



HAL
open science

Rôle de l'autophagie et du métabolisme nucléotidique extracellulaire dans la régulation de la voie ecto-F1-ATPase d'endocytose des HDL

Guillaume Cardouat

► **To cite this version:**

Guillaume Cardouat. Rôle de l'autophagie et du métabolisme nucléotidique extracellulaire dans la régulation de la voie ecto-F1-ATPase d'endocytose des HDL. Médecine humaine et pathologie. Université Paul Sabatier - Toulouse III, 2017. Français. NNT : 2017TOU30215 . tel-04552660

HAL Id: tel-04552660

<https://theses.hal.science/tel-04552660>

Submitted on 19 Apr 2024

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

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Guillaume CARDOUAT

le 1er Juin 2017

Titre :

Rôle de l'autophagie et du métabolisme nucléotidique
extracellulaire dans la régulation de la voie ecto-F1-ATPase d'endocytose
des HDL

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Physiopathologie

Unité de recherche :

INSERM UMR1048 - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Souad Najib
Dr. Laurent Martinez

Jury :

Pr Bertrand PERRET
Dr Jennifer RIEUSSET
Dr. Olivier BRIAND
Dr Jean Paul DI RAGO

Président
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par :

Université Toulouse 3 Paul Sabatier (UT3 Paul Sabatier)

Présentée et soutenue par :

Guillaume CARDOUAT

le 1er Juin 2017

Titre :

Rôle de l'autophagie et du métabolisme nucléotidique
extracellulaire dans la régulation de la voie ecto-F1-ATPase d'endocytose
des HDL

École doctorale et discipline ou spécialité :

ED BSB : Physiopathologie

Unité de recherche :

INSERM UMR1048 - Institut des Maladies Métaboliques et Cardiovasculaires

Directeur/trice(s) de Thèse :

Dr. Souad Najib
Dr. Laurent Martinez

Jury :

Pr Bertrand PERRET
Dr Jennifer RIEUSSET
Dr. Olivier BRIAND
Dr Jean Paul DI RAGO

Président
Rapporteur
Rapporteur
Rapporteur

**À ma famille,
à mes amis,
à mon grand-père...**

REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse.

Monsieur le Professeur Bertrand Perret, merci de m'avoir fait l'honneur de présider mon jury de thèse. Je vous prie de trouver ici le témoignage de mon profond respect.

Messieurs le **Professeur Jean-Paul DI RAGO** et le **Docteur Olivier Briand**, Madame le **Docteur Jennifer Rieusset**, je vous remercie d'avoir accepté de juger cette thèse, pour l'intérêt que vous avez porté à ce travail, et pour vos conseils qui ont permis d'améliorer ce manuscrit. Je vous remercie également pour votre présence lors de ma soutenance de thèse, ainsi que pour vos questions et pour les discussions qui ont enrichi cette soutenance. Je tiens à vous exprimer ma gratitude pour votre investissement.

Monsieur le **Docteur Laurent Martinez**, merci de m'avoir accueilli dans ton équipe et de d'avoir dirigé cette thèse. Je te remercie pour ta disponibilité, tes conseils et le partage de tes connaissances.

Madame le **Docteur Souad Najib**, je te remercie également de m'avoir également accueilli dans l'équipe. Je te suis reconnaissant d'avoir supervisé ce travail, ainsi que pour tous tes conseils durant ces 3 ans et demi. Merci pour ton aide tout au long de cette thèse, des manips à la préparation de cette soutenance orale, en passant par l'écriture du manuscrit.

Bien sûr, je remercie l'ensemble des membres de l'équipe 5 sans qui cette thèse n'aurait pas été la même...

Thibaut, merci pour les discussions scientifiques, pour ton aide en manip, lors de la rédaction du manuscrit et de la préparation de la soutenance de thèse. J'espère sincèrement que tu auras ton poste.

Guillaume, toujours au top niveau info sportive, merci pour cette bonne ambiance qui tu mets au labo.

Rodica, bon courage pour la poursuite du projet ! Ça aura été un plaisir de te croiser durant ces derniers mois de thèse.

Nicole, pour toutes ces discussions au café le matin, ou autour d'un thé chaï l'après-midi. Merci également de m'avoir enseigné l'art de la PCR. Je te souhaite le meilleur pour la suite.

Vero, merci pour ces discussions pré-BRET du matin ! Je pense que tu es prête à briser ta carapace à présent.

Steph, appelle-moi la prochaine fois que tu es enceinte, j'ai senti que j'avais un pouvoir comique incroyable à cette période.

Michel, ou l'homme le plus cool de l'institut. Merci pour ces bonnes discussions du matin. Bonne retraite Mich !

Sara, nooooo mon pooooote jajaja, bon courage pour la suite !

Anne-lise, Cendrine, merci pour votre aide et vos encouragements.

Ashraf, « c'est de la merde ». Longue vie a toi grand pharaon.

Muriel, merci pour ta bonne humeur et tes encouragements.

Romain, tranquille la famille. Bon courage pour ton projet, et ralentit le mazout mec !

Une mention spéciale pour **Natalia**, merci pour ton accueil au laboratoire, pour mes premières soirées toulousaines et pour ton soutien ! Bon courage pour ta nouvelle aventure à Denver.

A tout le crew de PhD killer

Adrien, merci pour ton aide sur à peu près tous les aspects de ma vie tout au long de la thèse. T'as été comme un grand frère pour moi, papa serait fier de toi. Merci également à ta zoulette **Julie** pour son soutien et tous ces bons moments. Bon

courage à vous deux au Etats-Unis et n'oubliez pas de revenir obèses. **Colin** (el diablo), merci pour ces bonnes soirées qui tu as fait partir en vrille. C'était bien cool..moins pour nos comptes en banque mais bon.. Merci également pour cette dernière année en colocation. **Dav et Cec**, toujours au top, merci pour ces bons fous rires, le meilleur pour mon jeune cadre dynamique et décontracté ainsi que pour l'ASH qui a un penchant pour l'alcool ! **Steven**, le vendeur en assurance de l'étage, merci pour le soutien, les discussions qu'on a pu avoir, et pour l'ambiance au bureau. Bon courage pour la fin de ta thèse. Enfin, **P-A**, ce bon vieux latino exilé en Italie, merci pour ta bonne humeur et pour tous ces bons moments qu'on a passé à Toulouse et dans ta ville de cœur : Barcelone.

A tous mes blavons bordelais :

Mon 134 ZOO, **Leca, Mato, Théo, Reiv et Grg**, plus d'une décennie que ça roule en équipe. Merci pour tous ces bons moments passés depuis ces nombreuses années et un grand merci pour le soutien pendant cette thèse, ainsi que pour votre venue le jour de la soutenance. Merci également à **Marc** d'être MM, toujours dans la disproportion. Merci à **Antonin** pour toutes les discussions qu'on a pu avoir et tous les bons moments passés depuis le master. Bon courage pour ton post-doc et pour ta nouvelle vie de famille. Enfin merci à **Roxanne**, toujours à l'écoute.

Camille, merci de m'avoir supporté dans la dernière ligne droite, merci d'avoir fait une partie de la mise en page de ma thèse avant que l'ordinateur passe par la fenêtre et surtout merci pour ton soutien et ta compréhension.

Enfin, le meilleur pour la fin, je remercie ma famille.

Mes parents et **ma soeur** pour leur soutien sans faille durant toutes ces années, pour leur disponibilité et surtout pour leur écoute.

A **Nathalie** et **Christophe** pour leur grande bonté, leur accueil et leur générosité.

Enfin à mes **grands-parents, Jacqueline, Martial, Marie**, et une pensée particulière pour **Robert**.

Merci pour tout.

Table des matières

Index des Figures	7
Résumé	13
Abstract	15
Liste des abréviations	19
Chapitre I : La voie ecto-F₁-ATPase / P2Y dans les fonctions athéroprotectrices des HDL	27
1. Les lipoprotéines de haute densité (HDL)	28
1.1 Notions de base sur le métabolisme du cholestérol	28
1.2 Biogénèse et structure des HDL	32
1.3 Fonctions athéroprotectrices des HDL	34
1.3.1 Notions de base sur l'athérosclérose	34
1.3.2 Le transport retour du cholestérol	39
1.3.3 Effets pléiotropiques des HDL.....	46
1.3.4 Autres fonctions	51
2. L'ecto-F₁-ATPase : un récepteur de l'apoA-I	52
2.1 L'ATP synthase mitochondriale	52
2.1.1 Notions sur le mécanisme de fonctionnement de la chaîne respiratoire	52
2.1.2 Structure de l'ATP synthase mitochondriale	54
2.1.3 Fonctionnement de l'ATP synthase mitochondriale	56
2.1.4 Régulation de l'activité de l'ATP synthase : importance de l'inhibiteur IF1	57
2.1.5 Pathologies associées à l'ATP synthase	60
2.2 Mise en évidence de la sous unité β de l'ATP synthase comme récepteur de haute affinité de l'apoA-I : implication dans l'endocytose hépatique des HDL	61
2.3 Activité de l'ecto-F₁-ATPase	63
2.4 Fonctions métaboliques et vasculaires de l'ecto-F₁-ATPase	66
2.4.1 Fonction de l'ecto-F ₁ -ATPase dans le catabolisme hépato-biliaire des HDL.....	66
2.4.2 Fonctions de l'ecto-F ₁ -ATPase dans la protection endothéliale vasculaire induite par les HDL.....	72
2.4.3 L'ecto-F ₁ -ATPase dans les fonctions adipocytaires.....	76
2.5 Autres fonctions de l'ecto-F₁-ATPase	78

2.5.1	Angiogenèse.....	78
2.5.2	Cancer.....	79
2.5.3	Neurones.....	83
2.5.4	Kératinocytes.....	85
Chapitre II : L'autophagie		89
1.	Généralités.....	90
2.	Les différents types d'autophagie	91
2.1	L'autophagie dépendante des chaperonnes (CMA).....	91
2.2	La microautophagie.....	92
2.3	La macroautophagie.....	93
3.	Les étapes de l'autophagie.....	95
3.1	Origine de la membrane de l'autophagosome.....	95
3.2	Initiation et nucléation de l'autophagosome	98
3.2.1	Le complexe ULK1/2- atg13-FIP200 ou complexe ULK.....	98
3.2.2	Le complexe Beclin1-VPS34-VPS15.....	99
3.2.3	La protéine atg9.....	101
3.3	Elongation de l'autophagosome.....	102
3.3.1	Le complexe atg12-atg5-atg16L.....	102
3.3.2	Le système atg8/MAP-LC3	102
3.3.3	La protéine atg9.....	104
3.4	Fusion de l'autophagosome avec les lysosomes : l'étape de maturation.....	106
4.	La régulation de l'autophagie.....	109
4.1	L'autophagie dépendante du complexe mTORC1.....	109
4.1.1	Régulation du complexe mTORC1 par les facteurs de croissance	110
4.1.2	Régulation du complexe mTORC1 par les nutriments	111
4.2	L'induction de l'autophagie indépendante de mTORC1	114
5.	Les différents sous-types d'autophagie	118
5.1	Généralités.....	118
5.2	La mitophagie : un exemple d'autophagie sélective	120
6.	Autophagie et dynamique mitochondriale	124
7.	L'autophagie « sécrétoire »	125
7.1	Mise en évidence chez la levure	126
7.2	Autophagie « sécrétoire » et protéines solubles chez les mammifères	127

7.3	Autophagie « sécrétoire » et protéines transmembranaires chez les mammifères	130
8.	Implications physiologiques et physiopathologiques de l'autophagie : au niveau vasculaire et hépatique	132
8.1	L'autophagie au niveau vasculaire	132
8.2	L'autophagie au niveau hépatique	134
	Chapitre III : Résultats expérimentaux et perspectives des travaux	139
	Objectifs du travail	141
	Etude I :	143
	Rôle de l'Adénine Nucléotide Translocase (ANT) dans la régulation de la voie ecto-F ₁ -ATPase d'endocytose des HDL	143
1.	Contexte	145
2.	Article	146
	Ectopic adenine nucleotide translocase activity controls extracellular ADP levels and regulates the F ₁ -ATPase-mediated HDL endocytosis pathway on hepatocytes	147
	Cardouat G ¹ , Duparc T ¹ , Fried S ¹ , Perret B ^{1,2} , Najib S ^{1*} and Martinez LO ^{1*}	147
3.	Perspectives-Conclusions	175
3.1	Caractérisation fonctionnelle de l'ANT de surface	175
3.2	Isoformes de l'ANT présents à la membrane plasmique	178
3.3	Mécanisme d'adressage de l'ANT à la membrane plasmique	179
3.4	Interdépendance des différents acteurs impliqués dans l'endocytose des HDL dépendante de la voie ecto-F ₁ -ATPase/P2Y ₁₃	180
3.5	Relevance physiologique de l'activité de l'ecto-ANT	181
4.	Conclusion	182
5.	Matériels et méthodes supplémentaires	184
5.1	Culture cellulaire	184
5.2	<i>Polymerase chain reaction</i> (PCR)	184
	Etude II :	187
	Implication de l'autophagie dans le mécanisme d'adressage de la F ₁ -ATPase à la membrane plasmique	187
1.	Contexte	189
2.	Matériels et méthodes	191
2.1	Lignées cellulaires	191
2.2	Traitements pharmacologiques	191
2.3	Transfection de si-RNA	192

2.4	Biotinylation des protéines de surface	192
2.5	Western blot.....	193
2.6	Mesure du ratio ADP/ATP extracellulaire.....	195
2.7	Endocytose des HDL.....	195
2.8	Analyses statistiques	196
3.	Résultats expérimentaux	198
3.1	Augmentation de l'expression membranaire de l'ecto-F ₁ -ATPase après induction de l'autophagie	198
3.2	L'adressage de l'ecto-F ₁ -ATPase est dépendant de la formation de l'autophagosome.....	201
3.3	L'inhibition du flux autophagique ne modifie pas l'expression de l'ecto-F ₁ -ATPase.....	204
3.4	Etude de la fonctionnalité de l'ecto-F ₁ ATPase adressée à la membrane plasmique par autophagie	207
4.	Discussion	211
5.	Perspectives	220
5.1	Mécanismes d'adressage de la F ₁ -ATPase à la surface des hépatocytes primaires.....	220
5.2	Etude de la dynamique de translocation de la F ₁ -ATPase par l'autophagie..	221
5.3	Implication de la dynamique mitochondriale dans le processus d'adressage à la membrane plasmique de la F ₁ -ATPase.....	222
5.4	Identification d'autres acteurs moléculaires impliqués dans l'adressage de la F ₁ -ATPase à la surface cellulaire.....	224
5.5	Caractérisation de la relevance physiologique de l'adressage de la F ₁ -ATPase à la membrane plasmique par l'autophagie	225
5.6	Validation de ce mécanisme d'adressage sur d'autres modèles	227
6.	Conclusion.....	228
7.	Matériels et méthodes supplémentaires	229
7.1	Anticorps.....	229
7.2	Inhibiteur de VPS34	229
7.3	si-RNA Drp1 et PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR).....	229
	Conclusion générale	232
	Bibliographie	235
	ANNEXES	256

Index des Figures

Chapitre I : La voie ecto-F₁-ATPase / P2Y dans les fonctions athéroprotectrices des HDL

Figure 1 : Représentation schématique d'une lipoprotéine	28
Figure 2 : Schéma général du transport du cholestérol.....	31
Figure 3 : Représentation schématique d'une artère.....	35
Figure 4 : Etapes du développement d'athérosclérose et rôles protecteurs des HDL	38
Figure 5 : Représentation schématique du transport retour du cholestérol	39
Figure 6 : Endocytose hépatique du cholestérol.....	44
Figure 7 : Schéma bilan du transport retour du cholestérol	45
Figure 8 : Récepteurs et voies de signalisation impliqués dans les effets protecteurs des HDL et de l'apoA-I sur l'endothélium vasculaire	50
Figure 9 : Représentation schématique du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale	53
Figure 10 : Structure de l'ATP synthase mitochondriale.....	54
Figure 11 : Mécanisme de synthèse d'ATP	57
Figure 12 : Représentation simplifiée des isoformes et des domaines de la protéine IF1	58
Figure 13 : Fonctionnement ATPasique de l'ATP synthase mitochondriale	60
Figure 14 : Endocytose hépatique des HDL dépendante de la voie ecto-F ₁ -ATPase/P2Y ₁₃	68
Figure 15 : Fonctions métaboliques et vasculaires de la voie ecto-F ₁ -ATPase/P2Y	75
Figure 16 : Rôle de l'ecto-F ₁ -ATPase à la surface des adipocytes.....	77
Figure 17 : Modèle proposé par S.V Pizzo, du mécanisme d'action de l'angiostatine à la surface des cellules endothéliales et tumorales.....	80
Figure 18 : Rôle de l'ecto-F ₁ -ATPase dans l'immunité anti-tumorale	82
Tableau I : Comparaisons des propriétés physiques des HDL en fonction des techniques de séparation utilisées	32
Tableau II : Localisation génomique et caractéristiques des sous-unités de l'ATP synthase et de la protéine régulatrice ATPIF1 ou IF1	53
Tableau III : Activité enzymatique et ligands associés de la F ₁ -ATPase identifiée à la surface de différentes lignées cellulaires	63
Tableau IV : Phénotype des souris invalidées pour le récepteurs P2Y ₁₃ ou traitées avec des agonistes du récepteur.....	70

Chapitre II : L'autophagie

Figure 19 : Les différents types d'autophagie	94
Figure 20 : Sources potentielles de la membrane de l'autophagosome	97
Figure 21 : Systèmes UBL impliqués dans l'élongation de l'autophagosome	104
Figure 22 : Modèle proposé de formation et d'élongation de la membrane de l'autophagosome	105
Figure 23 : Les signaux de régulation de l'autophagie dépendants du complexe mTORC1	113
Figure 24 : Les signaux de régulation de l'autophagie indépendants du complexe mTORC1	116
Figure 25 : Schéma bilan du mécanisme d'autophagie	117
Figure 26 : Principaux mécanismes de la mitophagie	123
Figure 27 : Mécanisme proposé de la sécrétion d'IL-1 β par l'autophagie	129
Tableau V : Principaux sous-types d'autophagie sélective et récepteurs associés chez les mammifères	119

Chapitre III : Résultats expérimentaux

Etude I : Rôle de l'Adénine Nucléotide Translocase (ANT) dans la régulation de la voie ecto-F₁-ATPase d'endocytose des HDL

Article (Figure 1 à 7)	147
Figure S1 : Expression de l'ANT à la surface des cellules HeLa L'autophagie adresse une ecto-F ₁ -ATPase fonctionnelle à la membrane plasmique	175
Figure S2 : L'ecto-ANT régule les taux d'ADP extracellulaire de façon dépendante de la concentration en nucléotide extracellulaires	176
Figure S3 : RT-PCR effectuée sur des cellules hepG ₂ des différents isoformes de l'ANT	178
Figure 8 : Ecto-ANT : Mécanisme d'action proposé et implication dans l'endocytose des HDL dépendante de l'ecto-F ₁ -ATPase/P2Y ₁₃	183
Tableau I : Amorces utilisées.....	184

Etude II : Implication de l'autophagie dans le mécanisme d'adressage de la F₁-ATPase à la membrane plasmique

Figure 1 : La stimulation de l'autophagie augmente l'expression de la F ₁ -ATPase à la membrane plasmique	200
Figure 2 : L'inhibition de la formation de l'autophagosome abolie l'adressage de l'ecto-F ₁ -ATPase à la membrane plasmique	203

Figure 3 : L'inhibition de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome n'a pas d'effet sur l'expression membranaire de la F ₁ -ATPase	206
Figure 4 : L'autophagie adresse une ecto-F ₁ -ATPase fonctionnelle à la membrane plasmique	208
Figure 5 : L'autophagie induit l'internalisation des HDL de manière spécifique et dépendante de l'ecto-F ₁ -ATPase	210
Figure S1 : La stimulation de l'autophagie régule de manière différente l'expression des complexes respiratoires mitochondriaux à la membrane plasmique	214
Figure S2 : L'inhibition de la formation de l'autophagosome inhibe l'adressage de l'ecto-F ₁ -ATPase à la membrane plasmique induit par la carence nutritive	219
Figure S3 : La fusion mitochondriale pourrait être impliquée dans l'adressage de l'ecto-F ₁ -ATPase à la membrane plasmique	223
Figure 6 : Rôle de l'autophagie dans l'adressage de la F ₁ -ATPase à la membrane plasmique	228
Tableau I : Références du fournisseur des si-RNA utilisés.....	192
Tableau II : Liste des anticorps utilisés pour les expériences de western blot.....	194
Tableau III : Anticorps dirigés contre les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale	229
Tableau IV : Référence fournisseur du si-RNA dirigé contre la protéine Drp1.....	229
Tableau V : Amorces utilisées pour la qRT-PCR.....	230

Conclusion générale :

Figure 28 : Schéma bilan travaux de thèse (études 1 et 2)	233
--	-----

Résumé

L'effet protecteur des HDL sur les pathologies cardio-vasculaires est principalement attribué à leur rôle central dans le "Transport Retour du Cholestérol" (TRC). Ce processus assure l'efflux du cholestérol excédentaire des cellules périphériques vers le foie, au niveau duquel il est éliminé dans les sécrétions biliaires.

Dans ce contexte, notre équipe a identifié à la surface des cellules hépatiques la présence d'un complexe enzymatique, très proche de l'ATP synthase mitochondriale, comme étant un récepteur de haute affinité pour l'apoA-I (protéine majoritaire des HDL). Cette ATP synthase de surface, également appelée ecto-F₁-ATPase, joue un rôle clé dans l'endocytose hépatique des HDL. En effet, la liaison de l'apoA-I stimule l'activité ATPasique de l'enzyme, entraînant la production d'ADP extracellulaire puis l'activation spécifique du récepteur nucléotidique P2Y₁₃, aboutissant *in fine* à l'endocytose des HDL. Ainsi, l'équipe a montré le rôle clé de la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃ dans l'endocytose hépatique des HDL et par conséquent dans les effets protecteurs de ces derniers dans l'athérosclérose.

Les travaux de thèse présentés ici visent à déterminer les mécanismes de régulation de cette ecto-F₁-ATPase.

Compte tenu de l'importance de la régulation des taux d'ADP et d'ATP extracellulaires dans l'endocytose des HDL, nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux acteurs moléculaires qui pourraient réguler le métabolisme nucléotidique à la surface cellulaire. Nous avons mis en évidence la présence, à la surface des cellules HepG₂, de l'adénine nucléotide translocase (ANT), une autre protéine classiquement localisée à la mitochondrie. Nous avons montré que l'ecto-ANT est impliquée dans la régulation des taux des nucléotides adényliques ADP et ATP extracellulaires et que son fonctionnement est lui-même dépendant du taux de ces derniers dans le milieu extracellulaire. De plus, nous avons montré que l'ecto-ANT est également impliquée dans la régulation de l'ADP généré suite à l'activation de l'ecto-F₁-ATPase, régulant ainsi négativement l'endocytose des HDL dépendante de la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes impliqués dans l'adressage de l'ecto-F₁-ATPase à la membrane plasmique. Cette

ecto-F₁-ATPase a été identifiée à la surface de divers types cellulaires où elle est impliquée dans une variété de processus physiologiques et physiopathologiques. Cependant, à l'heure actuelle, le mécanisme d'adressage de cette enzyme à la membrane plasmique reste inconnu.

Nous avons montré que le processus d'autophagie est nécessaire à l'expression de l'enzyme à la membrane plasmique. En effet, nous avons montré que l'autophagie induite par la carence en nutriments augmente l'expression de la F₁-ATPase à la membrane plasmique. De manière intéressante, cette translocation est dépendante de la machinerie impliquée dans la formation de l'autophagosome, mais n'emprunte pas la voie canonique impliquant la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. Nous avons également démontré que l'augmentation d'expression de l'ecto-F₁-ATPase en réponse à l'autophagie est corrélée à une endocytose plus importante des HDL par les hépatocytes, et que cette augmentation est dépendante et spécifique de la voie ecto-F₁-ATPase.

