelli JB, Haigis MC. The multifaceted contributions of mitochondria to cellular metabolism. *Nat Cell Biol.* juill 2018;20(7):745-54.
89. De Stefani D, Rizzuto R, Pozzan T. Enjoy the Trip: Calcium in Mitochondria Back and Forth. *Annu Rev Biochem.* 2 juin 2016;85(1):161-92.

90. Youle RJ, Karbowski M. Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* août 2005;6(8):657-63.
91. Pfanner N, Warscheid B, Wiedemann N. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol.* mai 2019;20(5):267-84.
92. Youle RJ, Blik AM van der. Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science.* 31 août 2012;337(6098):1062-5.
93. Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature.* oct 2006;443(7113):787-95.
94. Seo AY, Joseph A-M, Dutta D, Hwang JCY, Aris JP, Leeuwenburgh C. New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J Cell Sci.* 1 août 2010;123(15):2533-42.
95. Baker MJ, Tatsuta T, Langer T. Quality Control of Mitochondrial Proteostasis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 7 janv 2011;3(7):a007559.
96. Vigié P, Camougrand N. Mitophagie et contrôle qualité des mitochondries. *médecine/sciences.* 1 mars 2017;33(3):231-7.
97. Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem.* 15 juill 2005;280(28):26185-92.
98. Ono T, Isobe K, Nakada K, Hayashi J-I. Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat Genet.* juill 2001;28(3):272-5.
99. Chen H, McCaffery JM, Chan DC. Mitochondrial Fusion Protects against Neurodegeneration in the Cerebellum. *Cell.* août 2007;130(3):548-62.
100. Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, Prudent J. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms. *Essays Biochem.* 20 juill 2018;62(3):341-60.
101. Lee JE, Westrate LM, Wu H, Page C, Voeltz GK. Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature.* déc 2016;540(7631):139-43.
102. Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M, Mattenberger Y, Herzig S, et al. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J.* 3 juin 2009;28(11):1589-600.
103. Mitra K, Wunder C, Roysam B, Lin G, Lippincott-Schwartz J. A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. *Proc Natl Acad Sci.* 21 juill 2009;106(29):11960-5.
104. Rambold AS, Kostecky B, Elia N, Lippincott-Schwartz J. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proc Natl Acad Sci.* 21 juin 2011;108(25):10190-5.
105. Gomes LC, Di Benedetto G, Scorrano L. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nat Cell Biol.* mai 2011;13(5):589-98.

106. Skulachev VP. Mitochondrial filaments and clusters as intracellular power-transmitting cables. *Trends Biochem Sci.* 1 janv 2001;26(1):23-9.
107. Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K. Mitotic Phosphorylation of Dynamin-related GTPase Drp1 Participates in Mitochondrial Fission. *J Biol Chem.* 13 avr 2007;282(15):11521-9.
108. Li Z, Okamoto K-I, Hayashi Y, Sheng M. The Importance of Dendritic Mitochondria in the Morphogenesis and Plasticity of Spines and Synapses. *Cell.* 17 déc 2004;119(6):873-87.
109. Gomes LC, Scorrano L. Mitochondrial morphology in mitophagy and macroautophagy. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res.* 1 janv 2013;1833(1):205-12.
110. Twig G, Elorza A, Molina AJA, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J.* 23 janv 2008;27(2):433-46.
111. Ehses S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A, Geimer S, Tondera D, et al. Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J Cell Biol.* 28 déc 2009;187(7):1023-36.
112. Head B, Griparic L, Amiri M, Gandre-Babbe S, van der Blik AM. Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J Cell Biol.* 28 déc 2009;187(7):959-66.
113. Tanaka A, Cleland MM, Xu S, Narendra DP, Suen D-F, Karbowski M, et al. Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J Cell Biol.* 27 déc 2010;191(7):1367-80.
114. Montava-Garriga L, Ganley IG. Outstanding Questions in Mitophagy: What We Do and Do Not Know. *J Mol Biol [Internet].* 9 juill 2019 [cité 19 nov 2019]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022283619304292>
115. Laker RC, Drake JC, Wilson RJ, Lira VA, Lewellen BM, Ryall KA, et al. Ampk phosphorylation of Ulk1 is required for targeting of mitochondria to lysosomes in exercise-induced mitophagy. *Nat Commun.* 15 sept 2017;8(1):1-13.
116. Kundu M, Lindsten T, Yang C-Y, Wu J, Zhao F, Zhang J, et al. Ulk1 plays a critical role in the autophagic clearance of mitochondria and ribosomes during reticulocyte maturation. *Blood.* 15 août 2008;112(4):1493-502.
117. Honda S, Arakawa S, Nishida Y, Yamaguchi H, Ishii E, Shimizu S. Ulk1-mediated Atg5-independent macroautophagy mediates elimination of mitochondria from embryonic reticulocytes. *Nat Commun.* 4 juin 2014;5(1):1-13.
118. Itakura E, Kishi-Itakura C, Koyama-Honda I, Mizushima N. Structures containing Atg9A and the ULK1 complex independently target depolarized mitochondria at initial stages of Parkin-mediated mitophagy. *J Cell Sci.* 15 mars 2012;125(6):1488-99.
119. Nguyen TN, Padman BS, Usher J, Oorschot V, Ramm G, Lazarou M. Atg8 family LC3/GABARAP proteins are crucial for autophagosome–lysosome fusion but not autophagosome formation during PINK1/Parkin mitophagy and starvation. *J Cell Biol.* 19 déc 2016;215(6):857-74.