Abstract

The cardioprotective effect of high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) is mostly attributed to their metabolic functions in reverse cholesterol transport (RCT), a process whereby excess cell cholesterol is taken up from peripheral cells and processed in HDL particles, and later delivered to the liver for further metabolism and bile excretion.

ATP synthase, classically known to be located in the mitochondrial inner membrane, has been unexpectedly found expressed at the plasma membrane of hepatocytes, as a receptor for apoA-I, playing a role in HDL-cholesterol uptake. On hepatocytes, apoA-I binding to ecto-F₁-ATPase stimulates extracellular ATP hydrolysis into ADP, which subsequently activates a P2Y₁₃-mediated HDL endocytosis pathway.

The strict dependence of HDL endocytosis on extracellular ADP level led us to study first, whether other plasma membrane proteins than ecto-F₁-ATPase could regulate extracellular ADP level. We highlighted the presence on hepatocytes cell surface of Adenine Nucleotide Translocase (ANT), another transmembrane protein of the inner mitochondrial membrane. We showed that ecto-ANT activity could increase or reduce extracellular ADP level, depending on the extracellular ADP/ATP ratio. Furthermore, we demonstrated that pharmacological inhibition of ecto-ANT activity increased extracellular ADP level when ecto-F₁-ATPase was activated by apoA-I. This increase in the bioavailability of extracellular ADP accordingly translated into an increase of HDL endocytosis in human hepatocytes.

We then sought to explore the molecular mechanisms involved in targeting ecto-F₁-ATPase to the plasma membrane. Indeed, F₁-ATPase ectopic expression at the plasma membrane has been described on several cell types and has been related to several physiological and pathophysiological processes however, the pathway involved in its transport to the cell surface remains unknown.

Here, we demonstrated that the process of autophagy controls the expression of ecto-F₁-ATPase at the plasma membrane. We showed that autophagy induced by nutrient deficiency increases the expression of F₁-ATPase at the plasma membrane. We provided evidence that this translocation is dependent on the

machinery involved in the formation of the autophagosome but does not follow the conventional degradative pathway involving the fusion of the autophagosome with the lysosome. We also demonstrated that increased expression of ecto-F₁-ATPase in response to autophagy translates into higher HDL endocytosis by hepatocytes in an ecto-F₁-ATPase pathway specific and dependent manner.

Liste des abréviations

¹²⁵I : Iode 125

2-MeSAMP : 2-Methylthioadenosine 5'-monophosphate triethylammonium salt hydrate (inhibiteur de P2Y₁₂)

3T3-L1 : Fibroblastes murins (différenciés en adipocytes)

A2P5P : Adenosine 2'-phosphate 5'-phosphate (antagoniste du récepteur P2Y₁)

A549 : Cellules tumorales humaines pulmonaires

Aa : Acides Aminés

ABCA1 : ATP-Binding Cassette 1

ABCG1 : ATP-Binding Cassette sub-family G member 1

ABC-me : ATP Binding Cassette Mitochondrial Erythroid

AcbA : Acyl-CoA Binding protein

ADP : Adénosine Diphosphate

AIF : Apoptosis-Inducing Factor

AK : Adenylate Kinase

Akt : Protein kinase B

AMBRA1 : Autophagy and Beclin 1 Regulator 1

AMP : Adénosine Monophosphate

AMPc : Adénosine Monophosphate cyclique

AMPk : Protéine kinase active par l'AMP (AMP-activated protein Kinase)

ANT : Adénine Nucleotide Translocase

Ap5A : Diadénosine pentophosphate

Apc : Protéine C Activé

Apo : Apolipoprotéine

APP : Protéine précurseur de l'amyloïde (Amyloid Precursor Protein)

ARN : Acide Ribonucléique

Atg : Autophagy related gene

ATP : Adénosine triphosphate

Aβ : protéine β Amyloïde

BAEC : Cellules endothéliales aortiques bovines (Bovine Aorta Endothelial Cells)

BAR : Bin-Ampiphysin-Rvs

Bcl-2 : B-Cell Lymphoma 2

BCL-xL : B-Cell Lymphoma-extra Large

Bif 1 : Endophilin-B1

BLT1 : Blocker of Lipid Transport (inhibiteur de SR-BI)

BNIP3L : BCL2 Interacting Protein 3 Like

CCCP : Carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone

CD36 : Cluster of Differentiation 36
CE : Cholestérol Ester
CEM : Cellules lymphoblastique humaines
CETP : Protéine de transfert des esters de cholestérol (Cholesteryl Ester Transfert Protein)
CFTR : Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator
CL : Cholestérol Libre
CMA : Autophagie dépendante des chaperonnes (Chaperonne-Mediated Autophagy)
CML : Cellules musculaires lisses (Smooth Muscle Cells)
COP : Coat Protein
COS7 : Cellules fibroblastiques rénales de singe
COX4 : Cytochrome c Oxidase subunit 4
Cvt : Cytoplasme to Vacuole Targeting

DAG : Diacylglycéol
DAF : 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate
Deptor : DEP-domain containing mTOR-interacting protein
DFCP1 : Double-FYVE-domain-Containing Protein 1
Drp1 ou DMN1L : Dynamin-1-Like Protein

EB-1 : End-Binding protein-1
EMAP II : Endothelial Monocyte Activating Polypeptide II
eNOS : Synthase endothéliale d'oxyde nitrique (endothelial Nitric Oxide Synthase)
ePAC: Exchange Protein directly activated by cAMP
EPC : Cellules progénitrices endothéliales (Endothelial Progenitor Cells)
ERGIC: Compartiment intermédiaire RE-Golgi (ER to Golgi Intermediate Compartment)
ERK: Extracellular signal-Regulated Kinase
ESCRT: Endosomal Sorting Complex Required for Transport

FADH2 : Flavine adenine dinucléotide
FAM134B : Family with sequence similarity 134 member B
FIP200 : Focal adhesion kinase family-Interacting Protein of 200 kDa
FIS1 : Fission mitochondrial1
FKBP12 : FK506-Binding Protein of 12kDA
FUNDC1 : FUN14 Domain-Containing protein 1
FYVE : Fab-1, YGL023, Vps27, and EEA1

G/ml : Gramme/millilitre
GAPARAP : γ - amino-butyric acid receptor associated-protein
GATE16 : Golgi-Associated ATPase Enhancer of 16kDA
G-Gly : Glycine-extended form of gastrin
GRASP : Golgi Reassembly Stacking Protein

Grh1 : GRASP65 homolog protein 1

HaCat : Kératinocytes immortalisés

HCT-116 : Cellules tumorales humaines coliques

HDL : Lipoprotéines de haute densité (High Density Lipoprotein)

HEK 293 : Cellule embryonnaires humaines rénales (Human Embryonic Kidney cells 293)

HEL : Human Erythroleukemia cells

HeLa : Cellules dérivées d'un cancer du col de l'utérus humain

HepG₂ : Cellules d'hépatocarcinome humain

HIF1- α : Facteur induit par l'hypoxie (Hypoxia Inductible Factor)

HMGB1 : High-Mobility Group Box-1

HPAEC : Cellules endothéliales pulmonaires humaines (Human Pulmonary Artery Endothelial Cells)

HPLC : High performance Liquid Chromatography

Hsc70 : Heat Shock-Cognate protein of 70 kDa

HT-1080 : Cellules de fibrosarcome humaines

HUVEC : Cellule endothéliales de la veine de cordon ombilical (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

I-CAM : Intercellular Adhesion Molecule

IDL : Lipoprotéine de densité intermédiaire (Intermediate Density Lipoprotein)

IF1 : Facteur inhibiteur 1 (Inhibitory Factor1)

IL-1R : Récepteur à l'interleukine 1

IL-1 β : Interleukine-1 β

INCL : Forme infantile de la ceroid-lipofuscinose (Infantile Neuronal Ceroid Lipofuscinose)

IP₃ : Inositol triphosphate

IP₄ : Inositol tetrakisphosphate

IP : Inositol phosphate

JNK1 : C-Jun N-Terminal Kinase

kDa: Kilodalton

LAK : Lymphocyte-activated Killer cell

Lamp : Lysosome-Associated Membrane Glycoprotein 2A

LCAT : Lecithine Cholesterol Acyl Transferase

LDL : Lipoprotéine de basse densité (Low Density Lipoprotein)

LDLox : Lipoprotéines de basse densité oxydées

LDLr : Récepteur des lipoprotéines de basse densité (Low Density Lipoprotein receptor)

LIMP_{II} : Lysosomal Membrane Protein II

LIR : Domaine d'interaction avec LC3 (LC3-Interacting Region)

LK1 : Liver Kinase B1

LPL : Lipoprotéine Lipase
LRP : Récepteur aux lipoprotéines (Lipoprotein Receptor-related Protein)

MAPL : Mitochondria-Anchored Protein Ligase
MAP-LC3 ou LC3 : Microtubule-Associated Protein 1A/1B-Light Chain 3
MCF-7 : Cellules d'adénocarcinome mammaire humaines
MCP-1 : Monocyte Chimioattractant Protein 1
MDV : Vésicules dérivées des mitochondries (Mitochondrial-Derived Vesicles)
MEC : Matrice extracellulaire
MEF : Fibroblastes embryonnaires de souris (Mouse Embryonic Fibroblasts).
MFF : Mitochondrial Fission Factor
Mfn : Mitofusines
MID49/51 : Mitochondrial Dynamics protein of 49kDa
miRNA : Micro ARN
MIRO : Mitochondrial Rho GTPase
mLST8 : Mammalian Level with Sec13 protein 8
Mpl : Myeloproliferative Leukemia virus oncogene
MPP : Mitochondrial Processing Protease
MRS2179 : 2'-Deoxy-N⁶-methyl adenosine 3', 5'-diphosphate diammonium salt (antagoniste du récepteur P2Y1)
mSIN1 : Mammalian Stress-activated mitogen-activated protein kinase interacting protein1
mTOR : Mammalian Target Of Rapamycin
mTORC1: Mammalian Target of Rapamycin Complex 1

NADH : Nicotinamide adénine nucléotide
NARP : Neurogenic muscle weakness Ataxia Retinitis Pigmentosa
NDP52 : Nuclear Domain 10 Protein 52,
NDPK : Nucléoside Diphosphate Kinase
NDUFB8 : NADH Ubiquinone Oxidoreductase Subunit B8
NF κ B : Nuclear Factor-kappa B
NK : Natural Killer
NKR : Natural Killer Receptor
nM : Nanomolaire
NO : Oxyde nitrique (Nitric Oxyde)
NRB1 : Protein phosphatase 1 regulatory subunit 9A
Nrf2 : Nuclear Factor-Like 2

OLT : Organe Lymphoïde Tertiaire
OPA1: Optic Atrophy
OPTN : Optineurine
OSCP : Olygomycin Sensitivity Confering Protein

P2Y : Purinorécepteur
P62/SQTM-1 : Sequestosome-1
PAF-AH : Platelet-Activating Factor Acetylhydrolase
PARL : Presenilin-Associated Rhomboid-Like protease
PAS : Préautophagosomal Structure
PCR : Polymerase Chain Reaction
PDZK1 : PDZ Domain Containing 1
PE : Phosphatidyléthanolamine
Pi : Phosphate Inorganique
PI3-Kinase : Phosphatidylinositol 3-Kinase
PINK1 : PTEN-Induced putative Kinase protein1
PIP2 : Phosphatidylinositol (4, 5)-biphosphate
PIP3 : Phosphatidylinositol (3, 4,5)-triphosphate
PKA : Protéine Kinase A
PL : Phospholipide
PLC ϵ : Phospholipase ϵ
PLTP : Protéine de transfert des phospholipides (Phospholipid Transfert Protein)
PON : Paraoxonase
ppt1 : Palmitoyl Protein Thioesterase 1
PRAS40 : Proline-Rich Akt Substrate of 40 kDA
PtdInsI3P (PI3P) : Phosphatidylinositol-3-phosphate
PtdInsP (PI) : Phosphatidylinositol
PX : Phox homology

RAC : Related C3 botulinum toxin substrate 1
RAG : Ras-related GTP-binding protein
Raptor : Regulated Associated Protein of mTOR
RAS : GTPase-activating protein 1
RE : Réticulum Endoplasmique
Rheb : RAS Homolog Enriched in Brain
RhoA : Ras Homolog gene family, member A
Rictor : Rapamycin Insensitive Companion of mTOR
ROCK1 : Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1
ROS : Dérivés réactifs de l'oxygène (Reactive Oxygen Species)
RCT : Reverse cholesterol transport
RT-PCR : Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction
RUBICON : Run domain Beclin-1-Interacting and cysteine-rich domain-Containing protein

S1P : Sphingosine-1-phosphate
S1PR : Récepteur de la sphingosine-1-phosphate
SDF-2 : Spore Differentiation Factor-2

SDHA : Succinate déshydrogénase subunit A
SNAP29 : Synaptosomal-Associated Protein 29
SNARE : Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor
SR-BI : Récepteur "éboueurs" de classe B, membre 1 (Scavenger Receptor class B member 1)
Src : SRC proto-oncogene tyrosine kinase
Stbd1 : Starch-Binding Domain-containing protein 1

TCR : T-cell Receptor
TG : Triglycérides
TGF-β2 : Facteur de croissance transformant β2 (Transforming Growth Factor β2)
THP-1 : Cellules monocytaires leucémiques humaines
TICE : Excrétion trans-intestinale de cholestérol (Trans-Intestinal Cholesterol Excretion)
TIM/TOM : Translocase of the Inner membrane/Outer membrane
TMEM70 : Transmembrane protein 70
TNF-α : Facteur de nécrose tumorale (Tumor Necrosis Factor)
TRAF6 : TNF Receptor Associated Factor
TRC : Transport retour du cholestérol
TRIM : T cell Receptor (TCR)-Interacting Molecule
TSC1/2 : Tuberous Sclerosis

Ub : Ubiquitine
UBD : Domaine de liaison à l'ubiquitine (Ubiquitine-Binding Domains)
UBL : Ubiquitine-Like-system
ULK1/2 : UNC-51-Like Kinase 1/2
UPS : Ubiquitin-Proteasome System
UQCR2 : Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2
UTR : Région non traduite (Untranslated Transcribed Region)
UVRAG : UV Radiation Resistance-Associated Gene

VAM3P : Vesicle Associated Membrane Protein 3
V-CAM : Vascular Cell Adhesion protein 1
VDAC1 : Voltage Dependant Anion Channel
VLDL : Lipoprotéine de très basse densité (Very Low Density Lipoprotein)
VPS : Vacuolar Sorting Protein

Wip1 : Protein Phosphatase 1D
WIPI : WD repeat domain phosphoinositide-Interacting Protein

YAMC : Cellules de colon de souris (Young Adult Mouse Colon)

Chapitre I : La voie ecto-F₁-ATPase / P2Y dans les fonctions athéroprotectrices des HDL

1. Les lipoprotéines de haute densité (HDL)

1.1 Notions de base sur le métabolisme du cholestérol

Le cholestérol est un composant essentiel de l'organisme impliqué dans la structure des membranes cellulaires. Le cholestérol sert également à la synthèse de nombreuses molécules, notamment les hormones stéroïdiennes et les acides biliaires. Il existe deux voies d'apport du cholestérol au sein de l'organisme :

- L'apport « endogène » contribue pour environ 70% des stocks et correspond au cholestérol synthétisé par l'organisme, majoritairement par le foie.
- L'apport « exogène » contribue pour environ 30% des stocks et correspond au cholestérol fourni par l'alimentation.

Le cholestérol est un composé hydrophobe. Par conséquent, il est transporté au sein de l'organisme avec d'autres lipides tels que les triglycérides ou les phospholipides, au sein de particules spécialisées de haute masse moléculaire appelées lipoprotéines (**Figure 1**).

Ces lipoprotéines sont des assemblages macromoléculaires formés d'un cœur lipidique hydrophobe, composé de lipides apolaires (triglycérides (TG) et cholestérol estérifié (CE)), et d'une monocouche périphérique amphiphile dont les constituants principaux sont les phospholipides (PL), le cholestérol libre (CL) et les apolipoprotéines (apo). Les apolipoprotéines servent à la reconnaissance des lipoprotéines par des récepteurs et des enzymes, et déterminent la fonction et le destin métabolique de la particule.

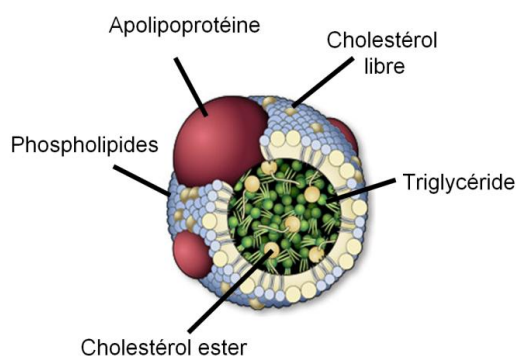


Figure1 : Représentation schématique d'une lipoprotéine

Il existe 5 grandes classes de lipoprotéines. Ces différentes classes diffèrent selon leurs propriétés physiques (taille et densité (d)), mais aussi selon leur composition en lipides et protéines, et selon leur fonction. On distingue : les chylomicrons ($d=0,93$ g/ml), les lipoprotéines de très basse densité ou VLDL (*Very Low Density Lipoprotein*, $0,93 < d < 1,006$), les lipoprotéines de densité intermédiaire ou IDL (*Intermediate Density Lipoprotein*, $1,006 < d < 1,019$), les lipoprotéines de basse densité ou LDL (*Low Density Lipoprotein*, $1,019 < d < 1,063$) et les lipoprotéines de haute densité ou HDL (*High Density Lipoprotein*, $1,063 < d < 1,210$).

Lorsque l'on considère le métabolisme des lipoprotéines, il est classique de distinguer trois types de tissus : l'intestin, le foie et les tissus périphériques. Les études structurelles et fonctionnelles de chacune des particules lipoprotéiques ont permis de distinguer quatre voies impliquées dans le transport intravasculaire du cholestérol (**Figure 2**) :

- **La voie exogène entéro-hépatique permettant le transport du cholestérol d'origine alimentaire de l'intestin vers le foie (Figure 2, I).** Schématiquement, consécutivement aux premières étapes de l'absorption intestinale du cholestérol alimentaire au niveau de la bordure en brosse entérocytaire, le cholestérol est assemblé au sein de structures riches en triglycérides appelées chylomicrons. Chez l'homme, l'apoB-48 est l'apolipoprotéine majoritaire des chylomicrons et est nécessaire à leur assemblage. Les chylomicrons sont sécrétés dans la lymphe mésentérique et rejoignent la circulation sanguine au niveau de la veine sous-clavière gauche. Les chylomicrons subissent alors l'action de la lipoprotéine lipase (LPL), enzyme lipolytique hydrolysant les triglycérides en acides gras libres qui seront majoritairement captés par le tissu adipeux pour le stockage, et par les muscles pour la production d'énergie. La lipolyse des chylomicrons génère des particules résiduelles enrichies en cholestérol estérifié, appelées remnants de chylomicrons. Ces remnants sont catabolisés par les hépatocytes, par l'intermédiaire d'une endocytose récepteur-dépendante, impliquant principalement le récepteur des LDL (LDLr) et le récepteur LRP (*lipoprotein receptor-related protein*).

- **La voie endogène d'apport du cholestérol, du foie aux tissus périphériques (Figure 2, II).** Le cholestérol hépatique, d'origine intestinale ou endogène, est intégré dans des lipoprotéines synthétisées par le foie : les VLDL, dont la protéine majoritaire est l'apoB-100. Comme les chylomicrons, les VLDL sont riches en triglycérides et vont subir l'action de la lipoprotéine lipase (LPL), et libérer ainsi des acides gras au niveau des muscles et du tissu adipeux. Les remnants de VLDL ainsi générés (IDL) subissent l'action d'autres lipases et forment les LDL. Ces dernières pourront être internalisées par le récepteur aux LDL des cellules périphériques (et leur fournir du cholestérol) ou par le récepteur aux LDL des hépatocytes, afin d'éliminer le cholestérol par voie biliaire.

- **La voie de transport retour du cholestérol (*Reverse Cholesterol Transport*, RCT) (Figure 2, III).** Cette voie fait intervenir les particules HDL qui assurent le transport centripète du cholestérol des cellules périphériques vers le foie en vue de son excrétion biliaire. Cette voie, qui sera détaillée dans le paragraphe suivant (1.3.2), constitue la principale voie d'élimination du cholestérol de l'organisme.

- **La voie d'excrétion Trans-Intestinale du cholestérol (TICE)** est une voie plus récemment identifiée. Lors du TICE, le cholestérol circulant est directement absorbé au niveau du pôle basolatéral des entérocytes puis sécrété dans la lumière intestinale afin d'être éliminé dans les fèces. Le TICE est complémentaire de l'excrétion par la voie biliaire. Il permet l'élimination directe du cholestérol sanguin dans la lumière intestinale. Cette voie est encore mal caractérisée, mais plusieurs acteurs moléculaires du TICE ont été identifiés (Temel & Brown 2015).

Ainsi, le métabolisme du cholestérol implique de nombreux acteurs mais également de nombreux échanges entre l'intestin, le foie et les tissus périphériques. Le foie reste cependant l'acteur central de l'homéostasie du cholestérol (**Figure 2**).

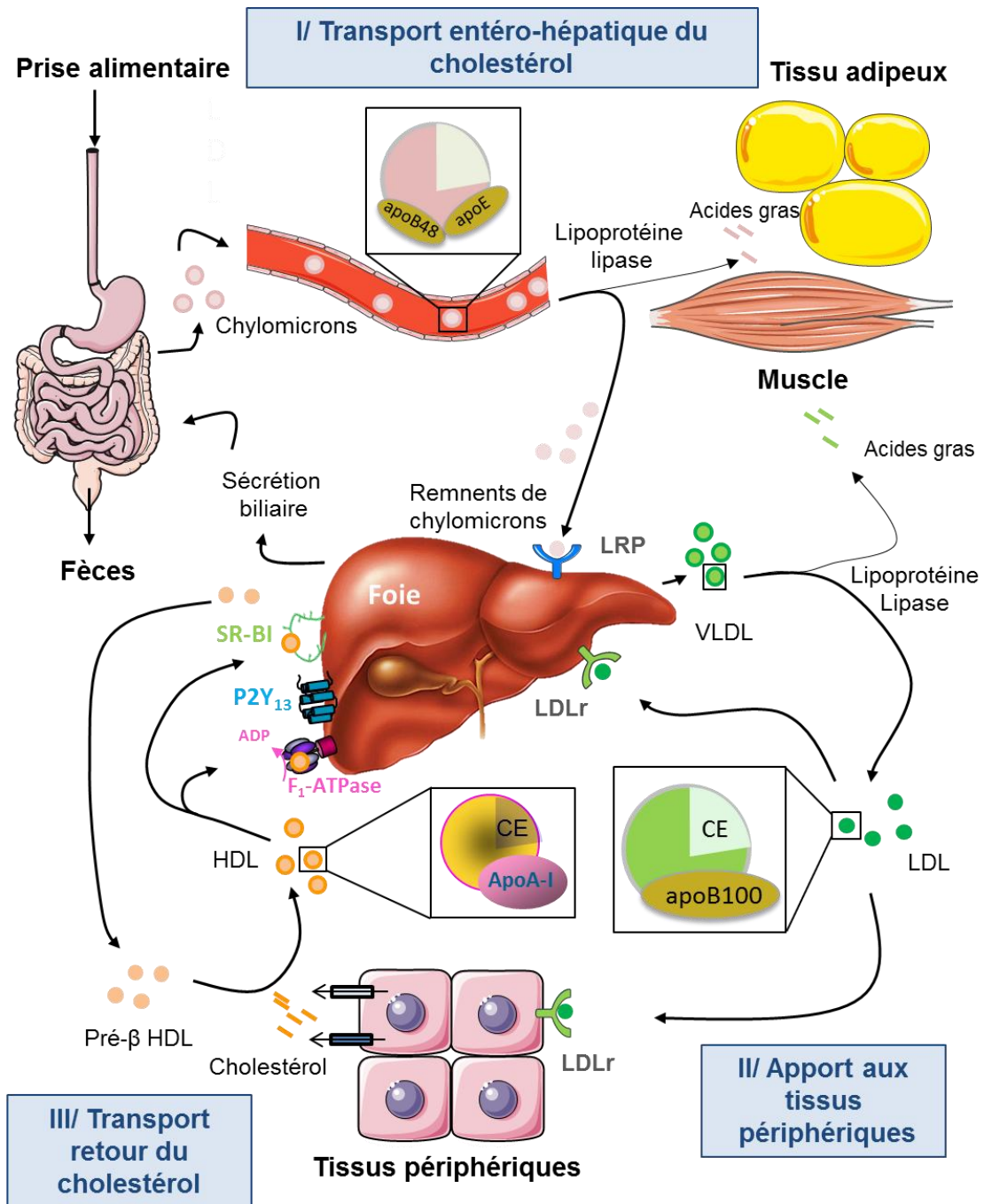


Figure 2 : Schéma général du transport du cholestérol. (I) Le foie est au centre de l'homéostasie du cholestérol. Il stocke le cholestérol d'origine alimentaire provenant des remnents de chylomicrons et assure la majorité de la synthèse endogène. **(II)** Il dirige aussi sa distribution à l'organisme en sécrétant des VLDL dans la circulation sanguine, qui deviennent par la suite des LDL. **(III)** L'homéostasie tissulaire du cholestérol est maintenue grâce à un transport centripète des tissus périphériques au foie. Ce processus est assuré par les HDL qui ramènent le cholestérol des cellules périphériques vers le foie où il sera alors excrété dans la bile soit sous forme de cholestérol libre soit sous forme d'acides biliaires après transformation. Le cholestérol sera ensuite déversé dans l'intestin, où il sera réabsorbé au niveau de l'iléon terminal, ou excrété dans les fèces.

1.2 Biogénèse et structure des HDL

Les HDL sont les lipoprotéines les plus petites (7-13 nm) et denses (1.063-1.210 g/ml). C'est une famille de lipoprotéines hétérogènes, avec des sous-classes qui diffèrent par leur taille, leur densité, leur forme et leur composition.

La séparation des HDL par ultracentrifugation séquentielle permet de les isoler selon leur densité, en deux fractions majeures : les HDL₂, larges et riches en lipides (cholestérol et triglycérides) et les HDL₃ plus petites et plus denses. Ces deux classes peuvent être elles-mêmes sous-fractionnées par d'autres techniques telles que l'électrophorèse sur gel dénaturant de polyacrylamide ou l'ultracentrifugation isopycnique (séparation par gradient de densité), en 5 sous-populations de HDL : HDL_{2b}, HDL_{2a}, HDL_{3a}, HDL_{3b}, HDL_{3c} (**Tableau I**).

D'autre part, la séparation selon leur taille et leur charge par migration électrophorétique en deux dimensions permet d'observer des α -HDL (α 1-HDL, α 2-HDL, α 3-HDL, α 4-HDL) correspondant à des particules sphériques comprenant les HDL₂ et HDL₃ et les pré β -HDL correspondant à un précurseur de forme discoïdale.

Récemment, l'analyse des lipoprotéines par résonance magnétique nucléaire a permis de quantifier le nombre de particules HDL circulantes (μ mol/L), en les classifiant en 3 tailles : HDL de grande taille (9,4 -14 nm), de taille moyenne (8,2 – 9,4 nm) et de petite taille (7,3 – 9,2 nm) (Rosenson et al. 2011) (**Tableau I**).

Dénominations	HDL très larges	HDL larges	HDL moyennes	HDL petites	HDL très petites
Densité (g/ml)	1,063-1,087	1,088-1,110	1,110-1,129	1,129-1,154	1,154-1,21
Diamètre (nm)	9,7-12,9	8,8-9,7	8,2-8,8	8,2-7,8	7,2-7,8
Poids moléculaire (kDa)	410	400	360	200	160
Electrophorèse sur gel dénaturant ou ultracentrifugation	HDL _{2b}	HDL _{2a}	HDL _{3a}	HDL _{3b}	HDL _{3c}
Electrophorèse 2D	α -1	α -2	α -3	α -4	Pré- β HDL
RMN	HDL larges	HDL moyennes		HDL petites	

Tableau I : Comparaison des propriétés physiques des HDL en fonction des techniques de séparation utilisées. D'après Rosenson et al. 2011

L'apolipoprotéine majoritaire des HDL est l'apoA-I (28 kDa) qui représente environ 70% des protéines totales de la particule.

Les HDL naissantes de forme discoïdale (pré- β -HDL) sont synthétisées principalement par le foie et l'intestin ou proviennent du remodelage plasmatique des chylomicrons. Les pré- β -HDL sont de petites tailles et se composent principalement d'apoA-I et de quelques molécules de phospholipides et de cholestérol libre.

Les pré- β HDL vont ensuite acquérir des lipides, notamment du cholestérol libre, des phospholipides et des triglycérides et former des α -HDL de forme sphérique. Ce processus de maturation impliquant différentes enzymes et protéines de transfert des lipides sera détaillé dans le paragraphe 1.3.2.

Parmi les α -HDL, la sous-classe 3c correspond aux particules de plus petite taille alors que les HDL 2b sont des particules de plus grande taille, plus riches en lipides.

En plus de l'apoA-I, plus d'une centaine d'autres protéines ont été identifiées comme étant associées aux HDL (Camont et al. 2011). Les HDL transportent notamment différentes enzymes impliquées dans le métabolisme lipidique, ou ayant des activités anti-oxydantes (exemple : PAF-AH pour *platelet-Activating Factor Acetylhydrolase*, PON1 pour *paraoxonase 1*).

D'autre part, environ 200 espèces lipidiques sont présentes au sein des HDL et peuvent être classées en deux sous-groupes : les lipides hydrophobes présents au cœur de la lipoprotéine (exemple : cholestérol ester, triglycérides), et les lipides amphiphiles présents à la surface de la particule (exemple : sphingosine-1-phosphate, cholestérol libre). Enfin les HDL transportent un grand nombre de petites molécules (vitamines, hormones, acides biliaires) constituant leur métabolome, ainsi que des miRNAs.

Pour conclure, il est important de noter que le protéome, le lipidome et le métabolome diffèrent selon les sous-classes de HDL, leur conférant des propriétés et des fonctions différentes. Pour exemple, l'efflux de cholestérol des tissus périphériques vers les HDL de petite ou de grande taille met en jeu des transporteurs différents. D'autre part, les propriétés anti-inflammatoires ou anti-oxydantes des HDL sont plutôt attribuées au HDL₃ (Camont et al. 2011; Rosenson et al. 2011).

1.3 Fonctions athéroprotectrices des HDL

1.3.1 Notions de base sur l'athérosclérose

Les maladies cardiovasculaires constituent la première cause de mortalité dans le monde (données de l'Organisation Mondiale de la Santé, OMS, 2015). En effet, on estime que les pathologies cardio-vasculaires représentent 31% de la mortalité totale soit 17,5 millions de décès par an.

Différents facteurs de risques de ces pathologies ont été identifiés (âge, sexe, dyslipidémie, tabagisme, diabète, obésité). Ainsi, il est possible de prévenir l'apparition de pathologies cardiovasculaires en s'attaquant aux facteurs de risques environnementaux.

L'athérosclérose est la cause essentielle des maladies cardiovasculaires.

L'athérosclérose a été définie par l'OMS en 1954 comme « une association variable de remaniements de l'intima des artères de gros et moyen calibre consistant en une accumulation locale de lipides, de glucides complexes, de sang et de produits sanguins, de tissu fibreux et de dépôt calcaires ; le tout s'accompagnant de modifications de la media ».

L'athérosclérose siège en particulier au niveau des deux artères coronaires, des artères du cou et des membres inférieurs. Elle provoque le durcissement et l'épaississement des artères ainsi qu'une perte d'élasticité, associés à un dépôt de substances lipidiques et calcaires. Cette pathologie aboutit au rétrécissement voire à l'occlusion de la lumière artérielle. Lorsque la plaque d'athérome se rompt, il se forme un thrombus qui, en fonction de sa localisation, est responsable des infarctus du myocarde (IM), des accidents vasculaires cérébraux (AVC) ou des ischémies aiguës du membre inférieur.

L'artère saine

L'artère saine se compose de trois couches concentriques de cellules (**Figure 3**).

- L'intima, qui se compose d'une monocouche de cellules endothéliales et de la matrice sous-endothéliale. L'endothélium vasculaire représente une barrière sélective entre le sang circulant et les tissus. Cette monocouche de cellules produit par ailleurs un grand nombre de facteurs impliqués dans

- l'homéostasie artérielle, notamment dans le tonus vasculaire, la prolifération des cellules musculaires lisses et l'inflammation.
- La média, délimitée par la limitante élastique interne et la limitante élastique externe, se compose de cellules musculaires lisses (CML) et de matrice extracellulaire (MEC), notamment des fibres de collagène et d'élastine. Il existe différents types d'artères en fonction de leur localisation dans l'arbre artérielle. On les distingue sur la base de leurs diamètres et de la structure de leur média, qui peut être plus ou moins riches en fibres élastiques ou en fibres musculaires.
- L'adventice, longtemps considérée comme un tissu conjonctif peu organisé composé de fibres de collagène, de fibroblastes, de nerfs, et d'une microcirculation appelée le *vaso vasorum*, il est admis aujourd'hui que l'adventice joue divers rôles. Notamment, l'adventice participe à la communication entre les CML et l'endothélium et c'est également l'un des sièges des cellules du système immunitaire.

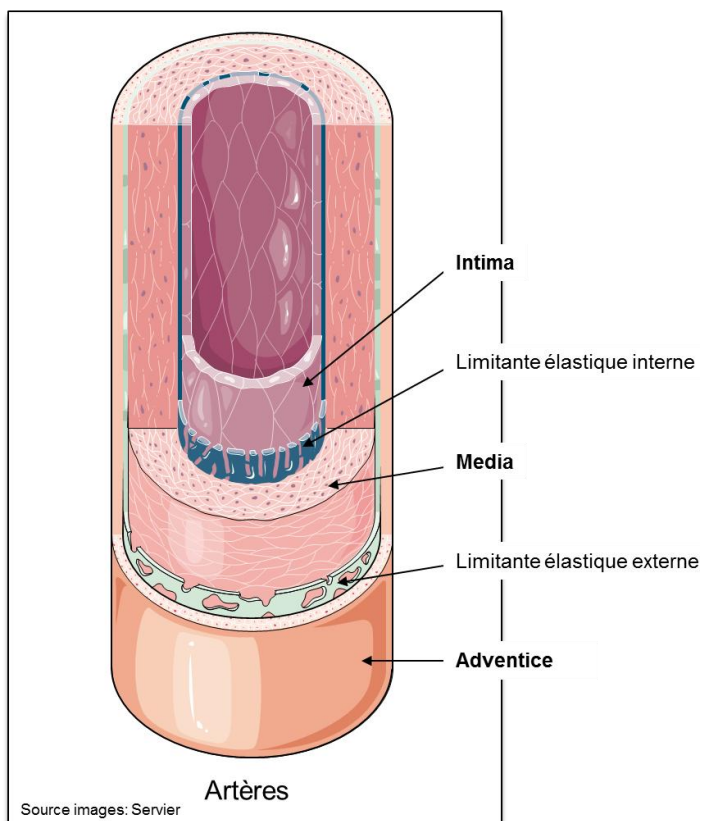


Figure 3 : Représentation schématique d'une artère. L'artère se compose de trois couches concentriques de cellules : l'intima (cellules endothéliales et matrice sous-endothéliale), la média (CML, fibres de collagène et élastique) et l'adventice (tissu conjonctif). La média est délimitée par les limites élastiques interne et externe.

L'athérosclérose

Dans le contexte de l'athérosclérose, l'homéostasie des différentes tuniques décrites dans le paragraphe précédent est altérée. Cette pathologie implique principalement quatre types de cellules, qui sont les cellules musculaires lisses, les monocytes-macrophages, les lymphocytes, et les cellules endothéliales.

Brièvement, l'athérosclérose est initiée par une dysfonction de l'endothélium induite par des stimuli chroniques (hypertension, dyslipidémie, hyperglycémie) sur la paroi artérielle vasculaire. Cette dysfonction endothéliale va conduire à une infiltration et à une accumulation de LDL au sein de l'espace sous-endothélial. Ces LDL vont subir des modifications biochimiques (oxydation, glycation), à l'origine d'une inflammation locale activant l'endothélium. L'endothélium recrute alors les cellules immunitaires circulantes (monocytes, lymphocytes T, cellules dendritiques, mastocytes) qui s'infiltreront dans l'espace sous-endothélial par diapédèse. Les cellules immunitaires peuvent également provenir de l'adventice *via* le *vasa vasorum* (micro-circulation de l'adventice).

Les monocytes recrutés vont se différencier en macrophages qui, en phagocytant les LDL oxydées (LDLox), deviennent des cellules spumeuses. Les CML ont également la propriété de phagocyter les LDLox et de devenir des cellules spumeuses. Les cellules spumeuses contribuent à la formation des stries lipidiques qui caractérisent les premiers stades de l'athérosclérose.

Durant les stades les plus avancés de la pathologie, l'accumulation de lipides ainsi que l'apoptose et la nécrose des cellules spumeuses va conduire à une accumulation de lipides extracellulaires dans l'espace sous-endothélial, formant le cœur lipidique de la plaque. De plus, le statut inflammatoire chronique conduit au recrutement de CML provenant de la média. Ces dernières vont acquérir un phénotype prolifératif et migrer au niveau de l'intima formant la chape fibreuse de la plaque.

Finalement, la thrombose représente le stade le plus avancé de l'athérosclérose. La rupture de la chape fibreuse met à nu une surface thrombogène au niveau de laquelle les plaquettes vont pouvoir s'agréger formant un thrombus qui peut obstruer l'artère (Libby, P.; Ridker, P. M.; Hansson 2011; Lupieri et al. 2015).

L'athérosclérose est donc une pathologie dont le développement s'échelonne sur de nombreuses années, avec plusieurs stades évolutifs, allant de l'infiltration et l'accumulation des LDL dans la paroi, à la plaque compliquée et thrombosée.

Le traitement le plus fréquent de cette pathologie reste la cardiologie interventionnelle qui vise à rétablir le diamètre artériel.

De nombreuses études épidémiologiques ont démontré qu'un taux élevé de HDL-Cholestérol (HDL-C) est corrélé avec une diminution du risque de survenue des maladies cardiovasculaires (Mozaffarian et al. 2016).

Le rôle protecteur des HDL est majoritairement attribué à leur fonction centrale dans le transport retour du cholestérol (TRC) (Francis 2010). Les HDL exercent également des effets bénéfiques directs sur la paroi vasculaire, de par leurs propriétés anti-inflammatoires, anti-thrombotiques anti-oxydantes et cytoprotectrices. Ces propriétés athéroprotectrices des HDL, indiquées sur la **Figure 4**, seront davantage détaillées dans les paragraphes suivants.

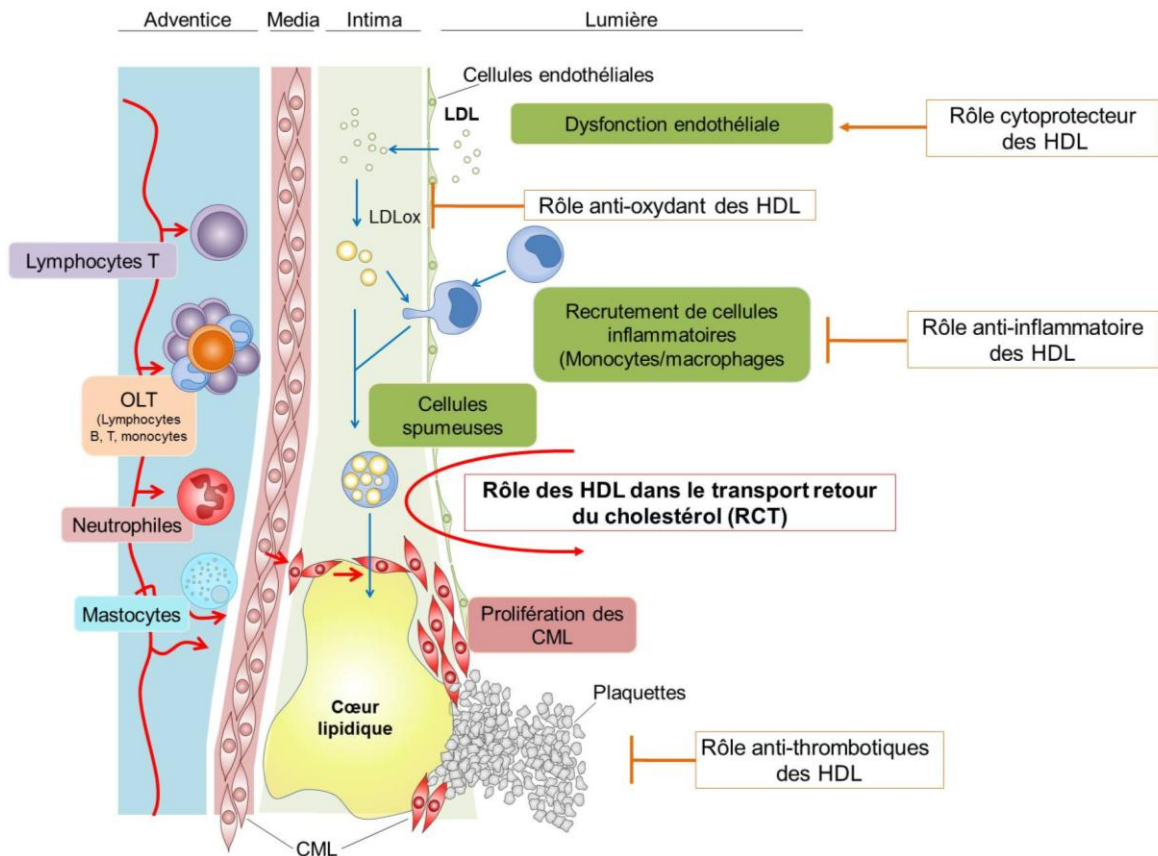


Figure 4 : Etapes du développement de l'athérosclérose et rôles protecteurs des HDL. L'athérosclérose est initiée par une dysfonction de l'endothélium vasculaire induite par des stress chroniques. Cette dysfonction entraîne une infiltration et une accumulation de LDL dans l'espace sous-endothélial. Ces LDL vont s'oxyder et activer l'endothélium qui pourra recruter les cellules du système immunitaire. Les monocytes recrutés se différencient en macrophages qui vont phagocyter les LDL oxydées. Les cellules inflammatoires peuvent également provenir de l'adventice. Les macrophages chargés en LDLox vont se transformer en cellules spumeuses, composant le cœur lipidique de la plaque. La chape fibreuse se compose de CML ayant migrées de la média vers l'espace sous-endothélial.

Durant les stades avancés de l'athérosclérose, la rupture de la chape fibreuse conduit à la formation d'un thrombus qui va obstruer la lumière du vaisseau.

Les HDL exercent des fonctions protectrices contre le développement de l'athérosclérose. D'après Lupieri et al. 2015. OLT : *organes lymphoïdes tertiaires*.

1.3.2 Le transport retour du cholestérol

L'effet protecteur des HDL sur le développement de l'athérosclérose est principalement attribué à leur rôle central dans le transport retour du cholestérol (*Reverse cholesterol Transport, RCT*), qui assure le transport centripète du cholestérol des tissus périphériques vers le foie en vue de son excrétion biliaire (**Figure 5**).

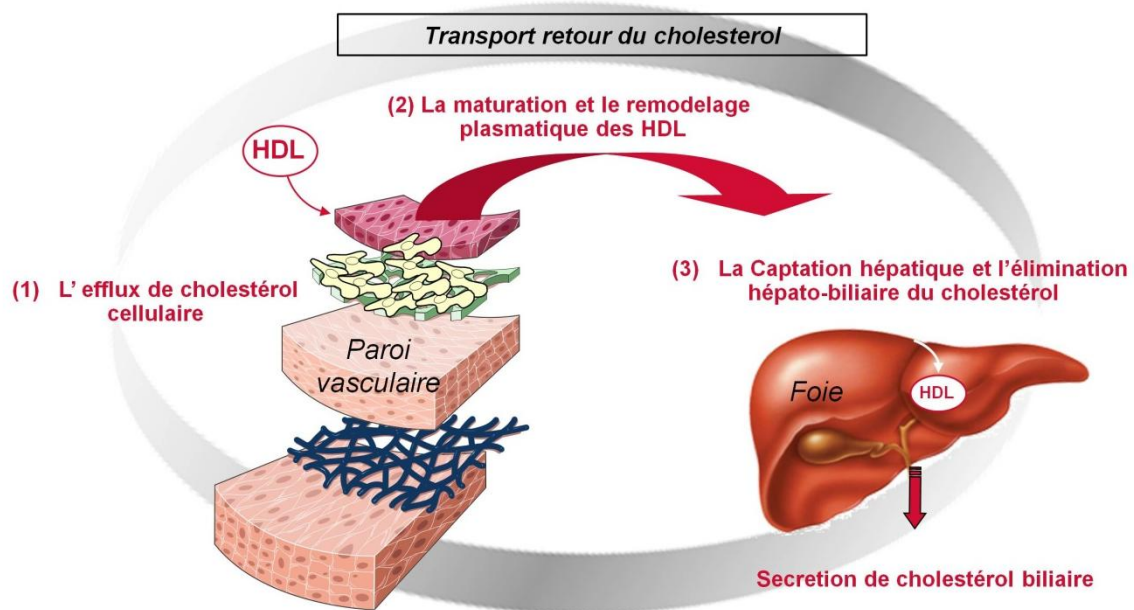


Figure 5 : Représentation schématique du transport retour du cholestérol. Le transport centripète du cholestérol des tissus périphériques vers le foie se décompose en 3 étapes successives **(1)** L'efflux du cholestérol des cellules périphériques, et particulièrement des cellules spumeuses de la paroi vasculaire, vers les particules HDL natives ou pré β -HDL **(2)** Les particules HDL deviennent matures (α -HDL) après un processus de maturation plasmatique puis sont prises en charge par le foie **(3)**. Au niveau du foie, le cholestérol issu des HDL est préférentiellement sécrété dans la bile, soit sous forme de cholestérol libre, soit sous forme d'acides biliaires, après transformation.

Le transport retour du cholestérol peut se décomposer en trois étapes qui mettent chacune en jeu différents acteurs et mécanismes de régulation que nous allons maintenant brièvement décrire.

L'efflux du cholestérol cellulaire : première étape du RCT

Les HDL natives, ou HDL discoïdales, ou pré β -HDL, sont les accepteurs initiaux du cholestérol cellulaire. Ces particules sont essentiellement constituées d'une molécule d'apoA-I et de quelques molécules de phospholipides. Bien que ne représentant qu'environ 5% de l'apoA-I plasmatique totale, les pré β -HDL sont métaboliquement très actives et ont une vitesse de renouvellement très rapide.