120. Vargas JNS, Wang C, Bunker E, Hao L, Maric D, Schiavo G, et al. Spatiotemporal Control of ULK1 Activation by NDP52 and TBK1 during Selective Autophagy. *Mol Cell*. 18 avr 2019;74(2):347-362.e6.
121. Lazarou M, Sliter DA, Kane LA, Sarraf SA, Wang C, Burman JL, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*. août 2015;524(7565):309-14.
122. Wu W, Tian W, Hu Z, Chen G, Huang L, Li W, et al. ULK1 translocates to mitochondria and phosphorylates FUNDC1 to regulate mitophagy. *EMBO Rep*. 1 mai 2014;15(5):566-75.
123. Murakawa T, Okamoto K, Omiya S, Taneike M, Yamaguchi O, Otsu K. A Mammalian Mitophagy Receptor, Bcl2-L-13, Recruits the ULK1 Complex to Induce Mitophagy. *Cell Rep*. 8 janv 2019;26(2):338-345.e6.
124. Humbeeck CV, Cornelissen T, Hofkens H, Mandemakers W, Gevaert K, Strooper BD, et al. Parkin Interacts with Ambra1 to Induce Mitophagy. *J Neurosci*. 13 juill 2011;31(28):10249-61.
125. Strappazzon F, Nazio F, Corrado M, Cianfanelli V, Romagnoli A, Fimia GM, et al. AMBRA1 is able to induce mitophagy via LC3 binding, regardless of PARKIN and p62/SQSTM1. *Cell Death Differ*. mars 2015;22(3):419-32.
126. Sato K, Sato M. Multiple ways to prevent transmission of paternal mitochondrial DNA for maternal inheritance in animals. *J Biochem (Tokyo)*. 1 oct 2017;162(4):247-53.
127. Ney PA. Normal and disordered reticulocyte maturation. *Curr Opin Hematol*. mai 2011;18(3):152-7.
128. Altshuler-Keylin S, Shinoda K, Hasegawa Y, Ikeda K, Hong H, Kang Q, et al. Beige Adipocyte Maintenance Is Regulated by Autophagy-Induced Mitochondrial Clearance. *Cell Metab*. 13 sept 2016;24(3):402-19.
129. Zhang H, Bosch-Marce M, Shimoda LA, Tan YS, Baek JH, Wesley JB, et al. Mitochondrial Autophagy Is an HIF-1-dependent Adaptive Metabolic Response to Hypoxia. *J Biol Chem*. 18 avr 2008;283(16):10892-903.
130. Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. avr 1998;392(6676):605-8.
131. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MMK, Harvey K, Gispert S, et al. Hereditary Early-Onset Parkinson's Disease Caused by Mutations in PINK1. *Science*. 21 mai 2004;304(5674):1158-60.
132. Matsuda N. Phospho-ubiquitin: upending the PINK–Parkin–ubiquitin cascade. *J Biochem (Tokyo)*. 1 avr 2016;159(4):379-85.
133. Bio-Bits - PINK1-Mediated Activation & Recruitment of Parkin to the Mitochondria [Internet]. [cité 30 avr 2020]. Disponible sur: <https://www.biolegend.com/en-us/bio-bits/pink1-mediated-activation-and-recruitment-of-parkin-to-the-mitochondria>
134. Princely Abudu Y, Pankiv S, Mathai BJ, Håkon Lystad A, Bindesbøll C, Brenne HB, et al. NIPSNAP1 and NIPSNAP2 Act as “Eat Me” Signals for Mitophagy. *Dev Cell* [Internet]. 11

avr 2019 [cité 18 avr 2019]; Disponible sur:
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1534580719302242>

135. Wei Y, Chiang W-C, Sumpter R, Mishra P, Levine B. Prohibitin 2 Is an Inner Mitochondrial Membrane Mitophagy Receptor. *Cell*. 12 janv 2017;168(1):224-238.e10.
136. Sowter HM, Ratcliffe PJ, Watson P, Greenberg AH, Harris AL. HIF-1-dependent Regulation of Hypoxic Induction of the Cell Death Factors BNIP3 and NIX in Human Tumors. *Cancer Res*. 15 sept 2001;61(18):6669-73.
137. Guo K, Searfoss G, Krolikowski D, Pagnoni M, Franks C, Clark K, et al. Hypoxia induces the expression of the pro-apoptotic gene BNIP3. *Cell Death Differ*. avr 2001;8(4):367-76.
138. Chen G, Han Z, Feng D, Chen Y, Chen L, Wu H, et al. A Regulatory Signaling Loop Comprising the PGAM5 Phosphatase and CK2 Controls Receptor-Mediated Mitophagy. *Mol Cell*. 8 mai 2014;54(3):362-77.
139. Zhu Y, Massen S, Terenzio M, Lang V, Chen-Lindner S, Eils R, et al. Modulation of serines 17 and 24 in the LC3-interacting region of Bnip3 determines pro-survival mitophagy versus apoptosis. *J Biol Chem*. 11 janv 2013;288(2):1099-113.
140. Chu CT, Ji J, Dagda RK, Jiang JF, Tyurina YY, Kapralov AA, et al. Cardiolipin externalization to the outer mitochondrial membrane acts as an elimination signal for mitophagy in neuronal cells. *Nat Cell Biol*. oct 2013;15(10):1197-205.
141. Palikaras K, Daskalaki I, Markaki M, Tavernarakis N. Mitophagy and age-related pathologies: Development of new therapeutics by targeting mitochondrial turnover. *Pharmacol Ther*. 1 oct 2017;178:157-74.
142. Fujiwara M, Marusawa H, Wang H-Q, Iwai A, Ikeuchi K, Imai Y, et al. Parkin as a tumor suppressor gene for hepatocellular carcinoma. *Oncogene*. oct 2008;27(46):6002-11.
143. West AB, Kapatoss G, O'Farrell C, Gonzalez-de-Chavez F, Chiu K, Farrer MJ, et al. N-myc Regulates Parkin Expression. *J Biol Chem*. 7 sept 2004;279(28):28896-902.
144. Murai M, Toyota M, Satoh A, Suzuki H, Akino K, Mita H, et al. Aberrant DNA methylation associated with silencing BNIP3 gene expression in haematopoietic tumours. *Br J Cancer*. 28 mars 2005;92(6):1165-72.
145. Okami J, Simeone DM, Logsdon CD. Silencing of the hypoxia-inducible cell death protein BNIP3 in pancreatic cancer. *Cancer Res*. 1 août 2004;64(15):5338-46.
146. Chourasia AH, Tracy K, Frankenberger C, Boland ML, Sharifi MN, Drake LE, et al. Mitophagy defects arising from BNIP3 loss promote mammary tumor progression to metastasis. *EMBO Rep*. 1 sept 2015;16(9):1145-63.
147. Akada M, Crnogorac-Jurcevic T, Lattimore S, Mahon P, Lopes R, Sunamura M, et al. Intrinsic chemoresistance to gemcitabine is associated with decreased expression of BNIP3 in pancreatic cancer. *Clin Cancer Res Off J Am Assoc Cancer Res*. 15 avr 2005;11(8):3094-101.
148. Erkan M, Kleeff J, Esposito I, Giese T, Ketterer K, Büchler MW, et al. Loss of BNIP3 expression is a late event in pancreatic cancer contributing to chemoresistance and worsened prognosis. *Oncogene*. 23 juin 2005;24(27):4421-32.