Les pré β -HDL peuvent résulter d'une production directe par différentes cellules, principalement les hépatocytes et entérocytes. Elles peuvent également être issues du catabolisme des chylomicrons. En effet, l'hydrolyse par la lipoprotéine lipase (LPL), des triglycérides du cœur hydrophobe des chylomicrons, conduit à la libération de phospholipides et d'apoA-I pour former des pré β -HDL. Enfin ces dernières peuvent être générées secondairement au remodelage des HDL matures (ou α -HDL) par la CETP (*Cholesteryl ester transfer protein*), la PLTP (*Phospholipid transfer protein*) et la lipase hépatique (Gautier et al. 2011).

Ces pré β -HDL vont acquérir du cholestérol des tissus périphériques et particulièrement des cellules spumeuses de la paroi vasculaire. Ce mécanisme va avoir lieu *via* un efflux passif, ou *via* un efflux actif dépendant de différents récepteurs et transporteurs (**Figure 7**).

- **L'efflux passif** se fait par diffusion bi-directionnelle selon un gradient de concentration en cholestérol entre la particule de HDL et la cellule donneuse. Cette diffusion serait facilitée par le récepteur SR-BI qui favoriserait l'ancrage des HDL à la membrane plasmique (*Scavenger receptor class B type 1*) (Phillips 2014).
- **L'efflux actif** est dépendant de l'activité du transporteur ABCA1 (*ATP-binding cassette-A1*) (Phillips 2014). Celui-ci permet l'efflux de phospholipides membranaires vers les pré β -HDL, un prérequis nécessaire à l'efflux du cholestérol vers les particules acceptrices (Hamon et al. 2000). Cet efflux *via* ABCA1 représenterait la voie principale et initiale d'efflux du cholestérol cellulaire. Ce rôle clé a été mis en évidence par l'étude de maladies familiales liées à un déficit en HDL telles que la maladie de Tangier, qui résulte de mutations du gène ABCA1. Ces patients présentent une quasi-absence de HDL dans le plasma et un efflux de cholestérol des

cellules périphériques extrêmement réduit, ce qui conduit, malgré un taux de cholestérol très faible, à une athérosclérose accélérée (Rogler et al. 1995). La construction de modèles animaux de souris déficientes pour ABCA1 a permis de confirmer le rôle crucial de ce transporteur dans l'efflux de phospholipides et de cholestérol (Aiello et al. 2002).

- **L'efflux actif** est également dépendant du transporteur ABCG1 (*ATP-binding cassette sub-family G member 1*) qui permettrait l'efflux du cholestérol cellulaire vers des HDL matures de plus grande taille (α -HDL) (Tall et al. 2008) (**Figure 7**).

La maturation et le remodelage des HDL : étapes intravasculaires du RCT

Les HDL chargées en cholestérol vont subir un remodelage intra-plasmatique, permettant leur maturation (**Figure7**).

Dans le plasma, le cholestérol des HDL est estérifié par l'action de la LCAT (*lecithin : cholesterol acyltransferase*), qui permet la formation de HDL₃ (Jonas 2000). Ces HDL₃ deviennent des HDL₂ lorsqu'elles s'enrichissent en triglycérides et s'appauvrissent en esters de cholestérol par échange avec les VLDL et les IDL, principalement grâce à l'action de la CETP (*Cholesteryl Ester Transfer Protein*). Cet échange avec l'ensemble VLDL-IDL peut offrir une voie alternative de retour du cholestérol depuis les tissus périphériques vers le foie. En effet, ces esters de cholestérol peuvent ensuite être pris en charge par le récepteur aux LDL hépatique par la liaison de l'apoB-100 (Fielding & Fieldinst 1995). Cet échange peut également court-circuiter le transport retour du cholestérol puisque ce dernier, par le biais des LDL, peut également être ramené aux tissus périphériques.

La PLTP permet quant à elle le transfert de phospholipides des VLDL-LDL vers les HDL. Ce processus altère la composition des lipoprotéines et conduit au relargage d'apoA-I libre dans la circulation (Jiang et al. 2012). La PLTP permet également la fusion de 2 particules de HDL₃, ce qui conduit à la formation de HDL₂ et de pré β -HDL (Lagrost et al. 1998).

Finalement, les lipases hépatiques et endothéliales permettent l'hydrolyse des triglycérides et des phospholipides contenus dans les HDL₂. Ce mécanisme permet la formation de remnants de HDL₂ (appauvries en TG) et de pré β -HDL.

Les remnants de HDL₂ sont préférentiellement captés par le foie et les préβ-HDL retournent dans la circulation générale pour participer à l'efflux du cholestérol (Barrans et al. 1994).

La captation hépatique des HDL et l'élimination hépato-biliaire du cholestérol : étapes finales du RCT

Comme évoqué dans le paragraphe précédent, la CETP, en transférant du cholestérol des HDL vers les VLDL-IDL, constitue une première voie possible de retour du cholestérol depuis les tissus périphériques vers le foie. Cependant plusieurs études ont montré que le cholestérol ; ainsi que les phospholipides de la bile proviennent quasi exclusivement des HDL (Chanussot et al. 1990; Robins & Fasulo 1997; Portal et al. 1993). Ceci indique que le cholestérol des HDL est spécifiquement sécrété dans la bile, et fragilise l'hypothèse d'une voie alternative de transport retour du cholestérol *via* l'action de la CETP. Ainsi, la captation des HDL par le foie constitue l'étape finale et essentielle de la voie du transport reverse du cholestérol.

A ce jour, deux voies de captation hépatique des HDL ont été mises en évidence :

- **La voie de captation sélective des esters de cholestérol *via* SR-BI**

Historiquement, il a été mis en évidence que les esters de cholestérol transportés par les HDL étaient captés de manière bien plus importante que les apolipoprotéines des HDL, donnant naissance au terme de captation sélective des esters de cholestérol. Il a ensuite été mis en évidence que cette captation sélective était médiée par SR-BI.

SR-BI est une glycoprotéine de 509 acides aminés qui appartient à la famille des récepteurs « éboueurs » (*scavenger*) de classe B, comprenant CD36 et LIMPII (*Lysosomal membrane protein II*). Initialement identifié chez le rongeur comme étant capable de lier les LDL natives et modifiées (oxydées ou acétylées), il s'est ensuite distingué par sa capacité à lier les HDL (Acton et al. 1996). Son homologue humain, CLA-1 (*CD36 and LIMPII analogous-1*), semble présenter les mêmes propriétés (Calvo et al. 1997). SR-BI est préférentiellement exprimé au niveau des organes utilisateurs de cholestérol tels que le foie et les tissus stéroïdogènes (Acton et al. 1996). SR-BI est ancré à la membrane plasmique par

deux domaines transmembranaires et présente une large boucle extracellulaire qui possède de nombreux sites de glycosylation (**Figure 6**). C'est cette boucle qui semble impliquée dans le transport sélectif des lipides (Gu et al. 1998).

De nombreuses études impliquant diverses approches méthodologiques, telles que la surexpression ou l'inactivation du gène codant pour SR-BI chez la souris, ont mis en évidence le rôle de ce récepteur dans l'entrée sélective des esters de cholestérol des HDL dans le foie, ainsi que dans les glandes surrénales (Wang et al. 1996; Combettes- & Jacqueline 1999). Du fait de sa capacité à lier les autres classes de lipoprotéines, SR-BI contrôle la concentration plasmatique des HDL, VLDL et LDL. Notamment, l'inactivation spécifique de SR-BI au niveau du foie est associée à une augmentation du taux de cholestérol contenu dans ces 3 classes de lipoprotéines, qui se traduit par une augmentation du développement de l'athérosclérose par rapport aux souris contrôles (Huby et al. 2006). Inversement, la surexpression hépatique de SR-BI chez la souris entraîne une diminution de la concentration plasmatique en cholestérol, associée à une augmentation de la concentration de cholestérol sécrété dans la bile (Kozarsky et al. 1997).

- **La voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃ d'endocytose de l'holoparticule HDL**

Notre laboratoire a pu mettre en évidence la présence de la sous-unité β de la F₁-ATPase mitochondriale à la surface des hépatocytes (Martinez et al. 2003), où elle joue le rôle de récepteur de haute affinité pour l'apoA-I, protéine majoritaire des HDL. La liaison de l'apoA-I sur ce récepteur stimule son activité d'hydrolyse de l'ATP (Adénosine triphosphate) extracellulaire en ADP (Adenosine Diphosphate) et Phosphate inorganique (Pi). Sur les hépatocytes, l'ADP extracellulaire ainsi généré va spécifiquement activer le récepteur purinergique P2Y₁₃. Ce processus déclenche une voie de signalisation intracellulaire responsable de l'endocytose de l'holoparticule HDL ou holo-HDL (partie protéique et lipidique) par un récepteur de basse affinité dont l'identité reste encore inconnue (Martinez et al. 2003; Malaval et al. 2009; Fabre et al. 2010) (**Figure 6 & Figure 7**).

Durant ma thèse, je me suis intéressé à la régulation de la F₁-ATPase dans cette voie d'endocytose des HDL, qui sera davantage détaillée dans la deuxième partie de ce chapitre.

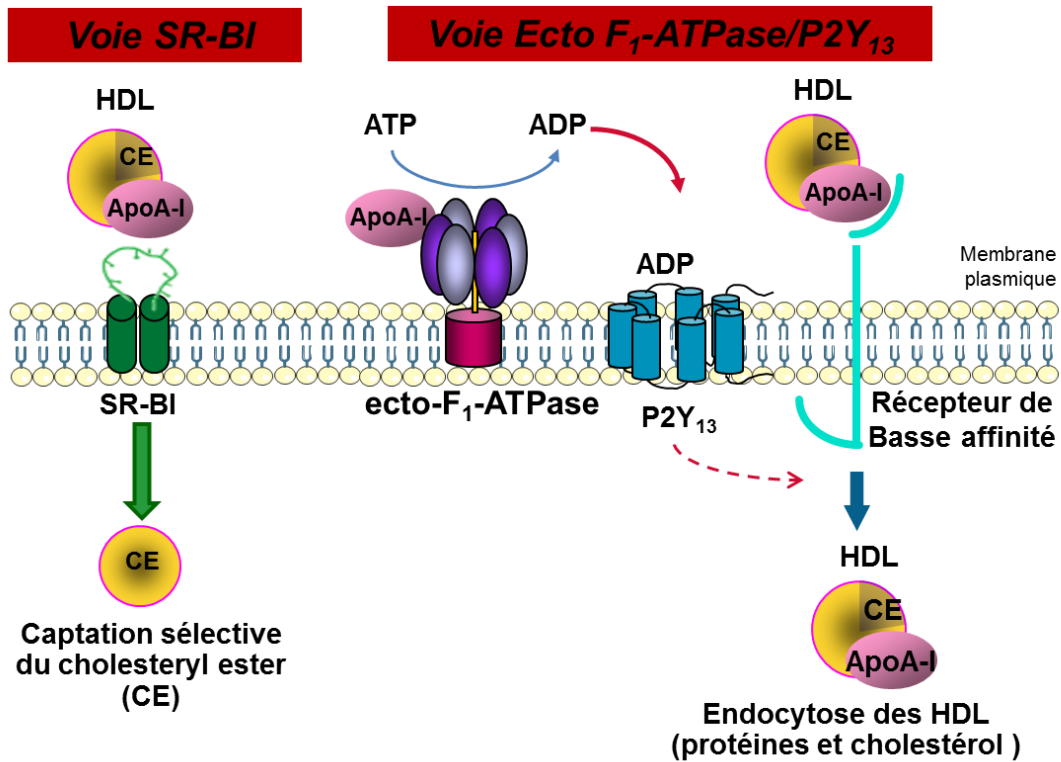


Figure 6 : Endocytose hépatique du cholestérol. Le récepteur SR-BI est impliqué dans la captation sélective du cholestérol estérifié contenu dans les HDL. La voie F_1 -ATPase/ $P2Y_{13}$ est impliquée dans l'endocytose de la particule HDL entière (holo-HDL). Au sein de cette voie, l'activation de l'ecto- F_1 -ATPase par l'apoA-I génère de l'ADP extracellulaire qui active le récepteur purinergique $P2Y_{13}$. Ce processus déclenche une voie de signalisation intracellulaire responsable de l'endocytose de la particule entière de HDL par un récepteur de basse affinité.

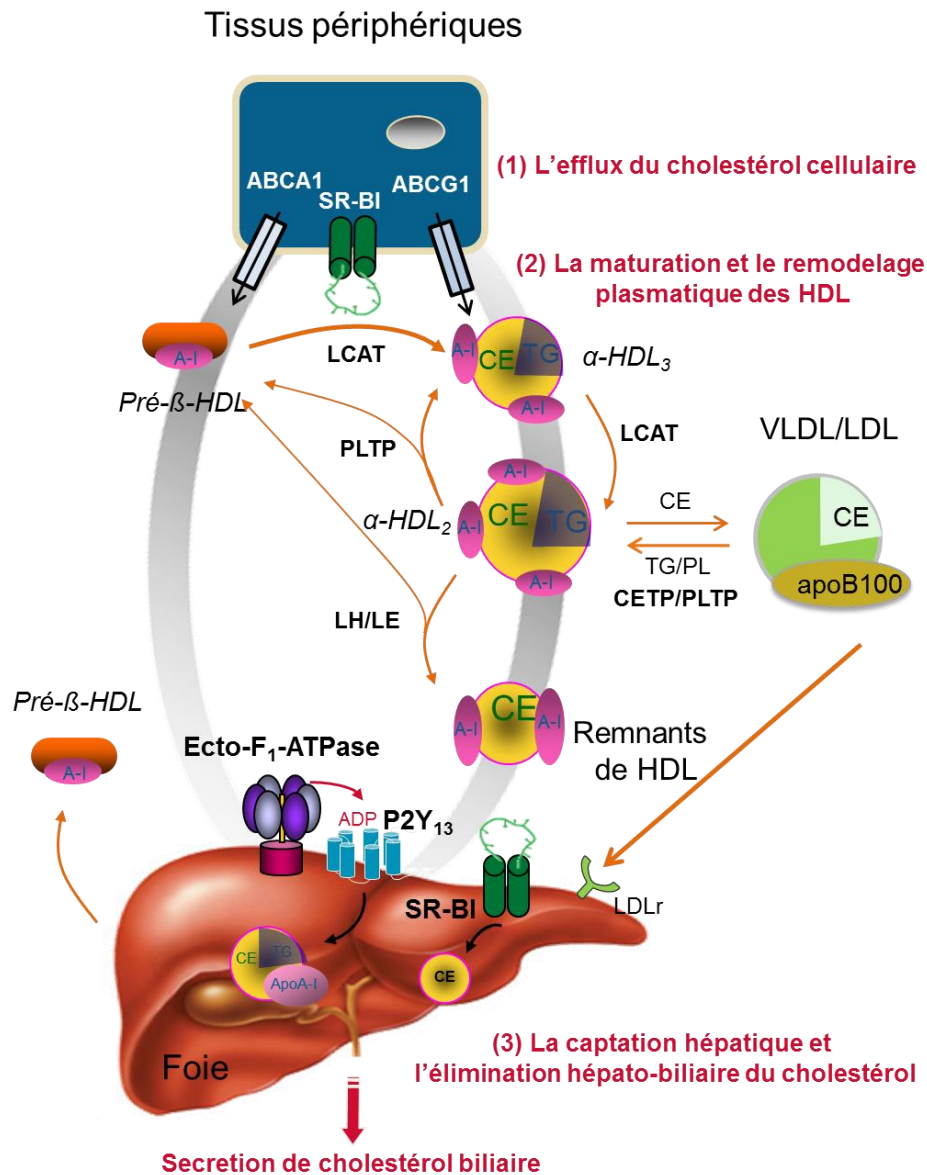


Figure 7 : Schéma bilan du transport retour du cholestérol. (1) Les préβ-HDL sont principalement produites par le foie et l'intestin mais peuvent également être issues du remodelage plasmatique des HDL par les lipases hépatiques et endothéliales (LH, LE) et la PLTP, ou du catabolisme des chylomicrons à travers l'hydrolyse par la LPL. Les préβ-HDL acquièrent du cholestérol issu des cellules périphériques, particulièrement des cellules spumeuses de la paroi artérielle, principalement sous l'action du transporteur ABCA1. (2) La LCAT permet l'estérification du cholestérol acquis formant des α-HDL. Ces derniers peuvent acquérir du cholestérol cellulaire *via* ABCG1. Le cholestérol ester peut être transféré aux VLDL-LDL sous l'action de la CETP. Des phospholipides peuvent être transférés des VLDL-LDL au HDL *via* la PLTP. Les triglycérides et les phospholipides des HDL matures peuvent être hydrolysés par les LH/LE formant des restes de HDL préférentiellement captés par le foie. (3) Le cholestérol des HDL est endocyté par le foie, soit par le récepteur SR-BI, qui participe à la capture sélective des esters de cholestérol des HDL, soit par la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃ qui participe à l'endocytose de la particule HDL entière, ou holo-particule. Enfin le cholestérol issu des HDL est préférentiellement éliminé dans la bile.

Finalement, la sécrétion biliaire constitue la principale voie d'excrétion du cholestérol de l'organisme. Différents mécanismes moléculaires participent à l'élaboration de la bile et les contributions relatives des différentes classes de lipoprotéines (VLDL, LDL et HDL) à ce processus ne sont pas identiques. En effet, la nature des particules lipoprotéiques détermine le devenir métabolique du cholestérol qu'elles contiennent (Schwartz et al. 1978; Cohen 1999; Carey 1997). Ainsi, le cholestérol des HDL entrant dans l'hépatocyte est métabolisé par une voie extralysosomale, il est dirigé directement vers les canalicules biliaires et constitue la principale source du cholestérol biliaire (Chanussot et al. 1990; Robins & Fasulo 1997; Portal et al. 1993). Le cholestérol issu des HDL₃ serait préférentiellement sécrété sous forme de cholestérol libre contrairement à celui transporté par les HDL₂, préférentiellement sécrété après transformation en acides biliaires (Botham & Bravo 1995). Contrairement aux HDL, les particules LDL internalisées par les hépatocytes empruntent une voie de dégradation lysosomale. Dans ce dernier cas, le cholestérol des LDL peut être utilisé pour la synthèse des acides biliaires mais il peut également être stocké et potentiellement remis en circulation (Schwartz et al. 1978; Cohen 1999; Carey 1997).

1.3.3 Effets pléiotropiques des HDL

En plus de leur rôle dans le transport retour du cholestérol, les HDL exercent, *via* leurs propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-thrombotiques et cytoprotectrices, des effets bénéfiques directs sur l'endothélium vasculaire.

Propriétés anti-oxydantes

Comme nous l'avons vu précédemment, l'oxydation des LDL dans la paroi vasculaire est fortement impliquée dans l'athérogénèse. Les HDL transportent certaines protéines et enzymes exerçant des fonctions anti-oxydantes telles que l'apoA-I, PON1 (paraoxonase 1) et PAF-AH (*platelet-Activating Factor AcetylHydrolase*) (Navab et al. 2000). En effet, les lipides hydroperoxydés (LOOH) peuvent être réduits en lipides hydroxydés par l'apoA-I (Garner et al. 1998), alors que PON1 et PAF-AH assurent l'hydrolyse des phospholipides oxydés des LDL (Shih et al. 1998; Marathe et al. 2003).

Enfin, les HDL transportent également des lipides hydroxydés ce qui permettrait leur élimination de la circulation par le foie (Bowry et al. 1992). Chez le rat, une étude a démontré que le récepteur SR-BI est impliqué dans l'endocytose hépatique du cholestérol estérifié oxydé (Fluiter et al. 1999).

Propriétés anti-inflammatoires

Comme nous l'avons vu, l'athérosclérose est une pathologie inflammatoire chronique, se caractérisant par une accumulation de macrophages et de lymphocytes dans l'espace sous-endothélial.

Cockerill et al. ont démontré pour la première fois que les HDL avaient la capacité d'inhiber l'inflammation *in vitro* (Cockerill et al. 1995). En particulier, sur des cellules endothéliales préalablement activées avec des facteurs pro-inflammatoires tels que TNF α ou IL-1, les HDL ont la capacité d'inhiber l'expression des protéines VCAM-1 (*Vascular cell adhesion protein 1*), ICAM-1 (*InterCellular Adhesion Molecule-1*) et E-sélectine, nécessaires à l'adhésion des leucocytes (Cockerill et al. 1995; Baker et al. 1999). Ce mécanisme d'inhibition d'expression des molécules d'adhésion induit par les HDL serait dépendant de l'activation de la eNOS, en aval du récepteur SR-BI (Kimura et al. 2006).

Les HDL inhibent également l'expression de la molécule d'adhésion CD11b, essentiellement *via* l'apoA-I. CD11b, présente à la surface des monocytes et des neutrophiles, interagit avec V-CAM-1 et I-CAM-1 exprimés sur les cellules endothéliales. Cette inhibition ferait intervenir le récepteur SR-BI et le transporteur ABCA1 (Murphy et al. 2008; Murphy et al. 2011).

Les HDL, par l'intermédiaire de la paraoxanase 1, inhibent aussi la production de la chimiokine MCP-1 (*monocyte chemoattractant protein 1*), impliquée dans le chimiotactisme des monocytes (Mackness et al. 2004). Enfin, les HDL stimulent la production de cytokines anti-inflammatoires par les cellules endothéliales, telles que TGF- β 2 (*transforming growth-factor β 2*), (Norata 2005).

Propriétés cytoprotectrices

La dysfonction endothéliale est à l'origine de l'initiation du processus d'athérosclérose. Les HDL contribuent à l'intégrité de l'endothélium vasculaire en stimulant la vasodilatation artérielle, la prolifération, la migration et la survie des cellules endothéliales.

Sur les cellules endothéliales, la liaison des HDL sur SR-BI et sur les récepteurs à la sphingosine-1-phosphate (S1P-R_{1,3}), un sphingolipide transporté par les HDL, active la NO synthase endothéliale (eNOS). Ce mécanisme est induit par l'activation de la voie PI3K (*phosphoinositide 3-kinase*) – Akt, qui va activer la eNOS par phosphorylation (Mineo et al. 2003; Kimura et al. 2010) (**Figure 8**).

Les HDL fournissent également du cholestérol aux cavéoles, ce qui maintient la localisation de la eNOS dans les cavéoles, et contribue au maintien de son activité (Uittenbogaard et al. 2000) Il a été également démontré que les HDL augmentent directement le temps de demi-vie de la eNOS (Rämet et al. 2003). Le NO ainsi produit est un puissant vasodilatateur, qui empêche également la production des molécules d'adhésion leucocytaires I-CAM et V-CAM, et stimule la survie et la prolifération des cellules endothéliales en inhibant leur apoptose (Cooke 2003).

L'activation des récepteurs S1P-R et SR-BI par les HDL stimule également la prolifération et la migration des cellules endothéliales par l'activation d'une voie de signalisation dépendante des petites GTPases RAS, de RAC (*related C3 botulinum toxin substrate 1*) et de ERK (*Extracellular signal-Regulated Kinase*) (Seetharam et al. 2006; Kimura et al. 2003).

D'autre part, la S1P, l'apoA-I et les HDL inhibent les différentes voies d'apoptose des cellules endothéliales incluant la voie intrinsèque dépendante des caspases, la voie extrinsèque dépendante des récepteurs de mort, et la voie dépendante de l'AIF (*Apoptosis-inducing factor*) et de l'endonucléase G.

De multiples facteurs pro-athérogènes tels que les LDLox et le TNF α , induisent l'apoptose des cellules endothéliales dépendante de la concentration en calcium intracellulaire. Ainsi, l'activité anti-apoptotique des HDL est attribuable à l'effet inhibiteur de l'apoA-I sur l'augmentation de calcium intracellulaire induit par les LDL oxydées (Suc et al. 1997). L'activation de la voie Akt par la S1P inhibe également les protéines pro-apoptotiques, notamment BAD (*Bcl-2 Associated*

Death Promoter), ce qui pourrait activer certaines protéines anti-apoptotiques, notamment bcl-xL (*B Cell Lymphoma-Extra Large*) (Nofer et al. 2001) (**Figure 8**).