149. Billia F, Hauck L, Konecny F, Rao V, Shen J, Mak TW. PTEN-inducible kinase 1 (PINK1)/Park6 is indispensable for normal heart function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 7 juin 2011;108(23):9572-7.
150. Siddall HK, Yellon DM, Ong S-B, Mukherjee UA, Burke N, Hall AR, et al. Loss of PINK1 Increases the Heart's Vulnerability to Ischemia-Reperfusion Injury. *PLoS ONE* [Internet]. 29 avr 2013 [cité 1 avr 2020];8(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3639249/>
151. Kubli DA, Quinsay MN, Gustafsson ÅB. Parkin deficiency results in accumulation of abnormal mitochondria in aging myocytes. *Commun Integr Biol* [Internet]. 1 juill 2013 [cité 1 avr 2020];6(4). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3737749/>
152. Kubli DA, Zhang X, Lee Y, Hanna RA, Quinsay MN, Nguyen CK, et al. Parkin Protein Deficiency Exacerbates Cardiac Injury and Reduces Survival following Myocardial Infarction. *J Biol Chem*. 11 janv 2013;288(2):915-26.
153. Hoshino A, Mita Y, Okawa Y, Ariyoshi M, Iwai-Kanai E, Ueyama T, et al. Cytosolic p53 inhibits Parkin-mediated mitophagy and promotes mitochondrial dysfunction in the mouse heart. *Nat Commun*. 6 août 2013;4(1):1-12.
154. de Vries RLA, Przedborski S. Mitophagy and Parkinson's disease: Be eaten to stay healthy. *Mol Cell Neurosci*. 1 juill 2013;55:37-43.
155. Kraysberg Y, Kudryavtseva E, McKee AC, Geula C, Kowall NW, Khrapko K. Mitochondrial DNA deletions are abundant and cause functional impairment in aged human substantia nigra neurons. *Nat Genet*. mai 2006;38(5):518-20.
156. Bender A, Krishnan KJ, Morris CM, Taylor GA, Reeve AK, Perry RH, et al. High levels of mitochondrial DNA deletions in substantia nigra neurons in aging and Parkinson disease. *Nat Genet*. mai 2006;38(5):515-7.
157. Surmeier DJ, Guzman JN, Sanchez-Padilla J, Schumacker PT. The role of calcium and mitochondrial oxidant stress in the loss of substantia nigra pars compacta dopaminergic neurons in Parkinson's disease. *Neuroscience*. 15 déc 2011;198:221-31.
158. Khalil B, Fissi NE, Aouane A, Cabirol-Pol M-J, Rival T, Liévens J-C. PINK1-induced mitophagy promotes neuroprotection in Huntington's disease. *Cell Death Dis*. janv 2015;6(1):e1617-e1617.
159. Bossy-Wetzel E, Petrilli A, Knott AB. MUTANT HUNTINGTIN AND MITOCHONDRIAL DYSFUNCTION. *Trends Neurosci*. déc 2008;31(12):609-16.
160. Martinez-Vicente M, Talloczy Z, Wong E, Tang G, Koga H, Kaushik S, et al. Cargo recognition failure is responsible for inefficient autophagy in Huntington's disease. *Nat Neurosci*. mai 2010;13(5):567-76.
161. Takayama S, Sato T, Krajewski S, Kochel K, Irie S, Milian JA, et al. Cloning and functional analysis of BAG-1: A novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell*. 27 janv 1995;80(2):279-84.
162. Kabbage M, Dickman MB. The BAG proteins: a ubiquitous family of chaperone regulators. *Cell Mol Life Sci*. 1 mai 2008;65(9):1390-402.

163. Spies T, Blanck G, Bresnahan M, Sands J, Strominger JL. A new cluster of genes within the human major histocompatibility complex. *Science*. 13 janv 1989;243(4888):214-7.
164. Spies T, Bresnahan M, Strominger JL. Human major histocompatibility complex contains a minimum of 19 genes between the complement cluster and HLA-B. *Proc Natl Acad Sci*. 1 nov 1989;86(22):8955-8.
165. Banerji J, Sands J, Strominger JL, Spies T. A gene pair from the human major histocompatibility complex encodes large proline-rich proteins with multiple repeated motifs and a single ubiquitin-like domain. *Proc Natl Acad Sci*. 1 mars 1990;87(6):2374-8.
166. Thress K, Henzel W, Shillinglaw W, Kornbluth S. Scythe: a novel reaper-binding apoptotic regulator. *EMBO J*. 2 nov 1998;17(21):6135-43.
167. Kawahara H, Minami R, Yokota N. BAG6/BAT3: emerging roles in quality control for nascent polypeptides. *J Biochem (Tokyo)*. 1 févr 2013;153(2):147-60.
168. Wang R, Liew C-C. The human BAT3 ortholog in rodents is predominantly and developmentally expressed in testis. *Mol Cell Biochem*. 1 juill 1994;136(1):49-57.
169. Ozaki T, Hanaoka E, Naka M, Nakagawara A, Sakiyama S. Cloning and Characterization of Rat BAT3 cDNA. *DNA Cell Biol*. juin 1999;18(6):503-12.
170. Lee J-G, Ye Y. Bag6/Bat3/Scythe: A novel chaperone activity with diverse regulatory functions in protein biogenesis and degradation. *BioEssays*. 1 avr 2013;35(4):377-85.
171. Reiners KS, Topolar D, Henke A, Simhadri VR, Kessler J, Sauer M, et al. Soluble ligands for NK cell receptors promote evasion of chronic lymphocytic leukemia cells from NK cell anti-tumor activity. *Blood*. 2 mai 2013;121(18):3658-65.
172. Kämper N, Kessler J, Temme S, Wegscheid C, Winkler J, Koch N. A Novel BAT3 Sequence Generated by Alternative RNA Splicing of Exon 11B Displays Cell Type-Specific Expression and Impacts on Subcellular Localization. *PLOS ONE*. 25 avr 2012;7(4):e35972.
173. Benarroch R, Austin JM, Ahmed F, Isaacson RL. The roles of cytosolic quality control proteins, SGTA and the BAG6 complex, in disease. In: *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology* [Internet]. Elsevier; 2019 [cité 19 nov 2019]. p. 265-313. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1876162318300749>
174. Hartmann-Petersen R, Gordon C. Integral UBL domain proteins: a family of proteasome interacting proteins. *Semin Cell Dev Biol*. avr 2004;15(2):247-59.
175. Kikukawa Y, Minami R, Shimada M, Kobayashi M, Tanaka K, Yokosawa H, et al. Unique proteasome subunit Xrpn10c is a specific receptor for the antiapoptotic ubiquitin-like protein Scythe. *FEBS J*. 2005;272(24):6373-86.
176. Xu Y, Liu Y, Lee J, Ye Y. A Ubiquitin-like Domain Recruits an Oligomeric Chaperone to a Retrotranslocation Complex in Endoplasmic Reticulum-associated Degradation. *J Biol Chem*. 21 juin 2013;288(25):18068-76.
177. Krysztofinska EM, Martínez-Lumbreras S, Thapaliya A, Evans NJ, High S, Isaacson RL. Structural and functional insights into the E3 ligase, RNF126. *Sci Rep*. 19 mai 2016;6:26433.

178. Rodrigo-Brenni MC, Gutierrez E, Hegde RS. Cytosolic Quality Control of Mislocalized Proteins Requires RNF126 Recruitment to Bag6. *Mol Cell*. 17 juill 2014;55(2):227-37.
179. Desmots F, Russell HR, Lee Y, Boyd K, McKinnon PJ. The Reaper-Binding Protein Scythe Modulates Apoptosis and Proliferation during Mammalian Development. *Mol Cell Biol*. 1 déc 2005;25(23):10329-37.
180. Thress K, Evans EK, Kornbluth S. Reaper-induced dissociation of a Scythe-sequestered cytochrome c-releasing activity. *EMBO J*. 15 oct 1999;18(20):5486-93.
181. Desmots F, Russell HR, Michel D, McKinnon PJ. Scythe Regulates Apoptosis-inducing Factor Stability during Endoplasmic Reticulum Stress-induced Apoptosis. *J Biol Chem*. 2 août 2008;283(6):3264-71.
182. Minami R, Shimada M, Yokosawa H, Kawahara H. Scythe regulates apoptosis through modulating ubiquitin-mediated proteolysis of the Xenopus elongation factor XEF1AO. *Biochem J*. 1 août 2007;405(3):495-501.
183. Grover A, Izzo AA. BAT3 Regulates Mycobacterium tuberculosis Protein ESAT-6-Mediated Apoptosis of Macrophages. *PLoS ONE* [Internet]. 13 juill 2012 [cité 13 avr 2020];7(7). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3396635/>
184. Tavarina M, Gabriele T, Kola I, Anderson RL. A hitchhiker's guide to the human Hsp70 family. *Cell Stress Chaperones*. avr 1996;1(1):23-8.
185. Thress K, Song J, Morimoto RI, Kornbluth S. Reversible inhibition of Hsp70 chaperone function by Scythe and Reaper. *EMBO J*. 1 mars 2001;20(5):1033-41.
186. Corduan A, Lecomte S, Martin C, Michel D, Desmots F. Sequential interplay between BAG6 and HSP70 upon heat shock. *Cell Mol Life Sci*. 1 juin 2009;66(11):1998-2004.
187. Sasaki T, Marcon E, McQuire T, Arai Y, Moens PB, Okada H. Bat3 deficiency accelerates the degradation of Hsp70-2/HspA2 during spermatogenesis. *J Cell Biol*. 11 août 2008;182(3):449-58.
188. Minami R, Hayakawa A, Kagawa H, Yanagi Y, Yokosawa H, Kawahara H. BAG-6 is essential for selective elimination of defective proteasomal substrates. *J Cell Biol*. 23 août 2010;190(4):637-50.
189. Hessa T, Sharma A, Mariappan M, Eshleman HD, Gutierrez E, Hegde RS. Protein targeting and degradation are coupled for elimination of mislocalized proteins. *Nature*. juill 2011;475(7356):394-7.
190. Mariappan M, Li X, Stefanovic S, Sharma A, Mateja A, Keenan RJ, et al. A ribosome-associating factor chaperones tail-anchored membrane proteins. *Nature*. août 2010;466(7310):1120-4.
191. Hegde RS, Keenan RJ. Tail-anchored membrane protein insertion into the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 16 nov 2011;12(12):787-98.
192. Leznicki P, Clancy A, Schwappach B, High S. Bat3 promotes the membrane integration of tail-anchored proteins. *J Cell Sci*. 1 juill 2010;123(13):2170-8.