Les HDL contribuent également à la réparation de l'endothélium lors d'une lésion en recrutant les progéniteurs des cellules endothéliales, EPCs (*Endothelial progenitor Cell*). En effet, l'injection de HDL reconstituées dans un modèle de souris pro-athérogène (invalidé pour l'apoE) induit une augmentation du nombre d'EPCs incorporés dans l'endothélium (Tso et al. 2006). *In vitro*, les HDL agiraient sur la différenciation et la fonctionnalité des EPCs *via* l'activation de SR-BI, PI3K/akt, MAPK (*Mitogen-Activated Protein Kinases*) et sur la eNOS (Feng et al. 2009; Q. Zhang et al. 2010; Sumi et al. 2007).

Finalement, l'apoA-I des HDL, en se liant à l'ecto-F₁-ATPase exprimée à la surface des cellules endothéliales, stimule la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose induite par la privation en sérum (Radojkovic et al. 2009). D'autres études ont également mis en évidence un rôle de l'ecto-F₁-ATPase dans la transcytose des HDL à travers les cellules endothéliales et dans la réparation endothéliale par les EPCs (*endothelial progenitor cell*) (Cavelier et al. 2012; González-Pecchi et al. 2015). Ces différentes fonctions de l'ecto-F₁-ATPase dans la protection endothéliale seront détaillées dans la section suivante (2-3-3).

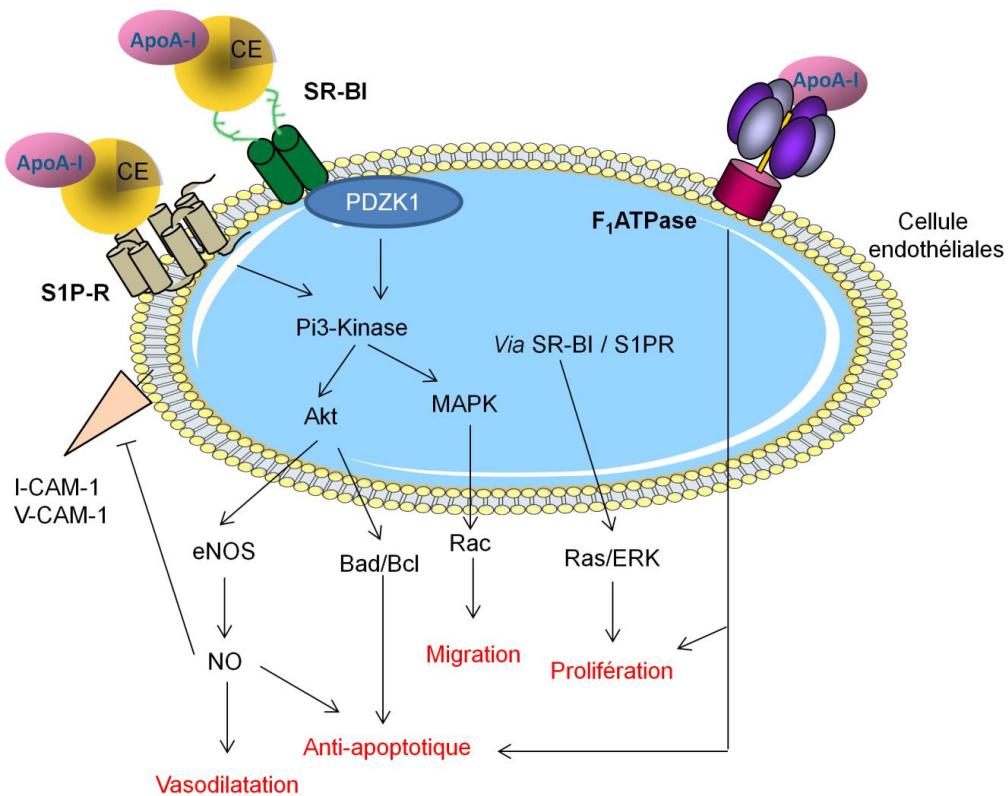


Figure 8 : Récepteurs et voies de signalisation impliqués dans les effets protecteurs des HDL et de l'apoA-I sur l'endothélium vasculaire.

Les HDL se lient au récepteur SR-BI ou S1P-R *via* le S1P qu'ils transportent. Ceci induit l'activation des voies PI3K/Akt et MAPK impliquées dans la survie, la migration et la prolifération cellulaire ainsi que dans la production de NO. Ce dernier permet la vasodilatation artérielle, exerce un effet anti-apoptotique et inhibe l'expression des molécules d'adhésion leucocytaire. La signalisation en aval de SR-BI est dépendante de la protéine adaptatrice PDZK1. Finalement, l'activité de l'ecto-F₁-ATPase, stimulée par la liaison de l'apoA-I des HDL, exerce également des effets bénéfiques en favorisant la prolifération et la survie des cellules endothéliales.

Propriétés anti-thrombotiques

La thrombose représente l'étape la plus avancée de l'athérosclérose.

Les HDL augmentent la biodisponibilité du NO et stimulent la sécrétion de prostacycline 2 (PGI₂) par les cellules endothéliales. Ces deux derniers inhibent l'agrégation plaquettaire et favorisent la vasorelaxation artérielle (Vane & Botting 1995). D'autre part, les HDL empêchent la production par l'endothélium dysfonctionnel de divers facteurs thrombogènes impliqués dans l'adhésion et l'agrégation des plaquettes (facteur de von Villebrant, PAF pour *platelet-activating factor*) (Conlan et al. 1993; Sugatani et al. 1996). Suite à la stimulation par la thrombine, le TNF- α ou l'IL-1, les cellules endothéliales vont exprimer le Facteur Tissulaire FT, qui est le déclencheur central de la voie de coagulation extrinsèque. Les HDL, natives ou reconstituées avec de l'apoA-I et des molécules de phosphatidylcholine, ont la capacité d'inhiber l'expression du FT induite par la thrombine dans des cellules endothéliales (Viswambharan et al. 2004).

Les HDL peuvent également affecter le processus de coagulation en régulant certaines protéines circulantes comme la protéine anti-coagulante Protéine C activée (APC) (Griffin et al. 2012).

Finalement, les HDL exercent des effets directs sur les plaquettes en diminuant leur agrégation et en prévenant leur dégranulation (Calkin et al. 2009; Nofer et al. 2001; Nofer et al. 1998; Badrnya et al. 2013).

L'ensemble de ces effets induit par les HDL limite l'apparition d'un thrombus.

1.3.4 Autres fonctions

Les HDL possèdent d'autres fonctions indépendantes de l'athéroprotection.

Notamment, les HDL exercent des effets anti-infectieux. Dans ce contexte, Levine et *al.* ont mis en évidence la capacité des HDL à transporter le LPS (lipopolysaccharide) et à en diminuer la pathogénicité (Levine et al. 1993), en favorisant son élimination au niveau des voies biliaires (Camont et al. 2011).

Enfin, plusieurs études récentes ont identifié un rôle des HDL dans le transport de miRNA dans la circulation, afin de les délivrer à des cellules cibles, *via* le récepteur SR-BI (Chen et al. 2012; Vickers et al. 2011). Cette dernière fonction pourrait conférer aux HDL un rôle dans la modulation de l'expression génique.

2. L'ecto-F₁-ATPase : un récepteur de l'apoA-I

2.1 L'ATP synthase mitochondriale

L'ATP synthase est un complexe protéique enzymatique localisé à la membrane interne de la mitochondrie. Son rôle est de synthétiser l'adénosine triphosphate (ATP) à partir de l'adénosine diphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi). Le gradient électrochimique de protons généré par la chaîne respiratoire mitochondriale est essentiel à la synthèse d'ATP par l'ATP synthase (**Figure 9**).

2.1.1 Notions sur le mécanisme de fonctionnement de la chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire mitochondriale est une association de différents complexes protéiques localisés à la membrane interne de la mitochondrie.

Ces complexes sont responsables d'un mécanisme nommé phosphorylation oxydative. Durant ce dernier, l'oxydation du NADH (*nicotinamide adénine dinucléotide*) et du FADH₂ (*Flavine Adénine Dinucléotide*) généré par les grandes voies métaboliques de la cellule (cycle de Krebs, Glycolyse, β -oxydation) libère des électrons qui circulent à travers la chaîne respiratoire. La perte d'énergie de ces électrons au cours de leur transfert entre les donneurs et les accepteurs de la chaîne respiratoire, génère un gradient de protons entre la matrice mitochondriale et l'espace inter-membranaire. Ce gradient est nécessaire à la production d'ATP par l'enzyme terminale de la chaîne respiratoire : l'ATP synthase (**Figure 9**).

Le complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale (NADH déshydrogénase), a une action NADH coenzyme Q réductase. Il récupère ainsi les électrons du NADH, ce qui permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.

Le complexe II (Succinate déshydrogénase) a une action succinate coenzyme Q réductase. Il récupère les électrons du FADH₂ mais il ne permet pas le transport de protons vers l'espace inter-membranaire.

Le coenzyme Q, réduit par les complexes I et II permet ensuite le transfert des électrons au complexe III.

Le complexe III à une action coenzyme Q cytochrome C réductase, et permet le transport de 4 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire.

Les électrons sont ensuite transportés au complexe IV par le cytochrome C.

Enfin, le complexe IV a une action cytochrome C oxydase. Il catalyse le transfert d'électrons vers l'accepteur final qui est l'oxygène, formant ainsi une molécule d'eau. Ce mécanisme est associé au pompage de 2 protons vers l'espace inter-membranaire.

De fait, le NADH permet le transport de 10 protons de la matrice mitochondriale à l'espace inter-membranaire. Le FADH₂ permet le transport de 6 protons. Les protons présents dans l'espace inter-membranaire seront utilisés par l'ATP synthase comme force motrice afin de former de l'ATP.

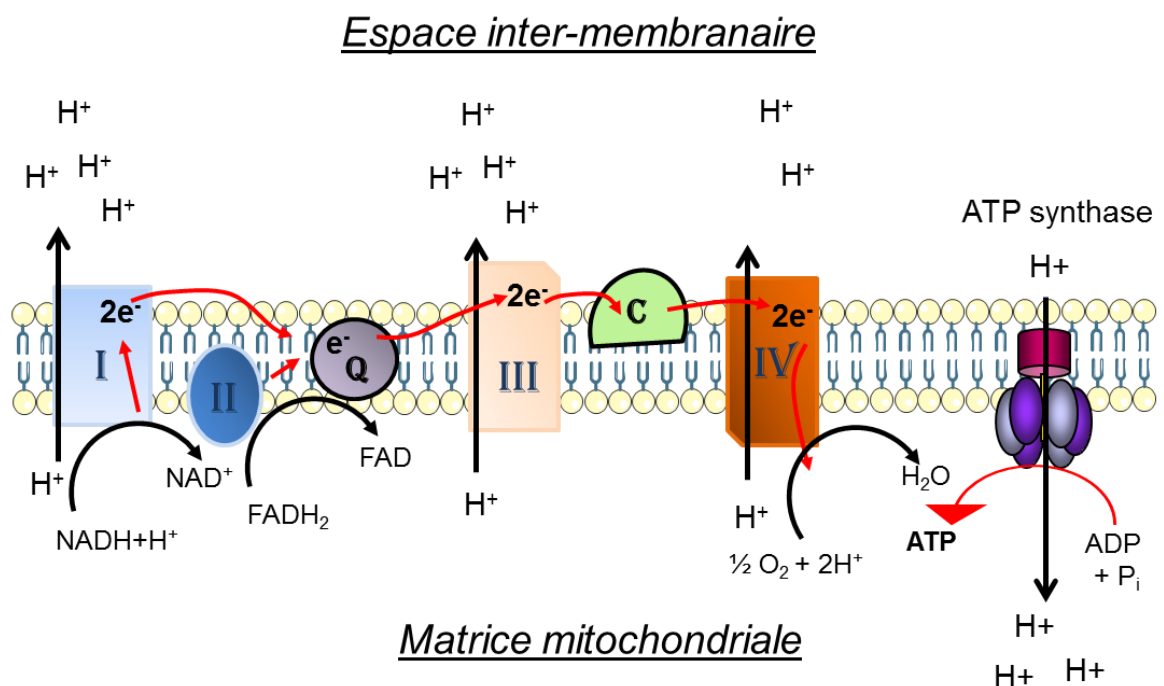


Figure 9 : Représentation schématique du fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale. Le transfert d'électrons entre les complexes I, II, III et IV génère un gradient de protons entre la matrice et l'espace inter-membranaire de la mitochondrie. Ce gradient électrochimique est utilisé comme force motrice par l'ATP synthase (complexe V) afin de former de l'ATP à partir d'ADP et de Pi. Q : Coenzyme Q, C : Cytochrome C.

2.1.2 Structure de l'ATP synthase mitochondriale

L'ATP synthase mitochondriale ou F_0F_1 -ATP synthase est un complexe enzymatique multi-protéique de masse moléculaire élevée (550 à 650 kDa) (**Figure 10**), dont la structure a été très conservée au cours de l'évolution. Chez les eucaryotes, comme indiqué dans le **tableau II**, elle se compose d'un grand nombre de sous-unités comprenant :

- Un domaine catalytique portant l'activité enzymatique, formé de 3 dimères de sous-unités $\alpha\beta$.
- Un rotor « central » composé des sous-unités γ , δ , ϵ et c
- Un stator « périphérique » formé des sous-unités b, d, F6 et OSCP (*Oligomycin sensitivity-conferring protein*).

Du point de vue fonctionnel, l'ATP synthase peut se diviser en deux grands domaines :

Le domaine catalytique F_1 soluble qui se compose des sous-unités α_3 , β_3 , γ_1 , δ_1 , ϵ_1 (domaine catalytique et rotor « central »).

Le domaine F_0 formant le canal à proton, et qui se compose des sous-unités c (8 à 15) et des sous-unités a, b, d, e, f, g, A6L, F6, OSCP.

La sous-unité γ du domaine F_1 , et les sous-unités associées (ϵ et δ), ainsi que le stator périphérique permettent l'association des domaines F_1 et F_0 (**Figure 10**).

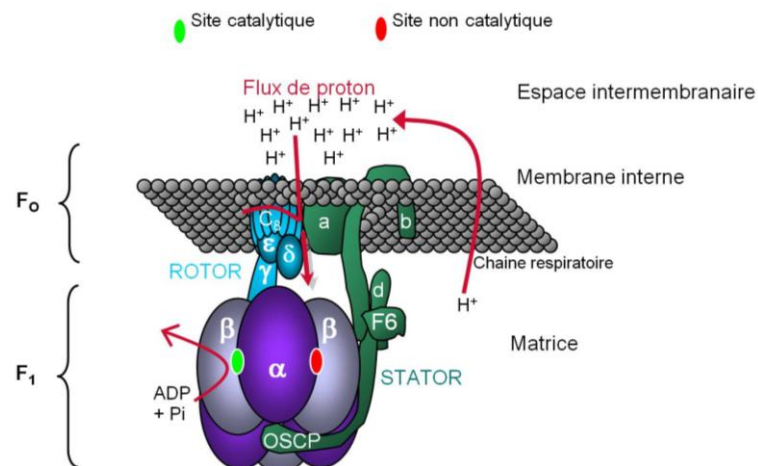


Figure 10 : Structure de l'ATP synthase mitochondriale. L'ATP synthase mitochondriale est formée d'un domaine F_1 , composé du domaine catalytique ($\alpha_3\beta_3$) et du rotor central (δ, γ, ϵ), et d'un domaine F_0 composé du canal à proton (sous-unités c) et du stator périphérique (b, d, F6, OSCP). Les sous-unités A6L, e, f et g ne sont pas représentées sur ce schéma. D'après Martinez et al. 2015.

La majorité des sous-unités de l'ATP synthase est codée par le génome nucléaire à l'exception des sous-unités a et A6L codées par le génome mitochondrial (**Tableau II**).

Sous-unité	Gène	Localisation gène	Taille de la protéine (résidus)	Poids moléculaire (kDa)
α	<i>ATP5A1</i>	Chromosome 18	510	55,21
β	<i>ATP5B</i>	Chromosome 12	482	51,71
γ	<i>ATP5C1</i>	Chromosome 10	272	30,05
δ	<i>ATP5D</i>	Chromosome 19	146	15,02
ϵ	<i>ATP5E</i>	Chromosome 20	49	5,42
a	<i>ATP6</i>	Mitochondrie	226	24,78
b	<i>ATP5F1</i>	Chromosome 1	214	24,62
c	<i>ATP5G1</i>	Chromosome 17	75	7,61
d	<i>ATP5H</i>	Chromosome 17	136	15,77
e	<i>ATP5i</i>	Chromosome 4	69	7,93
f	<i>ATP5J2</i>	Chromosome 7	88	10,36
g	<i>ATP5L</i>	Chromosome 11	103	11,43
OSCP	<i>ATP5O</i>	Chromosome 21	190	20,87
F6	<i>ATP5J</i>	Chromosome 21	78	8,96
A6L	<i>ATP8</i>	Mitochondrie	68	7,99
ATPIF1	ATPIF1	chromosome 1	84	10

Tableau II : Localisation génomique et caractéristiques des sous-unités de l'ATP synthase et de la protéine régulatrice ATPIF1 ou IF1 (*Inhibitory Factor 1*).

De nombreux facteurs impliqués dans l'assemblage des différents domaines de ce complexe enzymatique ont été identifiés chez les bactéries, chez les levures, ou encore chez les chloroplastes (Rühle & Leister 2015). En revanche, ce processus est encore mal caractérisé chez les eucaryotes supérieurs.

Deux facteurs intervenant dans l'assemblage des sous-unités α et β ont néanmoins été mis en évidence : les protéines chaperonnes atp11 et atp12 (Wang et al. 2001). La protéine mitochondriale TMEM70 (*transmembrane protein 70*) pourrait également être impliquée dans l'assemblage du complexe V (Cízková et al. 2008; Hejzlarová et al. 2011).

Les études génétiques réalisées chez la levure ont permis l'émergence d'un modèle chez les mammifères : les sous unités c, le domaine F₁ et le stator périphérique s'assembleraient d'abord de façon indépendante avant de s'associer entre eux, puis les sous-unités a et A6L, codées par le génome mitochondrial, seraient ajoutées (Jonckheere et al. 2012).

Finalement, les sous-unités a, b, e, g ou A6L ont été décrites comme étant impliquées dans l'organisation en dimère ou en oligomère de l'ATP synthase (Wittig & Schägger 2008; Wittig et al. 2010; Jonckheere et al. 2012). Cette organisation en structure dimérique ou oligomérique de l'ATP synthase participerait à la génération des crêtes de la membrane interne de la mitochondrie. Ces microdomaines concentrent les enzymes de la chaîne respiratoire ce qui permet un processus de synthèse d'ATP très efficace (García-Bermúdez & Cuezva 2016).

2.1.3 Fonctionnement de l'ATP synthase mitochondriale

Le mécanisme de synthèse de l'ATP est basé sur le modèle de Boyer appelé « Mécanisme de changement de liaison » (Boyer 2000).

Le domaine F_1 de l'ATP synthase, formé des hétérodimères $\alpha\beta$, présente 3 sites catalytiques. Ces derniers peuvent changer de conformation de manière séquentielle, adoptant ainsi 3 états distincts ayant des constantes d'affinité différentes pour les nucléotides : l'état « L » (*loose*) liant préférentiellement l'ADP et le P_i , l'état « T » (*tight*) liant l'ATP et un site « O » libre (*open*) présentant une basse affinité pour les ligands.

Le passage des protons au travers de la sous unité a, va rejoindre l'anneau de sous-unité c entraînant ainsi sa rotation.

Cette rotation se propage au niveau du rotor central qui interagit avec les dimères $\alpha\beta$, induisant leurs changements de conformation et la synthèse d'ATP. Le passage de 10 protons permet une rotation complète (120°) de l'ATP synthase et conduit à la production de 3 molécules d'ATP (**Figure 11**).

En absence de gradient électrochimique, ce qui peut se produire en cas d'hypoxie, les domaines F_1 et F_0 de l'ATP synthase sont découplés. La théorie de Boyer est toujours applicable mais en sens inverse, l'enzyme exerçant alors une activité d'hydrolyse de l'ATP en ADP et P_i (Boyer 2000; Cabezón et al. 2003). Ce processus induit le passage des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire et permet de préserver le potentiel membranaire mitochondrial. (**Figure 11 et Figure 13 panel gauche**).

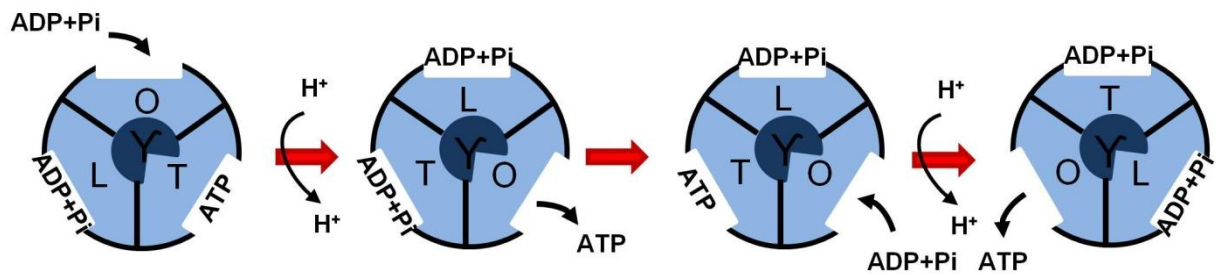


Figure 11 : Mécanisme de synthèse d'ATP. L'ADP et le Pi occupent le site L, l'ATP le site T, et le site O est libre. Le passage des protons à travers le canal génère la force motrice à l'origine d'un changement conformationnel des sites L en T, T en O et O en L, ce qui induit la synthèse et la libération de l'ATP produit. D'après Boyer 2000.

2.1.4 Régulation de l'activité de l'ATP synthase : importance de l'inhibiteur IF1

L'activité de l'ATP synthase est dépendante des autres complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale. Par ailleurs, elle peut être régulée par certains métabolites, certaines modifications post-traductionnelles, ou encore par l'interaction de l'ATP synthase avec des protéines régulatrices.

Pour exemple, le calcium stimule l'activité de synthèse de l'enzyme (Llorente-Folch et al. 2015). Au contraire, l' α -kétoglutarate, un métabolite du cycle de Krebs, inhibe l'ATP synthase en se liant à la sous-unité β (Chin et al. 2014). Des modifications post-traductionnelles de nitrations (Giulivi et al. 2010), d'acétylations (Rahman et al. 2014) et de phosphorylations de certaines sous-unités pourraient stimuler ou inhiber l'activité de l'ATP synthase (García-Bermúdez & Cuezva 2016; Covian & Balaban 2012). Enfin, la protéine anti-apoptotique Bcl-x_L a la capacité de se lier à la sous-unité β et de stimuler la synthèse d'ATP (Alavian et al. 2011), alors que la protéine inhibitrice endogène IF1 (*Inhibitory Factor 1*) inhibe l'activité hydrolase de l'ATP synthase.

La protéine IF1 a été décrite pour la première fois, il y a plus de 50 ans, dans le muscle cardiaque de bœuf (Pullman & Monroy 1963). C'est un inhibiteur naturel de l'activité hydrolase de la F₀F₁-ATP synthase. L'IF1 est une protéine codée par le génome nucléaire (chromosome 1 chez l'homme). L'épissage alternatif génère 3 isoformes d'ARN messager (**Figure 12A**).