193. Wang Q, Liu Y, Soetandyo N, Baek K, Hegde R, Ye Y. A Ubiquitin Ligase-Associated Chaperone Holdase Maintains Polypeptides in Soluble States for Proteasome Degradation. *Mol Cell*. 24 juin 2011;42(6):758-70.
194. Nguyen P, Bar-Sela G, Sun L, Bisht KS, Cui H, Kohn E, et al. BAT3 and SET1A Form a Complex with CTCFL/BORIS To Modulate H3K4 Histone Dimethylation and Gene Expression. *Mol Cell Biol*. nov 2008;28(21):6720-9.
195. Wakeman TP, Wang Q, Feng J, Wang X-F. Bat3 facilitates H3K79 dimethylation by DOT1L and promotes DNA damage-induced 53BP1 foci at G1/G2 cell-cycle phases. *EMBO J*. 2 mai 2012;31(9):2169-81.
196. Yong ST, Wang X-F. A novel, non-apoptotic role for Scythe/BAT3: a functional switch between the pro- and anti-proliferative roles of p21 during the cell cycle. *PloS One*. 2012;7(6):e38085.
197. Sasaki T, Gan EC, Wakeham A, Kornbluth S, Mak TW, Okada H. HLA-B-associated transcript 3 (Bat3)/Scythe is essential for p300-mediated acetylation of p53. *Genes Dev*. 1 avr 2007;21(7):848-61.
198. Sebti S, Prébois C, Pérez-Gracia E, Bauvy C, Desmots F, Pirot N, et al. BAT3 modulates p300-dependent acetylation of p53 and autophagy-related protein 7 (ATG7) during autophagy. *Proc Natl Acad Sci*. 18 mars 2014;111(11):4115-20.
199. Lee IH, Finkel T. Regulation of Autophagy by the p300 Acetyltransferase. *J Biol Chem*. 3 juin 2009;284(10):6322-8.
200. Narendra DP, Kane LA, Hauser DN, Fearnley IM, Youle RJ. p62/SQSTM1 is required for Parkin-induced mitochondrial clustering but not mitophagy; VDAC1 is dispensable for both. *Autophagy*. 16 nov 2010;6(8):1090-106.
201. Okatsu K, Saisho K, Shimanuki M, Nakada K, Shitara H, Sou Y, et al. p62/SQSTM1 cooperates with Parkin for perinuclear clustering of depolarized mitochondria. *Genes Cells*. août 2010;15(8):887-900.
202. Hayashishita M, Kawahara H, Yokota N. BAG6 deficiency induces mis-distribution of mitochondrial clusters under depolarization. *FEBS Open Bio*. juill 2019;9(7):1281-91.
203. Saita S, Ishihara T, Maeda M, Iemura S, Natsume T, Mihara K, et al. Distinct types of protease systems are involved in homeostasis regulation of mitochondrial morphology via balanced fusion and fission. *Genes Cells*. 1 mai 2016;21(5):408-24.
204. Gurusamy N, Lekli I, Gorbunov NV, Gherghiceanu M, Popescu LM, Das DK. Cardioprotection by adaptation to ischaemia augments autophagy in association with BAG-1 protein. *J Cell Mol Med*. févr 2009;13(2):373-87.
205. Klimek C, Kathage B, Wördehoff J, Höhfeld J. BAG3-mediated proteostasis at a glance. *J Cell Sci*. 1 sept 2017;130(17):2781-8.
206. Qu D, Hage A, Don-Carolis K, Huang E, Joselin A, Safarpour F, et al. BAG2 Gene-mediated Regulation of PINK1 Protein Is Critical for Mitochondrial Translocation of PARKIN and Neuronal Survival. *J Biol Chem*. 18 déc 2015;290(51):30441-52.

207. Wang X, Guo J, Fei E, Mu Y, He S, Che X, et al. BAG5 protects against mitochondrial oxidative damage through regulating PINK1 degradation. *PLoS One*. 2014;9(1):e86276.
208. Che X, Tang B, Wang X, Chen D, Yan X, Jiang H, et al. The BAG2 protein stabilises PINK1 by decreasing its ubiquitination. *Biochem Biophys Res Commun*. 15 nov 2013;441(2):488-92.
209. De Snoo ML, Friesen EL, Zhang YT, Earnshaw R, Dorval G, Kapadia M, et al. Bcl-2-associated athanogene 5 (BAG5) regulates Parkin-dependent mitophagy and cell death. *Cell Death Dis* [Internet]. 2 déc 2019 [cité 7 mai 2020];10(12). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6885512/>
210. Tahrir FG, Knezevic T, Gupta MK, Gordon J, Cheung JY, Feldman AM, et al. Evidence for the Role of BAG3 in Mitochondrial Quality Control in Cardiomyocytes. *J Cell Physiol*. 2017;232(4):797-805.
211. Hasson SA, Kane LA, Yamano K, Huang C-H, Sliter DA, Buehler E, et al. High-content genome-wide RNAi screens identify regulators of parkin upstream of mitophagy. *Nature*. déc 2013;504(7479):291-5.
212. Verma M, Zhu J, Wang KZQ, Chu CT. Chronic treatment with the complex I inhibitor MPP+ depletes endogenous PTEN-induced kinase 1(PINK1) via upregulation of BCL-2-associated athanogene 6. *J Biol Chem*. 24 avr 2020;jbc.RA119.010474.
213. Wei T, Huang G, Gao J, Huang C, Sun M, Wu J, et al. Sirtuin 3 Deficiency Accelerates Hypertensive Cardiac Remodeling by Impairing Angiogenesis. *J Am Heart Assoc*. 19 août 2017;6(8).
214. Degli-Esposti MA, Abraham LJ, McCann V, Spies T, Christiansen FT, Dawkins RL. Ancestral haplotypes reveal the role of the central MHC in the immunogenetics of IDDM. *Immunogenetics*. 1992;36(6):345-56.
215. Harney SMJ, Vilariño-Güell C, Adamopoulos IE, Sims A-M, Lawrence RW, Cardon LR, et al. Fine mapping of the MHC Class III region demonstrates association of AIF1 and rheumatoid arthritis. *Rheumatol Oxf Engl*. déc 2008;47(12):1761-7.
216. Hsieh Y-Y, Lin Y-J, Chang C-C, Chen D-Y, Hsu C-M, Wang Y-K, et al. Human lymphocyte antigen B-associated transcript 2, 3, and 5 polymorphisms and haplotypes are associated with susceptibility of Kawasaki disease and coronary artery aneurysm. *J Clin Lab Anal*. 2010;24(4):262-8.
217. Rangachari M, Zhu C, Sakuishi K, Xiao S, Karman J, Chen A, et al. Bat3 promotes T cell responses and autoimmunity by repressing Tim-3-mediated cell death and exhaustion. *Nat Med*. sept 2012;18(9):1394-400.
218. Saresella M, Piancone F, Marventano I, La Rosa F, Tortorella P, Caputo D, et al. A role for the TIM-3/GAL-9/BAT3 pathway in determining the clinical phenotype of multiple sclerosis. *FASEB J Off Publ Fed Am Soc Exp Biol*. nov 2014;28(11):5000-9.
219. Piancone F, Saresella M, Marventano I, La Rosa F, Caputo D, Mendozzi L, et al. A Deficit of CEACAM-1-Expressing T Lymphocytes Supports Inflammation in Primary Progressive Multiple Sclerosis. *J Immunol*. 1 juill 2019;203(1):76-83.
220. Qin A, Zhong T, Zou H, Wan X, Yao B, Zheng X, et al. Critical role of Tim-3 mediated

autophagy in chronic stress induced immunosuppression. *Cell Biosci.* déc 2019;9(1):1-13.