L'isoforme 1 est la forme la plus longue d'IF1, et contient 3 exons ainsi qu'une courte région 3'UTR (*Untranslated Transcribed Region*). L'isoforme 2 contient également 3 exons. L'exon 3 est cependant plus court et la séquence C-terminal de la protéine générée est par conséquent différente. Enfin l'isoforme 3 contient uniquement les deux premiers exons ainsi qu'une longue séquence 3'UTR. Ces différentes formes d'ARNm génèrent des protéines de 106 (12.2 kDa), 71 (7.9 kDa) et 60 (6.59 kDa) acides aminés respectivement. Les acides aminés situés dans la partie N-terminale de la protéine sont par ailleurs clivés lors de l'importation d'IF1 dans la mitochondrie. L'isoforme 1 est majoritairement exprimée dans les tissus humains (García-Bermúdez & Cuezva 2016).

La protéine IF1 est active sous forme monomérique ou dimérique. Sous cette dernière forme, chaque monomère interagit avec son homologue *via* les hélices α du domaine C-terminal, formant une structure de type *coiled-coil*. Le domaine inhibiteur de l'activité hydrolase de la F_0F_1 ATP synthase se situe sur la partie N-terminale de la protéine. Des études ont permis de démontrer que la séquence 47-84 de l'IF1 bovin (dont la structure est très proche de l'IF1 humain) participe à la stabilisation des dimères. La séquence minimale inhibitrice d'IF1 est quant à elle constituée des résidus 14 à 47 (Van Raaij et al. 1996) (**Figure 12B**).

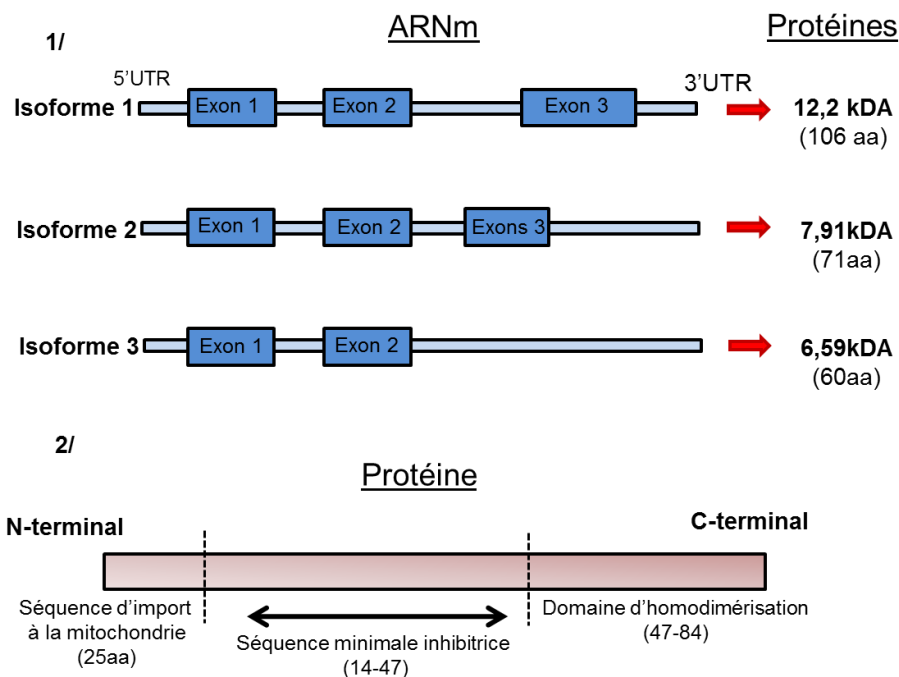


Figure 12 : Représentation simplifiée des isoformes et des domaines de la protéine IF1. (1) ARN messager des 3 isoformes d'IF1 et taille des protéines générées. **(2)** Représentation simplifiée des domaines de la protéine IF1 bovine. aa : Acides Aminés.

Au niveau cellulaire, l'activité d'IF1 est dépendante du pH. En effet, à pH > 6.8, IF1 est présente essentiellement sous forme tétramérique inactive. La diminution du pH tend à modifier l'état de protonation de l'histidine situé en position 49, ce qui permet de rompre ces structures tétramériques, formant ainsi des dimères actifs d'IF1. De ce fait, lorsque le pH est inférieur à 6.8, le dimère d'IF1 interagit et forme des structures de stœchiométrie 1 :1 avec l'ATP synthase (García-Bermúdez & Cuezva 2016; Walker 2012).

Dans ce contexte, la protéine IF1 mutée, IF1-H49K (histidine 49 remplacée par une lysine, formant une protéine active indépendamment du pH), ou le peptide IF1¹⁰⁻⁴⁷ (contenant la séquence minimale inhibitrice), constitue des outils intéressants pour l'étude de l'activité hydrolase de l'ATP synthase (Radojkovic et al. 2009; Cabezón et al. 2003; Cabezón et al. 2002; Van Raaij et al. 1996).

Dans des situations d'hypoxie ou d'ischémie, la diminution de la biodisponibilité de l'O₂, l'accepteur final d'électrons, altère le fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale et les protons s'accumulent dans la matrice mitochondriale. L'ATP synthase va ainsi avoir une activité d'hydrolyse de l'ATP, associée au transfert de protons vers l'espace inter-membranaire afin de restaurer le gradient électrochimique de la membrane interne de la mitochondrie (**Figure 13, panel gauche**).

L'acidification de la matrice mitochondriale va induire la dimérisation d'IF1 qui va alors se lier de façon non covalente à l'interface des sous-unités α_{DP} et β_{DP} par une interaction avec les hélices α de leurs domaines C-terminaux, mais également par interaction avec la sous-unité γ . Cette liaison bloque ainsi la rotation du domaine F₁, et par conséquent la coopération entre les sites catalytiques. Cette inhibition de l'activité ATPasique de l'ATP synthase par IF1 permet *in fine* de préserver le stock d'ATP cellulaire (**Figure 13, panel droit**).

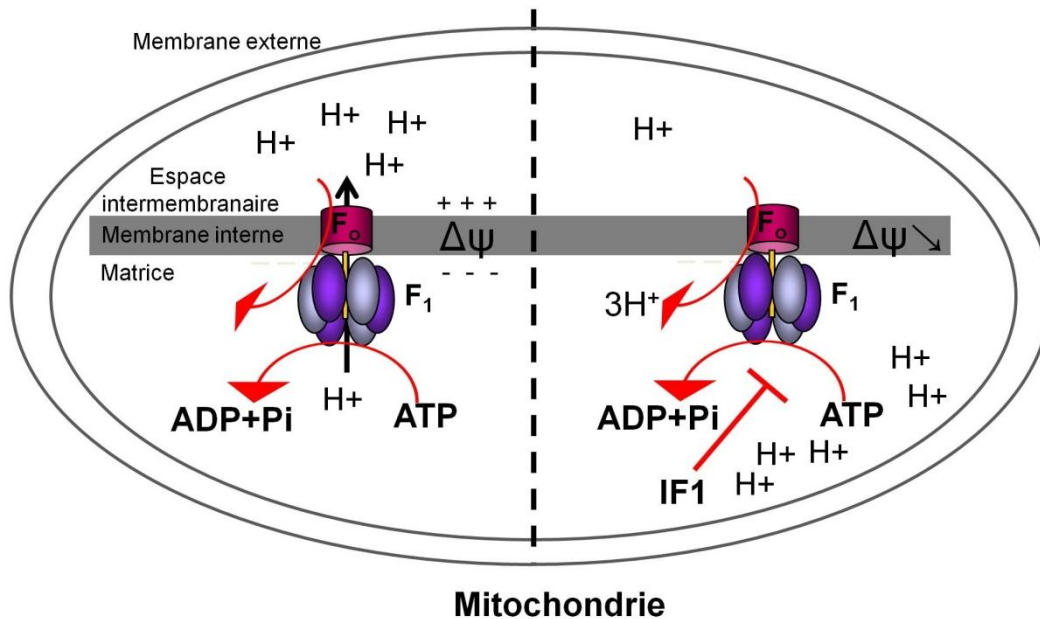


Figure 13 : Fonctionnement ATPasique de l'ATP synthase mitochondriale. Lors d'une altération de la respiration mitochondriale comme dans des situations d'hypoxie ou d'ischémie, l'ATP synthase hydrolyse de l'ATP formant de l'ADP et du Pi. Ce mécanisme est associé au transport de protons par l'ATP synthase vers l'espace inter-membranaire afin de maintenir le gradient électrochimique (panel gauche de la figure). L'accumulation de protons au niveau matriciel conduit à la formation de dimères actifs d'IF1. Ces derniers interagissent avec le domaine F₁ de l'ATP synthase à l'interface de sous-unité αβ, inhibant son activité ATPasique (panel droit de la figure). D'après Martinez et al. 2015.

2.1.5 Pathologies associées à l'ATP synthase

Les mutations associées à un défaut de synthèse d'ATP par l'ATP synthase sont responsables de pathologies graves, souvent mortelles. Ces mutations entraînent une diminution du contenu cellulaire en ATP, mais également une accumulation de dérivés réactifs de l'oxygène (ROS *reactive oxygen species*), toxiques pour la cellule (Jonckheere et al. 2012).

Les mutations du gène *ATP6* (génome mitochondrial) codant pour la sous-unité a sont les mieux caractérisées. Elles sont responsables du syndrome de NARP (*Neurogenic muscle weakness Ataxia Retinosis Pigmentosa*) qui se caractérise par une neuropathie sensorielle, une ataxie cérébelleuse et une cécité nocturne, ou encore du syndrome de Leigh se caractérisant par une encéphalopathie, une acidose lactique, des convulsions, des cardiomyopathies, des troubles respiratoires et un retard de développement (Jonckheere et al. 2012).

Des mutations touchant le gène *ATP8* (génomme mitochondrial) codant pour la sous-unité A6L ou touchant les facteurs d'assemblage ATP12 et TMEM70 sont également associées à des cardiomyopathies et à des encéphalopathies (Jonckheere et al. 2012).

Seule une mutation touchant le gène nucléaire codant pour la sous-unité ϵ a été caractérisée. Les fibroblastes ayant cette mutation présentent une diminution d'environ 60 à 70 % de la synthèse d'ATP mitochondrial. Cliniquement, cette mutation est responsable d'une acidose lactique, d'un retard du développement mental, et d'une neuropathie périphérique (Mayr et al. 2010).

Finalement, des altérations de l'expression de l'ATP synthase sont impliquées dans les pathologies neurodégénératives. Dans la maladie d'Alzheimer, il a notamment été rapporté des accumulations anormales de sous-unités α dans le cytoplasme (Sergeant et al. 2003). Il a également été rapporté une diminution de l'expression des sous-unités OSCP et l'interaction de celle-ci avec la protéine β amyloïde, un marqueur caractéristique de la maladie d'Alzheimer (Beck et al. 2016).

2.2 Mise en évidence de la sous unité β de l'ATP synthase comme récepteur de haute affinité de l'apoA-I : implication dans l'endocytose hépatique des HDL

En 1994, Das et *al.* ont pour la première fois mis en évidence la présence de la sous-unité β de l'ATP synthase, à la surface de trois lignées de cellules tumorales (les cellules leucémiques « K562 », les cellules de lymphome « Raji » et les cellules d'adénocarcinome épithéliale pulmonaire « A549 »). Les auteurs ont également démontré son implication dans la lyse cellulaire. De ce fait, un anticorps dirigé contre la sous-unité β (anti- βF_1) inhibe la dégradation des cellules tumorales par les cellules NK (*Natural Killer*), ainsi que leur lyse par les cellules LAK (*Lymphokine Activated Killer*) (Das et al. 1994).

Par la suite, l'expression des sous-unités α et β de l'ATP synthase à la membrane plasmique a été mise en évidence sur les cellules endothéliales HUVEC (*Human Umbilical Vein Endothelial Cells*), où la sous-unité β jouerait le rôle de récepteur à l'angiostatine, une protéine inhibitrice de l'angiogenèse (Moser et al. 1999; Moser et al. 2001).

En 2003, notre laboratoire a identifié, par chromatographie d'affinité, et résonance plasmonique de surface (SPR, Biacore), la sous-unité β de l'ATP synthase à la membrane plasmique des hépatocytes, comme récepteur de haute affinité pour l'apoA-I ($K_d = 10^{-9}$ M), la protéine majoritaire des HDL (Martinez et al. 2003).

La présence des sous-unités α et β a été confirmée sur des hépatocytes humains par imagerie en microscopie confocale et par cytométrie de flux. Exprimée à la surface des hépatocytes, il a été démontré que cette ATP synthase ectopique appelé « **ecto-F₁-ATPase** » exerce uniquement une activité ATPasique, d'hydrolyse de l'ATP extracellulaire en ADP et Pi. Du point de vue mécanistique, la liaison de l'apoA-I active l'enzyme, et l'ADP extracellulaire ainsi généré stimule l'endocytose de la particule HDL entière (ou holo-HDL) *via* un récepteur de basse affinité dont l'identité reste encore inconnue (Martinez et al. 2000; Martinez et al. 2003). L'endocytose des HDL est strictement dépendante de la génération d'ADP extracellulaire par l'ecto-F₁-ATPase (Martinez et al. 2003). Ainsi, l'ajout d'ADP dans le milieu extracellulaire stimule l'endocytose des HDL par les hépatocytes. Inversement, l'addition d'apyrase dans le milieu extracellulaire, une enzyme qui hydrolyse l'ATP et l'ADP, induit une diminution de l'endocytose des HDL (Martinez et al. 2003).

De façon intéressante, un traitement avec l'inhibiteur naturel de l'activité ATPasique de l'ATP synthase mitochondriale, la protéine IF1, produite sous forme de protéine recombinante active (IF1-H49K), inhibe l'endocytose des HDL par les hépatocytes humains en culture, et par des foies de rats perfusés (Martinez et al. 2003).

Dans les paragraphes suivants, nous allons détailler les différents mécanismes moléculaires et les rôles physiologiques associés à l'activité de l'ecto-F₁-ATPase.

2.3 Activité de l'ecto-F₁-ATPase

De nombreuses études incluant celles de notre équipe se sont intéressées à l'activité enzymatique de l'ecto-F₁-ATPase. Cependant, les résultats concernant son activité de synthèse ou d'hydrolyse d'ATP à la membrane plasmique restent contradictoires.

L'activité enzymatique de l'ecto-F₁-ATPase, mesurée à la surface de différents types cellulaires est résumée dans le **Tableau III**.

Cellules	Ligands proposés	Activités enzymatiques proposées	Inhibiteurs utilisés	Techniques de mesure des nucléotides extracellulaires	Références
Cellules endothéliales (HUVEC)	apoA-I	Hydrolase	IF1	HPLC (ADP et ATP)	(Radojkovic et al. 2009)
Cellules endothéliales (HUVEC)	Angiostatine	Synthase	Oligomycine/ CCCP/ piceatannol	Bioluminescence (ATP)	(Moser et al. 2001; Arakaki et al. 2003)
Hépatocytes (HepG2)	apoA-I	Hydrolase	IF1	Bioluminescence et HPLC (ADP et ATP)	(Martinez et al. 2003; Fabre et al. 2006)
Adipocytes (3T3-L1)	?	Synthase	Oligomycine/ CCCP	Bioluminescence (ATP)	(Kim et al. 2004)
Kératinocytes (HaCat)	?	Synthase	Oligomycine	Bioluminescence (ATP)	(Burrell et al. 2005)
HCT-116	G-Gly	Hydrolase	IF1	HPLC (ADP et ATP)	(Kowalski-Chauvel et al. 2012)
A549	Angiostatine	Synthase	Angiostatine/ piceatannol	Bioluminescence (ATP)	(Sulene L. Chi & Pizzo 2006)

Tableau III : Activité enzymatique et ligands associés de la F₁-ATPase identifiée à la surface de différentes lignées cellulaires. Les inhibiteurs et techniques utilisés pour démontrer l'activité de l'enzyme de surface sont également reportés.

HUVEC : Cellules endothéliales de veine du cordon ombilical ; 3T3-L1 : Fibroblastes murins (différenciés en adipocytes) ; HaCat : Kératinocytes immortalisés ; HCT-116 : Cellules tumorales coliques humaines; A549 : Cellules tumorales pulmonaires humaines ; HPLC : high performance liquid chromatography ; IF1 :Inhibitory factor 1 ; CCCP : Carbonylcyanure m-chlorophénylhydrazone ; G-Gly : glycine-extended form of gastrin).

En 1999, Moser et *al.* ont mis en évidence la présence des sous-unités α et β de la F_1 -ATPase à la surface des cellules endothéliales HUVEC, où elles joueraient le rôle de récepteur à l'angiostatine, une protéine qui bloque l'angiogenèse (Moser et al. 1999). A la surface des cellules endothéliales, l'ecto- F_1 -ATPase exercerait une activité de synthèse d'ATP dépendante du gradient de proton (Moser et al. 2001; Arakaki et al. 2003). La liaison de l'angiostatine sur la sous-unité β de surface inhiberait la synthèse d'ATP. Inversement, sur des cellules endothéliales HPAECs (*Human Pulmonary Artery Endothelial Cells*), cette activité de synthèse serait stimulée par l'application de contraintes de cisaillement mimant le flux sanguin (Yamamoto et al. 2007). Des travaux ont également démontré que la diminution du pH extracellulaire stimule la synthèse d'ATP extracellulaire par l'enzyme. Il a été proposé que cette synthèse d'ATP améliore la survie des cellules tumorales et endothéliales en milieu acide, en participant au pompage des protons hors de la cellule (Sulene L. Chi & Pizzo 2006).

La capacité de l'ecto- F_1 -ATPase à synthétiser de l'ATP a également été suggérée sur des lignées cellulaires cancéreuses leucémiques, ainsi que sur des kératinocytes, et des adipocytes (Wen-Li et al. 2012; Burrell et al. 2005; Kim et al. 2004) (**Tableau III**).

La dépendance de cette activité de synthèse au gradient de protons a été démontrée par l'utilisation du CCCP, un protonophore classiquement utilisé pour dissiper le gradient de protons de la membrane interne mitochondriale. Du fait des propriétés lipophiles du CCCP, on ne peut pas exclure que la diminution de la concentration en ATP extracellulaire observée lors du traitement des cellules, soit liées à une activité intracellulaire de cet agent qui pourrait diffuser jusqu'à la mitochondrie.

Afin de discuter de la possible activité de synthèse d'ATP par l'ecto- F_1 -ATPase / synthase, il convient tout d'abord de noter que la différence de potentiel électrique existant entre les faces extracellulaire et intracellulaire de la membrane plasmique des cellules est entre -40mV et -80 mV, alors que le potentiel de la membrane interne mitochondriale est d'environ -200mV. De plus, à la membrane plasmique, l'ecto- F_1 -ATPase semble être orientée du côté extracellulaire chargé positivement alors qu'elle est orientée vers la matrice chargée négativement dans la mitochondrie. Ainsi, la synthèse d'ATP par l'ecto- F_1 -ATPase nécessiterait un transport de protons à l'encontre du potentiel membranaire, de l'intérieur de la

cellule vers le milieu extracellulaire. Ce type de transport actif est classiquement associé à une consommation d'énergie, mettant ainsi à mal l'hypothèse d'une synthèse d'ATP par l'ecto-F₁-ATPase dans ces conditions.

En conséquence, seule une inversion du potentiel de la membrane plasmique serait compatible avec une éventuelle synthèse d'ATP par l'ecto-F₁-ATPase. Dans ce contexte, Mangiullo et *al.* ont démontré que l'augmentation du pH extracellulaire (milieu basique) ou l'acidification du milieu intracellulaire permettent une synthèse d'ATP par l'ecto-F₁-ATPase. Dans ces conditions, l'activité de synthèse d'ATP est corrélée à un flux de protons sensible à l'oligomycine, du cytoplasme vers le milieu extracellulaire (Mangiullo et al. 2008).

En accord avec ces observations, les travaux de notre équipe ont démontré qu'en condition de culture cellulaire physiologique, l'ecto-F₁-ATPase possède uniquement une activité ATPasique à la surface des hépatocytes HepG₂ (Martinez et al. 2003; Fabre et al. 2006), des cellules endothéliales HUVEC (Radojkovic et al. 2009) et des cellules tumorales coliques HCT-116 (Kowalski-Chauvel et al. 2012). L'analyse des nucléotides extracellulaires par HPLC (*high performance liquid chromatography*) a permis de démontrer que ces cellules, incubées en présence d'ADP radiomarké (³H-ADP) et de ³²Pi, sont incapables de synthétiser de l'ATP doublement marqué (³H et ³²P), mais produisent uniquement du ³H-ATP. Ceci indique que cette production d'ATP extracellulaire est attribuable à l'activité d'autres enzymes, de type adénylate kinase (2ADP ↔ ATP+AMP) ou nucléoside di-phospho-kinase (ADP+NTP ↔ ATP+NDP) (Yegutkin 2008; Martinez et al. 2003; Fabre et al. 2006). Egalement, sur les cellules HepG₂, il n'a pas été observé de diminution de la production d'ATP en présence d'oligomycine (Martinez et al. 2003; Fabre et al. 2006).

En conclusion, compte-tenu des arguments présentés et des résultats obtenus, le modèle en faveur d'une activité ATPasique de l'ecto-F₁-ATPase, sans activité de synthèse d'ATP, semble être le plus plausible.

2.4 Fonctions métaboliques et vasculaires de l'ecto-F₁-ATPase

2.4.1 Fonction de l'ecto-F₁-ATPase dans le catabolisme hépato-biliaire des HDL

Après avoir mis en évidence la présence de l'ecto-F₁-ATPase à la surface des hépatocytes humains, et démontré son implication en tant que récepteur à l'apoA-I dans l'endocytose des particules HDL (Martinez et al. 2003) (partie 2.2), des études menées dans notre laboratoire ont permis d'identifier les partenaires cellulaires et les voies de signalisation impliqués dans cette voie d'endocytose. La relevance physiologique de cette voie d'endocytose hépatique a également été caractérisée.

Les partenaires cellulaires et les voies de signalisation

Tout d'abord, la stricte dépendance à l'ADP de cette voie d'endocytose des HDL suggérait l'implication en aval, d'un récepteur purinergique de type P2Y. Les récepteurs P2Y sont des récepteurs nucléotidiques appartenant à la famille des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). Une étude ultérieure de notre équipe a ainsi pu démontrer que parmi les 3 récepteurs sensibles à l'ADP, P2Y₁, P2Y₁₂ et P2Y₁₃, seuls les récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₃ étaient exprimés par les hépatocytes humains (Jacquet et al. 2005). De plus, l'utilisation d'inhibiteurs pharmacologiques du P2Y₁ (A2P5P, MRS2179), ainsi que d'ARN interférents dirigés contre ces deux récepteurs, a permis de démontrer que l'endocytose des HDL induite par l'ADP était strictement dépendante de l'activation du récepteur P2Y₁₃. De manière intéressante, ces travaux ont également permis de montrer que l'agent anti-thrombotique AR-C69931MX (ou cangrelor), connu comme antagoniste du récepteur P2Y₁₂, agissait comme agoniste partiel du P2Y₁₃. De ce fait, un traitement des hépatocytes par le cangrelor augmente l'endocytose des HDL (Jacquet et al. 2005).

Le récepteur P2Y₁₃ est principalement exprimé au niveau du cerveau, de la rate, des cellules de la moelle osseuse, et du foie. Comme le P2Y₁₂, le récepteur P2Y₁₃ est couplé à la protéine hétérotrimérique G_i. L'activité du récepteur P2Y₁₂ est en partie attribuée à son rôle dans l'activation de la protéine RhoA (*Ras*

homolog gene family, member A), une GTPase qui joue notamment un rôle dans la dynamique et l'organisation du cytosquelette d'actine, ainsi qu'un rôle dans le transport vésiculaire (Soulet et al. 2004; Hall 2005).

Des travaux issus du laboratoire ont démontré que l'activation directe du récepteur P2Y₁₃ avec de l'ADP ou du cangrelor, ou indirecte avec l'apoA-I, induit une activation de la GTPase RhoA, suivie d'un recrutement à la membrane plasmique de son effecteur ROCK1 (*Rho Associated Coiled-Coil Containing Protein Kinase 1*). Ce mécanisme conduit à un remodelage du cytosquelette d'actine, notamment par la formation de fibres de stress, induisant l'endocytose des HDL. De fait, l'inhibition de la formation de ces fibres de stress, ou l'extinction de ROCK1 par ARN interférents inhibe l'endocytose des HDL. Inversement, un mutant constitutivement actif de RhoA (RhoAV14) stimule ce processus (Malaval et al. 2009).

Différentes enzymes ont été identifiées à la surface de divers types cellulaires comme les cellules endothéliales, les lymphocytes, les kératinocytes ou les cellules épithéliales, comme étant capables de réguler les taux extracellulaires d'ADP et d'ATP. Parmi ces enzymes l'adénylate kinase (AK ; $2ADP \leftrightarrow ATP+AMP$) et la nucléoside diphosphate kinase (NDPK \leftrightarrow ADP+NTP) sont capables de réguler les taux de nucléotides extracellulaires (Donaldson et al. 2002; Buckley et al. 2003; Burrell et al. 2003; Yegutkin et al. 2001). Dans ce contexte, Fabre et al. ont identifié en 2006, la présence de l'adénylate kinase et de la nucléoside diphosphate kinase, à la surface de la lignée hépatocytaire HepG₂ et des hépatocytes primaires humains. L'adénylate kinase consomme l'ADP extracellulaire généré par l'ecto-F₁-ATPase, et son activité régule donc négativement l'endocytose des HDL (Fabre et al. 2006). Cependant, l'inhibition de l'adénylate kinase n'abolit pas complètement la production d'ATP à partir d'ADP. D'autres acteurs semblent donc intervenir dans la régulation du métabolisme nucléotidique extracellulaire.

Durant ma thèse, j'ai démontré l'existence à la membrane plasmique d'une activité Adénine Nucléotide Translocase (ANT). L'étude de cette translocase d'origine mitochondriale, dans la régulation du taux extracellulaire d'ADP et l'endocytose des HDL, fait l'objet du premier chapitre de la partie expérimentale.

Les acteurs moléculaires et régulateurs de cette voie F₁-ATPase/P2Y₁₃ d'endocytose des HDL sont représentés dans la **Figure 14**.

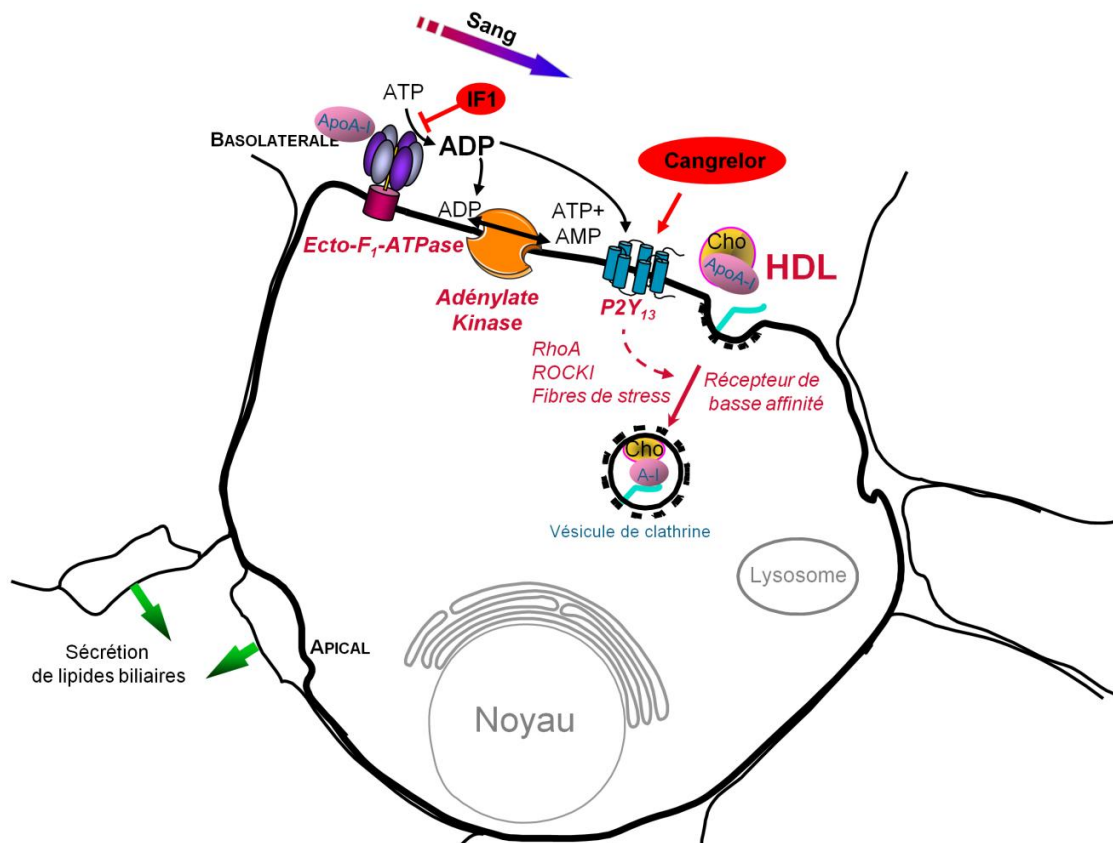


Figure 14 : Endocytose hépatique des HDL dépendante de la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃. La liaison de l'apoA-I libre ou associée aux HDL stimule l'activité ATPasique de l'ecto-F₁-ATPase. L'ADP généré active le récepteur purinergique P2Y₁₃. Ce mécanisme conduit, après un réarrangement du cytosquelette d'actine dépendant de la voie RhoA/ROCKI, à l'endocytose de la particule HDL. L'adénylate kinase régule négativement l'endocytose dépendante de cette voie en consommant l'ADP extracellulaire généré par l'ecto-F₁-ATPase. Le cangrélor, un agoniste partiel du récepteur P2Y₁₃ stimule l'endocytose des HDL. L'inhibiteur de l'activité ATPasique de l'ATP synthase, la protéine IF1 (IF1-H49K), inhibe quant à lui l'endocytose des HDL.

Modèles pré-cliniques

Afin d'étudier la relevance physiologique de la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃, un modèle de souris invalidé pour le récepteur P2Y₁₃ (P2Y₁₃^{-/-}) a été généré au laboratoire.

Sous régime normolipidique, les souris P2Y₁₃^{-/-} présentent une diminution de l'endocytose hépatique des HDL, associée à une diminution de la concentration hépatique en cholestérol, et une diminution des sécrétions biliaires en cholestérol et phospholipides. De plus, le processus de transport retour du cholestérol observé *in vivo* chez ces souris est moins efficace (Fabre et al. 2006) (**Tableau IV**).

Les souris P2Y₁₃^{-/-} mises sous régime riche en cholestérol (1,25% de cholestérol durant 16 semaines), présentent un phénotype métabolique accentué, avec une diminution d'environ 60% du transport retour du cholestérol, associée à une forte diminution des sécrétions biliaires en cholestérol, phospholipides et acides biliaires (Lichtenstein et al. 2013).

De plus, une injection aigue de cangrelor, l'agoniste partiel du récepteur P2Y₁₃, stimule l'endocytose des HDL *in situ* sur des foies de souris sauvages, isolés et perfusés avec des HDL marquées à l'iode-125 (¹²⁵I). Logiquement, le cangrelor n'a aucun effet sur les foies de souris P2Y₁₃^{-/-}. Cette activation pharmacologique du récepteur P2Y₁₃ par le cangrelor, est associée à une augmentation de la sécrétion biliaire en cholestérol chez les souris sauvages, qui n'est pas retrouvée chez les souris P2Y₁₃^{-/-} (Fabre et al. 2010).

Lorsque les souris sont traitées de manière chronique avec le cangrelor (35 µg / jour / kg) pendant 3 jours, l'augmentation de l'endocytose hépatique des HDL ainsi que de la sécrétion biliaire en acides biliaires, est associée à une diminution de la concentration en cholestérol plasmatique (Serhan et al. 2013) (**Tableau IV**).

Les souris sauvages de type C57BL/6 ne développent pas spontanément d'athérosclérose. Afin d'étudier l'implication du récepteur P2Y₁₃ dans le développement de cette pathologie, un modèle de souris pro-athérogène apoE^{-/-} a été croisé avec les souris P2Y₁₃^{-/-}. Ces souris doublement invalidées (apoE^{-/-} x P2Y₁₃^{-/-}) développent à 15 semaines des plaques d'athérome au niveau du sinus aortique de taille plus importante que les souris apoE^{-/-}. Ce phénotype est associé à une diminution du contenu hépatique en cholestérol, ainsi qu'à une diminution des sécrétions de lipides biliaires (cholestérol, acides biliaires et phospholipides), et de l'excrétion fécale en cholestérol et acides biliaires. Le phénotype observé pourrait dépendre de la diminution de l'efficacité du processus de transport retour du cholestérol chez ces souris (Lichtenstein et al. 2015) (**Tableau IV**). Ces résultats mettent donc ainsi en évidence le rôle athéroprotecteur du récepteur P2Y₁₃.

Récemment, un agoniste sélectif du récepteur P2Y₁₃ (CT1007900) a été développé par *Cerenis Therapeutics*. Son utilisation pharmacologique sur des souris sauvages montre qu'il stimule, dès la première injection, l'endocytose hépatique des HDL ainsi que la sécrétion biliaire en acides biliaires. D'autre part, le traitement chronique de souris à l'aide de cet agoniste durant deux semaines

améliore le métabolisme des HDL, et ralentit la progression de la plaque d'athérome chez les souris apoE^{-/-} (Goffinet et al. 2014) (**Tableau IV**).

Les phénotypes des souris invalidées pour le récepteur P2Y₁₃, ou traitées avec des agonistes du récepteur (cangrelor et CT1007900), sont résumés dans le **Tableau IV**.

	P2Y₁₃^{-/-}	Cangrelor	CT 1007900
Endocytose hépatique des HDL	↘	↗	↗
HDL-C plasmatique	↔	↘	↘
Sécrétions de lipides biliaires	↘	↗	↗
RCT (macrophages vers les fèces)	↘		
Athérosclérose (apoE ^{-/-})	↗		↘

Tableau IV : Phénotype des souris invalidées pour le récepteur P2Y₁₃ ou traitées avec des agonistes du récepteur.

L'ensemble de ces résultats souligne l'importance physiologique du récepteur P2Y₁₃ dans le catabolisme hépato-biliaire des HDL, le transport retour du cholestérol, et le développement de l'athérosclérose, faisant de ce récepteur une cible thérapeutique potentielle dans la prévention et le traitement des maladies cardiovasculaires.

La protéine IF1 a été identifiée comme étant exprimée à la membrane plasmique de différents types cellulaires, incluant les hépatocytes et les cellules endothéliales, où elle est associée à l'ecto-F₁-ATPase (Cortés-Hernández et al. 2005; Contessi et al. 2007; Giorgio et al. 2010). Giorgio et al ont notamment mis en évidence une association entre l'IF1, et les sous-unités α/β de l'ecto-F₁-ATPase sur des préparations de membrane plasmique de foies de rats.

La cholestase hépatique correspond à une diminution de l'écoulement de la bile par les voies biliaires. Le modèle de rats soumis à une cholestase hépatique aigue, induite par ligature du canal biliaire, se caractérise par une diminution de l'endocytose hépatique des HDL, associée à une diminution de l'expression du

récepteur SR-BI. Dans ce dernier modèle, la diminution de l'endocytose hépatique des HDL pourrait également être due à une augmentation de l'IF1 localisé à la membrane plasmique, ainsi qu'à l'augmentation de 45% de l'association ecto-F₁-ATPase/IF1 observée. De ce fait, l'activité de la F₁-ATPase de surface serait diminuée (Giorgio et al. 2010). Ces résultats suggèrent donc que selon les situations physiologiques et physiopathologiques, l'association entre l'ecto-F₁-ATPase et son inhibiteur à la surface cellulaire peut être modulée.

Etudes épidémiologiques

Parallèlement à la caractérisation physiologique de la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃ d'endocytose hépatique des HDL sur des modèles pré-cliniques, notre équipe s'est intéressée à son implication chez l'homme.

Dans ce contexte, l'inhibiteur endogène de l'activité ATPasique de l'ATP synthase, la protéine IF1, a été identifié sous forme circulante, dans le sérum humain (Genoux et al. 2011).

Une étude cas-témoin incluant 700 patients coronariens et 700 individus contrôles, a permis de démontrer que le taux d'IF1 circulant est significativement abaissé chez les patients coronariens par rapport aux sujets sains. De plus, le taux d'IF1 est positivement associé aux marqueurs HDL, tels que le HDL-C et l'apoA-I, et négativement associé au risque cardio-vasculaire, indépendamment des facteurs de risques classiques (Genoux et al. 2013). Un taux élevé d'IF1 circulant ($\geq 0,47$ mg / l) chez des sujets présentant de faibles taux de HDL-C ou d'apoA-I est par ailleurs associé à une diminution du risque cardio-vasculaire d'environ 70%.

Plus récemment, notre laboratoire a mis en évidence que, chez les patients coronariens, le taux d'IF1 circulant était négativement associé au risque de mortalité cardiovasculaire, indépendamment des facteurs de risque classiquement connus dans les pathologies cardiovasculaires tels que l'âge, l'activité physique, la consommation de tabac, la dyslipidémie, l'hypertension et le diabète (Genoux et al. 2016).

Mécanistiquement, une hypothèse intéressante serait qu'IF1 circulant proviendrait de sa dissociation de l'ecto-F₁-ATPase, attribuable à une compétition de liaison par l'apoA-I. De ce fait, un taux circulant élevé d'IF1 serait le reflet d'une augmentation de l'activité de la voie F₁-ATPase/P2Y₁₃ d'endocytose des HDL.

L'ensemble de ces études supporte la relevance physiologique de la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃ chez l'homme et fait d'IF1 un nouveau biomarqueur indépendant du risque cardio-vasculaire.

2.4.2 Fonctions de l'ecto-F₁-ATPase dans la protection endothéliale vasculaire induite par les HDL

Ecto-F₁-ATPase et protection endothéliale

Comme nous l'avons vu dans la première partie de ce chapitre, au-delà de leur rôle dans le transport retour du cholestérol, les HDL exercent des effets protecteurs directs sur la paroi vasculaire. Ces effets pleïotropiques impliquent notamment les récepteurs SR-BI, ABCA1, S1P-R, et l'ecto-F₁-ATPase.

L'ecto-F₁-ATPase a été identifiée à la membrane plasmique des cellules endothéliales humaines et bovines (Moser et al. 1999; Radojkovic et al. 2009; Cortés-Hernández et al. 2005; Quillen et al. 2006).

En 2009, les sous-unités α et β de l'ecto-F₁-ATPase ont été identifiées à la surface de la lignée cellulaire endothéliale humaine HUVEC, en tant que récepteur de l'apoA-I (Radojkovic et al. 2009). Comme à la surface des hépatocytes, la liaison de l'apoA-I stimule l'activité ATPasique de l'ecto-F₁-ATPase. L'ADP extracellulaire ainsi généré inhibe l'apoptose des cellules endothéliales et permet leur prolifération. Les effets de l'apoA-I observés lors de cette étude sont strictement dépendants de l'ecto-F₁-ATPase, puisqu'ils sont inhibés en présence de l'inhibiteur IF1-H49K, ou d'un anticorps anti- β F₁. D'autre part, les effets de l'apoA-I sont maintenus après l'extinction par siRNA des autres récepteurs aux HDL, ABCA1 et SR-BI (**Figure 15**). Enfin, l'ajout d'ADP dans le milieu extracellulaire suffit à induire une protection des cellules endothéliales contre l'apoptose.

Les cellules progénitrices endothéliales (EPCs) sont des progéniteurs hématopoïétiques impliqués dans la néovascularisation et dans la réparation de l'endothélium. Récemment, la F₁-ATPase a également été identifiée à la membrane plasmique des EPCs. Comme à la surface des cellules HUVEC, la liaison de l'apoA-I stimule la prolifération des EPCs, ainsi que le processus d'angiogenèse *in vitro*. (**Figure 15**). Finalement, les effets observés de l'apoA-I

sont dépendants de sa liaison à l'ecto-F₁-ATPase puisqu'ils sont inhibés en présence de l'inhibiteur IF1 (González-Pecchi et al. 2015).

Les récepteurs impliqués en aval de l'ecto-F₁-ATPase endothéliale ne sont pas encore identifiés. Cependant, l'activation de cette enzyme stimule la production d'ADP extracellulaire, ce qui suggère l'implication d'un récepteur purinergique sensible à l'ADP, de type P2Y₁ ou P2Y₁₂. De plus, une étude en cours du laboratoire démontre l'implication de la voie PI3K/akt en aval du récepteur purinergique potentiellement impliqué.

Ecto-F₁-ATPase et transcytose des HDL

La première étape du processus de transport retour du cholestérol est le transfert de cholestérol des cellules périphériques vers les HDL.

En particulier, afin d'atteindre les cellules spumeuses au sein de la plaque d'athérome, l'apoA-I ou les HDL doivent traverser la barrière endothéliale. Ceci s'effectue soit par transcytose (transport à travers la cellule endothéliale), soit par transport paracellulaire (passage entre les cellules endothéliales).

La transcytose de l'apoA-I faiblement lipidée est régulée par le transporteur ABCA1 (Cavelier et al. 2006), alors que celle des HDL matures est dépendante de SR-BI et d'ABCG1 (Rohrer et al. 2009). Cependant, l'extinction de ces différents acteurs n'abolit pas entièrement le processus de transcytose. Dans ce contexte, Cavelier et al ont confirmé que la liaison de l'apoA-I sur l'ecto-F₁-ATPase endothéliale stimule l'activité ATPasique de l'enzyme. Ce processus induit la transcytose de l'apoA-I faiblement lipidée, ainsi que celle des HDL matures (Cavelier et al. 2012). Le traitement des cellules par des inhibiteurs des récepteurs P2Y₁ et P2Y₁₂, MRS 2179 et 2-MeSAMP respectivement, a permis de démontrer que ce mécanisme est strictement dépendant de l'activation du récepteur P2Y₁₂, en aval de l'ecto-F₁-ATPase (**Figure 15**). De façon intéressante, le récepteur P2Y₁₂ présente une forte homologie de séquence avec P2Y₁₃, impliqué dans l'endocytose hépatique des HDL. P2Y₁₂ est également couplé à une protéine Gi (Abbracchio 2006), et peut induire l'activation de la voie RhoA/Rho kinase impliquée dans la réorganisation du cytosquelette d'actine. Ces résultats laissent donc penser que l'endocytose des HDL par les hépatocytes (dépendante de P2Y₁₃), et leur transcytose par les cellules endothéliales (dépendante de P2Y₁₂),

mettent en jeu des voies de signalisation similaires en aval d'un récepteur purinergique différent (Soulet et al. 2004).

L'ensemble de ces études met en évidence le rôle de l'axe ecto-F₁-ATPase/P2Y dans la protection endothéliale. A ce stade, il serait intéressant d'évaluer l'implication cette voie dans le développement de l'athérosclérose, particulièrement dans les stades précoces qui se caractérisent par une dysfonction endothéliale.

La **Figure 15** résume l'implication la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y dans les fonctions métaboliques et vasculaires des HDL.

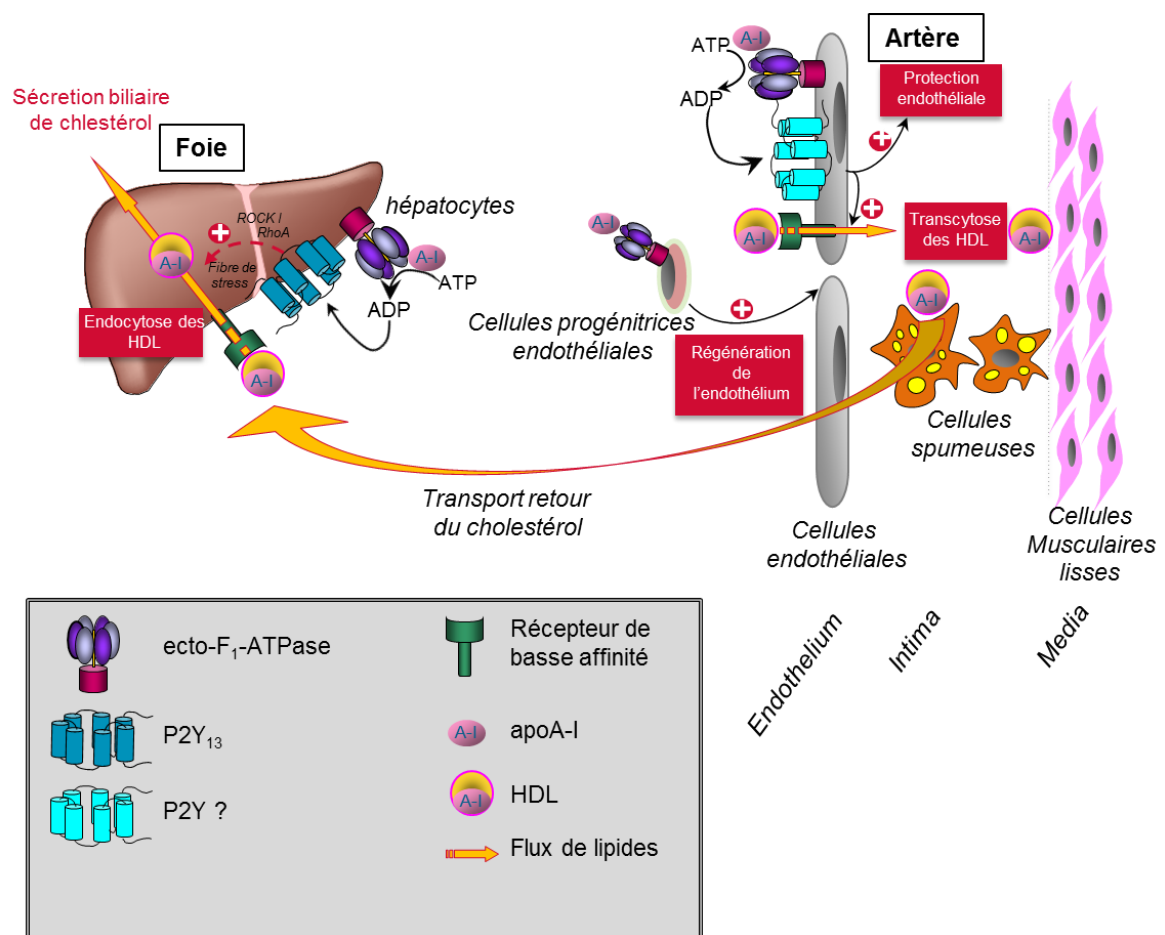


Figure 15 : Fonctions métaboliques et vasculaires de la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y.

Au niveau des cellules endothéliales, l'apoA-I se lie sur l'ecto-F₁-ATPase et stimule son activité ATPasique. L'ADP extracellulaire généré active des récepteurs purinergiques de type P2Y, ce qui stimule la survie des cellules endothéliales, ainsi que la transcytose des HDL. Ce dernier mécanisme permettrait aux HDL d'atteindre les cellules spumeuses au sein de la paroi vasculaire, et d'exercer leur capacité d'efflux du cholestérol. L'ecto-F₁-ATPase est également exprimée à la surface des cellules progénitrices endothéliales (EPC). La liaison de l'apoA-I stimule leur prolifération, contribuant ainsi à la régénération de l'endothélium vasculaire. Au niveau des hépatocytes, la liaison de l'apoA-I sur l'ecto-F₁-ATPase stimule la production d'ADP, qui active spécifiquement le récepteur purinergique P2Y₁₃. L'activation de ce dernier induit une réorganisation du cytosquelette d'actine dépendante de la voie RhoA/ROCK, qui conduit à l'internalisation de la particule HDL, par un récepteur de basse affinité dont l'identité reste encore inconnue. Le cholestérol des HDL est ensuite éliminé dans les sécrétions biliaires. D'après Martinez et al. 2015.