221. Chen J, Zang Y, Xiu Q. BAT3 rs1052486 and rs3117582 polymorphisms are associated with lung cancer risk: a meta-analysis. *Tumor Biol.* 1 oct 2014;35(10):9855-8.
222. Wang Y, Broderick P, Webb E, Wu X, Vijayakrishnan J, Matakidou A, et al. Common 5p15.33 and 6p21.33 variants influence lung cancer risk. *Nat Genet.* déc 2008;40(12):1407-9.
223. Etokebe GE, Zienolddiny S, Kupanovac Z, Enersen M, Balen S, Flego V, et al. Association of the FAM46A gene VNTRs and BAG6 rs3117582 SNP with non small cell lung cancer (NSCLC) in Croatian and Norwegian populations. *PloS One.* 2015;10(4):e0122651.
224. Wu W, Song W, Li S, Ouyang S, Fok KL, Diao R, et al. Regulation of apoptosis by Bat3-enhanced YWK-II/APLP2 protein stability. *J Cell Sci.* 15 sept 2012;125(18):4219-29.
225. Ivanov I, Lo KC, Hawthorn L, Cowell JK, Ionov Y. Identifying candidate colon cancer tumor suppressor genes using inhibition of nonsense-mediated mRNA decay in colon cancer cells. *Oncogene.* mai 2007;26(20):2873-84.
226. Tsukahara T, Kimura S, Ichimiya S, Torigoe T, Kawaguchi S, Wada T, et al. Scythe/BAT3 regulates apoptotic cell death induced by papillomavirus binding factor in human osteosarcoma. *Cancer Sci.* 2009;100(1):47-53.
227. Strandmann EP von, Simhadri VR, Tresckow B von, Sasse S, Reiners KS, Hansen HP, et al. Human Leukocyte Antigen-B-Associated Transcript 3 Is Released from Tumor Cells and Engages the NKp30 Receptor on Natural Killer Cells. *Immunity.* 21 déc 2007;27(6):965-74.
228. Etokebe GE, Jotanovic Z, Mihelic R, Mulac-Jericevic B, Nikolic T, Balen S, et al. Susceptibility to large-joint osteoarthritis (hip and knee) is associated with BAG6 rs3117582 SNP and the VNTR polymorphism in the second exon of the FAM46A gene on chromosome 6. *J Orthop Res.* 2015;33(1):56-62.
229. Long P, Samnakay P, Jenner P, Rose S. A yeast two-hybrid screen reveals that osteopontin associates with MAP1A and MAP1B in addition to other proteins linked to microtubule stability, apoptosis and protein degradation in the human brain. *Eur J Neurosci.* 2012;36(6):2733-42.

RESUME

L'autophagie est un processus d'autodigestion du matériel intracellulaire qui repose sur la formation de vésicules à double membrane nommées autophagosomes qui séquestrent les organites et macromolécules puis fusionnent avec les lysosomes pour permettre leur dégradation.

La dégradation sélective des mitochondries par autophagie se nomme mitophagie. En éliminant les mitochondries superflues ou endommagées à l'origine d'un stress oxydant toxique et mutagène, elle contribue au maintien de l'homéostasie cellulaire. Sa régulation met en jeu des voies de signalisations telles que la voie PINK1-PARKIN et des récepteurs spécifiques appelés récepteurs de la mitophagie.

La protéine BAG6 est une co-chaperonne des HSP70 et possède des fonctions variées telles la régulation de l'apoptose, les modifications épigénétiques, le repliement des protéines, ou encore l'élimination de peptides par le système ubiquitine-protéasome. BAG6 est également essentielle pour l'autophagie en régulant la localisation intracellulaire de l'acétyltransférase EP300 responsable de l'acétylation des protéines ATGs.

Dans ce travail de thèse, nous montrons que BAG6 se localise dans la mitochondrie. Plus précisément, BAG6 est située dans la matrice mitochondriale en conditions basales puis se délocalise dans la membrane externe lorsque les mitochondries sont dépolarisées. En parallèle, BAG6 promeut le recrutement du complexe de fission mitochondrial DRP1 et des protéines PINK1 et PARKIN impliquées dans la signalisation mitophagique ce qui lui confère un effet pro-mitophagique. Enfin, BAG6 interagit également avec LC3 par l'intermédiaire d'un domaine LIR (LC3 Interacting Region) et son effet sur la mitophagie dépend de cette interaction, faisant de BAG6 un potentiel récepteur de la mitophagie.

ABSTRACT

Autophagy is a process of self-digestion of intracellular material based on the formation of double membrane vesicles called autophagosomes that sequester organelles and macromolecules and then fuse with lysosomes to allow their degradation.

The selective degradation of mitochondria by autophagy is named mitophagy. By eliminating superfluous or damaged mitochondria, that cause toxic and mutagenic oxidative stress, mitophagy contributes to the maintenance of cellular homeostasis. Its regulation involves signaling pathways such as the PINK1-PARKIN pathway and specific receptors called mitophagy receptors.

The BAG6 protein is a co-chaperon of HSP70 and has a variety of functions such as regulation of apoptosis, epigenetic modifications, protein folding, and peptide removal by the ubiquitin-proteasome system. BAG6 is also essential for autophagy by regulating the intracellular localization of EP300 acetyltransferase responsible for ATGs protein acetylation.

In this thesis, we showed that BAG6 is located in the mitochondria. More precisely, BAG6 is located in the mitochondrial matrix under basal conditions and then relocalizes in the outer membrane when the mitochondria are depolarized. In parallel, BAG6 promotes the recruitment of the mitochondrial fission complex DRP1 and the proteins PINK1 and PARKIN involved in mitophagic signalling, which gives it a pro-mitophagic effect. Finally, BAG6 also interacts with LC3 via a LIR domain (LC3 Interacting Region) and its effect on mitophagy depends on this interaction, making BAG6 a putative mitophagy receptor.