2.4.3 L'ecto-F₁-ATPase dans les fonctions adipocytaires

Le tissu adipeux est l'organe majeur de stockage des lipides, stockés sous forme de triglycérides et de cholestérol. De ce fait, il joue un rôle central dans le métabolisme énergétique. Le cholestérol stocké au niveau du tissu adipeux représente 1 à 5 mg/g des lipides adipocytaires totaux. Il est stocké au sein des membranes plasmiques et des gouttelettes lipidiques, essentiellement sous forme de cholestérol libre. Du fait d'une faible activité de synthèse *de novo*, la majorité du cholestérol stocké au sein des adipocytes provient des lipoprotéines (Le Lay et al. 2004). Comme au niveau hépatique et endothélial, les récepteurs SR-BI et ABCA1, sont impliqués dans les échanges de lipides entre les HDL et les adipocytes (Chung et al. 2011; Tall et al. 2008; Howard et al. 2010).

Dans ce contexte, les sous-unités α et β de l'ecto-F₁-ATPase ont également été identifiées à la membrane plasmique de la lignée adipocytaire 3T3-L1. Localisée au niveau des radeaux lipidiques, l'enzyme exercerait une activité de synthèse d'ATP dépendante du gradient de protons (Kim et al. 2004).

L'expression de la sous-unité α de l'ecto-F₁-ATPase à la surface des adipocytes semble être augmentée lors de leur différenciation (Kim et al. 2004). De plus, le traitement des cellules avec un anticorps dirigé contre cette sous-unité α ou avec l'apoA-I est associé à une diminution du stockage des triglycérides (Arakaki et al. 2007). Ces résultats suggèrent donc un rôle de la F₁-ATPase de surface dans le métabolisme lipidique des adipocytes.

Plus récemment, Howard et al ont pu démontrer que l'inhibition de l'ecto-F₁-ATPase, avec des anticorps dirigés contre la sous-unité β empêche, le processus d'endocytose sélective et de recyclage de l'apoA-I par les adipocytes. Cependant, l'inhibition de la F₁-ATPase de surface n'a pas d'effet sur l'efflux de cholestérol induit par l'apoA-I (Howard et al. 2011).

Ainsi, au niveau des adipocytes, le rôle de l'ecto-F₁-ATPase et les voies de signalisation qui lui sont associées ne sont pas encore clairement identifiées. Ces différentes études suggèrent néanmoins un lien entre cette enzyme de surface, le métabolisme lipidique et l'apoA-I. Comme au niveau des cellules endothéliales et des hépatocytes, l'ecto-F₁-ATPase pourrait jouer un rôle de récepteur pour l'apoA-I à la surface des adipocytes. L'apoA-I pourrait, *via* sa liaison à l'enzyme de

surface, exercer ces effets anti-inflammatoires ou des effets sur le métabolisme énergétique et lipidique (Wang et al. 2016).

Ainsi, les effets observés par la stimulation de l'ecto- F_1 -ATPase à l'apoA-I, notamment sur la diminution du stockage des triglycérides (Arakaki et al. 2007), pourraient être liés au rôle de cette enzyme dans la captation et le recyclage de l'apoA-I (Howard et al. 2011). Ces effets pourraient également faire intervenir un récepteur purinergique activé par l'ATP ou l'ADP (**Figure 16**). Finalement, l'endocytose sélective de l'apoA-I, précédant son recyclage, pourrait aussi impliquer un récepteur purinergique, en amont d'une voie de signalisation contribuant au remodelage du cytosquelette (Malaval et al. 2009; Hall 2005; Soulet et al. 2004).

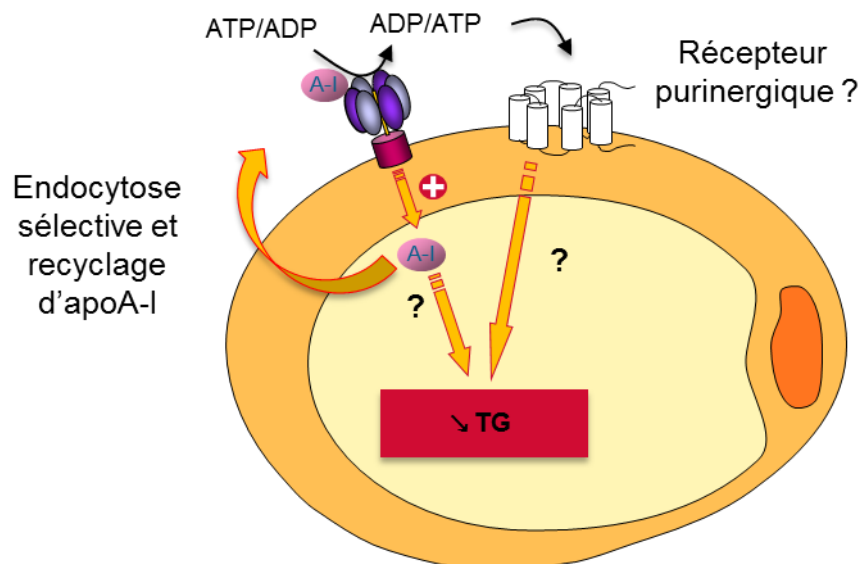


Figure 16 : Rôle de l'ecto- F_1 -ATPase à la surface des adipocytes. La F_1 -ATPase présente à la membrane plasmique des adipocytes serait impliquée dans l'endocytose sélective et le recyclage de l'apoA-I. Son activité a également été associée à une diminution du stockage des triglycérides. Ce mécanisme pourrait être directement lié à l'endocytose de l'apoA-I ou faire intervenir un récepteur purinergique. D'après Martinez et al. 2015. *TG* : triglycérides

2.5 Autres fonctions de l'ecto-F₁-ATPase

2.5.1 Angiogenèse

Deux peptides anti-angiogéniques endogènes ont été démontrés comme pouvant interagir avec l'ecto-F₁-ATPase présente à la surface des cellules endothéliales : l'angiostatine et EMAP II (*endothelial monocyte activating polypeptide II*) (Champagne et al. 2006).

L'angiostatine est le premier inhibiteur endogène de l'angiogenèse identifié chez la souris en 1994 (O'Reilly et al. 1994). C'est un fragment de 38 kDa, dérivé de la protéolyse du plasminogène, une enzyme protéolytique intervenant dans les processus de coagulation sanguine. *In vitro*, l'angiostatine est capable d'inhiber la prolifération et la migration, tout en induisant l'apoptose des cellules endothéliales (Sulene L. Chi & Pizzo 2006).

En 1999, le groupe de S.V Pizzo a identifié le site de liaison de l'angiostatine à la surface des cellules endothéliales HUVEC, comme étant les sous unités α et β de l'ecto-F₁-ATPase. La présence de cette dernière à la membrane plasmique a par ailleurs été confirmée par immunofluorescence et cytométrie de flux (Moser et al. 1999). A la surface des cellules endothéliales, l'ecto-F₁-ATPase exercerait une activité potentielle de synthèse et d'hydrolyse d'ATP (Burwick et al. 2005; Moser et al. 2001). L'activité synthase serait impliquée dans la prolifération des cellules endothéliales, particulièrement en conditions d'hypoxie, où la survie cellulaire est compromise (notamment par l'altération de la phosphorylation oxydative).

L'équipe de S.V Pizzo a ainsi proposé un modèle dans lequel la liaison de l'angiostatine sur la F₁-ATP synthase de surface conduirait à une réduction de la synthèse d'ATP, et donc de la prolifération cellulaire. Par ailleurs, la liaison de l'angiostatine empêcherait également l'extrusion de protons par l'ecto-F₁-ATP synthase, ce qui diminuerait le pH intracellulaire et compromettrait donc la survie des cellules (Sulene L Chi & Pizzo 2006) (**Figure 17**). L'IF1, également présent à la surface des cellules endothéliales, serait quant à lui impliqué dans la préservation du stock d'ATP extracellulaire en limitant la dégradation de ces nucléotides par l'ecto-F₁-ATPase (Burwick et al. 2005). Finalement, l'angiostatine inhiberait la liaison de l'IF1 sur la F₁-ATPase de surface, suggérant donc que la

prolifération cellulaire endothéliale et le processus d'angiogenèse pourraient être modulés par la liaison de l'angiostatine ou de l'IF1 sur l'ecto-F₁-ATPase (Moser et al. 1999; Moser et al. 2001; Burwick et al. 2005). Cependant, compte tenu des données décrites précédemment (partie 2-3), l'hypothèse d'une activité synthase à la membrane plasmique semble peu probable.

La protéine EMAP II a également été identifiée comme ligand de la sous unité α de la F₁-ATPase présente à la membrane plasmique des cellules endothéliales bovines BAEC (*Bovine aorta endothelial cells*), des lignées THP-1 (lignée monocyttaire leucémique) et CEM (lignée lymphoblastique). EMAP II est une cytokine impliquée dans le chimiotactisme des cellules inflammatoires (monocytes, macrophages). EMAP-II exerce également des effets anti-angiogéniques, en inhibant la prolifération et en stimulant l'apoptose des cellules endothéliales (Chang et al. 2002; Liu & Gottsch 1999).

Comme pour l'angiostatine, la liaison d'EMAP II à la F₁-ATPase de surface, est associée à une inhibition de la prolifération des cellules endothéliales. Les effets observés sont strictement dépendants de l'ecto-F₁-ATPase de surface, puisqu'ils sont inhibés lors de l'ajout de la sous-unité α soluble de l'enzyme dans le milieu extracellulaire (Chang et al. 2002).

2.5.2 Cancer

Différentes sous-unités de la F₁-ATPase ont été mises en évidence à la surface de plusieurs lignées cellulaires tumorales, notamment leucémiques (Das et al. 1994; Wen-Li et al. 2012), pulmonaires (Das et al. 1994), osseuses (Yonally & Capaldi 2006), buccales (He et al. 2004), coliques (Kowalski-Chauvel et al. 2012) ou encore prostatiques (Sulene L. Chi & Pizzo 2006).

Comme au niveau des cellules endothéliales (Moser et al. 2001), l'équipe de S.V Pizzo a démontré que l'ecto-F₁-ATPase présente à la surface des cellules tumorales exercerait une activité de synthèse d'ATP, qui serait associée à une sortie de protons vers le milieu extracellulaire. Cette activité de synthèse d'ATP serait augmentée lorsque les cellules sont cultivées dans un milieu acide, une caractéristique du microenvironnement tumoral (Sulene L. Chi & Pizzo 2006;

Zhang et al. 2008). L'inhibition de l'ecto- F_1 -ATP synthase par traitement à l'angiostatine inhiberait donc la synthèse d'ATP, et induirait une acidification du milieu intracellulaire. Ces processus conduiraient à une mort des cellules tumorales par nécrose (**Figure 17**).

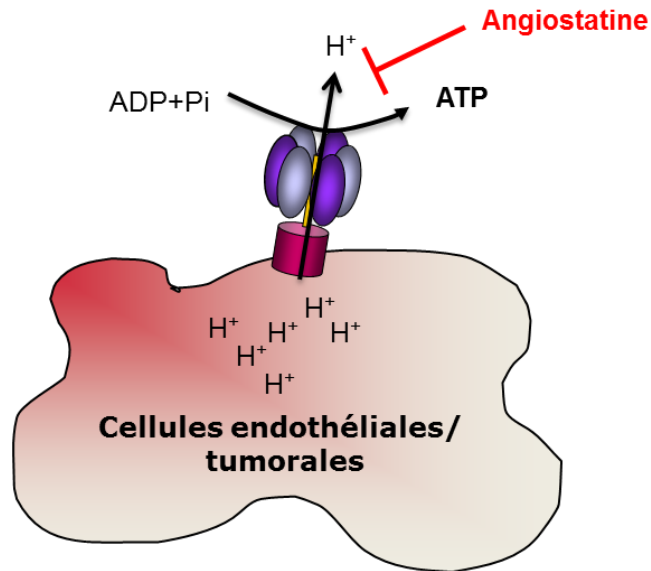


Figure 17 : Modèle proposé par S.V Pizzo, du mécanisme d'action de l'angiostatine à la surface des cellules endothéliales et tumorales. La F_1 -ATPase est exprimée à la surface des cellules endothéliales et tumorales, où elle aurait une activité de synthèse d'ATP. La génération de l'ATP serait associée à l'extrusion de protons, ce qui empêcherait l'acidification du milieu intracellulaire. La liaison de l'angiostatine à l'ATP synthase de surface inhiberait la synthèse d'ATP et induirait une acidification du milieu intracellulaire. De ce fait, l'angiostatine limiterait la prolifération des cellules endothéliales et stimulerait la mort des cellules tumorales par nécrose.

Des effets similaires à ceux observés avec l'angiostatine ont été observés sur différentes lignées cellulaires leucémiques lors de l'inhibition de l'ecto- F_1 -ATPase par traitement des cellules avec un anticorps anti- βF_1 (Wen-Li et al. 2012). D'autre part, cette inhibition de la F_1 -ATPase de surface augmente la sensibilité des cellules tumorales au Doxorubicine, un agent anti-cancéreux (Zhang et al. 2008).

Ainsi, dans un contexte tumoral, l'inhibition de l'ecto- F_1 -ATPase pourrait conduire à un double effet bénéfique : anti-angiogénique et anti-cancéreux (Mowery & Pizzo 2008).

Notre équipe a également contribué à identifier la G-Gly (*glycine-extended form of gastrin*), comme ligand de l'ecto-F₁-ATPase.

La gastrine, synthétisée sous forme de progastrine, est une hormone polypeptidique qui stimule la sécrétion d'acide gastrique, et la prolifération des cellules gastro-intestinales. La formation de gastrine à partir de son précurseur génère différents intermédiaires dont la G-Gly. Cette dernière exerce des effets pro-prolifératif *in vitro* et *in vivo* sur les cellules gastro-intestinales saines, ou cancéreuses, et exerce également des effets pro-angiogéniques. (Seva et al. 1994; Kowalski-Chauvel et al. 2012). Dans ce contexte, la F₁-ATPase de surface a été identifiée par résonance plasmonique de surface (SPR, Biacore) et spectrométrie de masse, comme récepteur de la G-Gly. En effet, la G-Gly se lie aux sous-unités α et β de l'ecto-F₁-ATPase présente à la surface des cellules cancéreuses coliques (lignée cellulaire HCT 116). La présence de la sous-unité β de l'ecto-F₁-ATPase a par ailleurs été confirmée par immunofluorescence sur des cellules épithéliales coliques saines (lignée YAMC pour *Young Adult Mouse Colon*), cancéreuses (lignées HCT116, HT 29 ET Caco-2) et sur des coupes de tissus coliques de souris. Finalement, la liaison de la G-Gly sur l'ecto-F₁-ATPase stimule la prolifération des cellules HCT116, mais également des cellules endothéliales HUVEC, de manière dépendante de l'activité hydrolase de l'enzyme.

L'ensemble de ces résultats suggèrent donc que dans le contexte du cancer, la F₁-ATPase de surface peut avoir différents ligands qui modulent son activité et induisent des effets pro-ou anti-tumoraux.

Différents travaux de notre équipe ont également décrit un rôle l'ecto-F₁-ATPase dans l'immunité anti-tumorale (Scotet et al. 2005; Vantourout et al. 2008).

Les lymphocytes T V γ 9/ V δ 2 représentent une sous population de lymphocytes cytotoxiques qui participent à la réponse immunitaire contre différents pathogènes, dont les cellules tumorales. Cette réponse est dépendante d'un mécanisme de présentation par les cellules cibles, d'alkyl diphosphates (ou phosphoantigènes), aux lymphocytes T V γ 9/ V δ 2. Notre équipe a démontré que les alkyl diphosphates produits par les cellules tumorales sont convertis en nucléotides, qui sont ensuite présentés aux lymphocytes T V γ 9/ V δ 2 *via* l'ecto-F₁-ATPase. Ce processus permet la reconnaissance de ces cellules cancéreuses par le TCR (*T cell*

receptor) présent à la surface des lymphocytes T V γ 9/ V δ 2, aboutissant ainsi à la réponse cytotoxique par ces derniers (Mookerjee-Basu et al. 2010). Dans ce contexte, la lignée cellulaire 721.221 (lignée cellulaire de lymphome) qui n'exprime pas la F₁-ATPase à la surface, n'induit pas de réponse cytotoxique dépendante des lymphocytes T V γ 9/ V δ 2. De plus, la liaison de l'apoA-I à la F₁-ATPase de surface stimule l'activation des lymphocytes T cytotoxiques. Cela suggère ainsi un rôle de cette apolipoprotéine dans la présentation des phosphoantigènes (Scotet et al. 2005). Finalement, l'ecto-F₁-ATPase interagit également avec le complexe majeur d'Histocompatibilité (CMH-I), qui est principalement exprimé à la surface des cellules non tumorales (Vantourout et al. 2008).

Ces études ont donc permis de démontrer que la F₁-ATPase est présente à la surface des cellules saines et tumorales, où elle est impliquée dans l'activation des lymphocytes T V γ 9/V δ 2. Ce mécanisme est dépendant de la présentation des phosphoantigènes aux lymphocytes T V γ 9/ V δ 2 par l'ecto-F₁-ATPase. Le processus d'activation des lymphocytes est stimulé par l'apoA-I, et inhibé par l'interaction entre l'ecto-F₁-ATPase et le CMH-I à la surface des cellules saines (**Figure 18**).

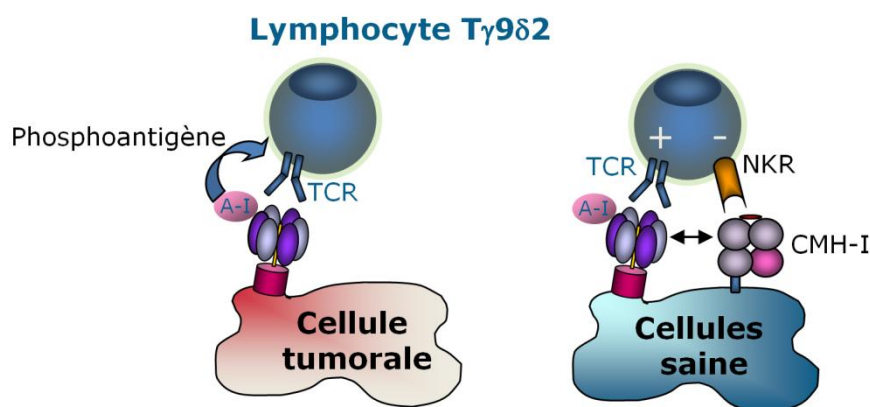


Figure 18 : Rôle de l'ecto-F₁-ATPase dans l'immunité anti-tumorale.

L'ecto-F₁-ATPase est présente à la surface des cellules saines où elle interagit avec le CMH-I. Ce mécanisme préserve les cellules de l'action cytotoxique des lymphocytes T V γ 9/V δ 2. En effet, le CMH-I inactive les lymphocytes T V γ 9/V δ 2 par interaction avec le NKR (*Natural Killer Receptor*) présent à sa surface. A la surface des cellules tumorales, une diminution de l'expression du CMH-I permet la présentation des phosphoantigènes reconnus par le TCR (*T-cell receptor*) présent à la membrane des lymphocytes T V γ 9/V δ 2. Ce mécanisme induit la dégradation des cellules tumorales. La liaison de l'apoA-I sur l'ecto-F₁-ATPase stimule l'activation des lymphocytes T.

Un mécanisme similaire a été mis en évidence *in vitro* sur les cellules endothéliales BAEC et *in vivo* dans un modèle de souris pro-athérogène apoE^{-/-}. En effet, l'ecto-F₁-ATPase présente au niveau des cellules endothéliales participe au recrutement et à l'activation des lymphocytes T γ/δ *via* l'interaction avec le TCR présent à la surface de ces derniers. Ce mécanisme induirait la sécrétion de médiateurs pro-inflammatoires tels que l'interféron γ ou le TNF- α (*Tumor Necrosis Factor* α) par les lymphocytes T. Ce processus pourrait intervenir dans l'activation de l'endothélium vasculaire et dans l'athérogénèse (Fu et al. 2011).

En conclusion, le rôle de l'ecto-F₁-ATPase dans le cancer semble être complexe et malgré la caractérisation *in vitro* de son mécanisme d'action, son rôle *in vivo* reste très peu étudié dans le contexte du cancer. En fonction de ses ligands, de son activité et des partenaires qui lui sont associés, il semblerait que l'ecto-F₁-ATPase puisse avoir des fonctions protectrices (immunité anti-tumorale) ou délétères (survie des cellules tumorales, effets pro-angiogéniques).

Une étude fait cependant état d'un effet bénéfique de l'inhibition de l'ecto-F₁-ATPase sur le développement de tumeurs hépatiques (Wang et al. 2008). En effet, l'injection d'anticorps dirigés contre la sous-unité β de la F₁-ATPase chez des souris durant 2 à 4 semaines, réduit le volume des tumeurs hépatiques induites par xénogreffe. Cependant, dans ce travail, les injections d'anticorps bloquants ont été réalisées en intra-tumoral. Par conséquent, les effets potentiels de cette inhibition sur d'autres organes restent inconnus.

2.5.3 Neurones

En 2006, une étude de protéomique a identifié la présence de la sous-unité β de la F₁-ATPase au niveau des radeaux lipidiques dérivés de membrane plasmique de différents tissus, dont le cerveau (Kim et al. 2006).

Un rôle de cette enzyme a été décrit dans le métabolisme lipidique neuronal en 2008.

La forme infantile de la ceroiï-lipofuscinose (INCL) est une encéphalopathie de l'enfant, se caractérisant par un déclin des fonctions intellectuelles et motrices, une épilepsie, et une perte de la vision par dégénérescence rétinienne. Un déficit enzymatique de la protéine sérine hydrolase ppt1 (*palmitoyl protein thioesterase*

1), (une protéine qui permet l'hydrolyse des acides gras lié aux résidus cystéines des protéines) a été rapporté dans cette pathologie. Dans ce contexte, un modèle de souris invalidées pour *ppt1* présente une augmentation de l'expression des sous-unités α et β de la F_1 -ATPase au niveau de la membrane plasmique des neurones corticaux, ainsi que des fibroblastes. Cette expression plus importante est associée à une augmentation de l'endocytose de l'apoA-I par les neurones, ainsi qu'à une réduction du cholestérol, et de l'apoA-I circulante (Lyly et al. 2008). Finalement, les auteurs ont mis en évidence un profil lipoprotéique différent chez ces souris déficientes pour *ppt1*, avec notamment une réduction importante des particules HDL larges.

Ces résultats suggèrent donc qu'au niveau neuronal, *ppt1* pourrait réguler la distribution de la F_1 -ATPase. Comme au niveau hépatique, cette dernière jouerait le rôle de récepteur de l'apoA-I. Ce mécanisme participerait à la régulation de l'homéostasie lipidique du cerveau, un processus essentiel au bon fonctionnement du système nerveux central (Dietschy & Turley 2004). Ainsi, cette étude établit un lien potentiel entre l'ecto- F_1 -ATPase neuronal, le métabolisme lipidique, et la neurodégénérescence.

Le récepteur $P2Y_{13}$, impliqué dans l'endocytose hépatique des HDL, étant également exprimé au niveau du cerveau (Del Puerto et al. 2013), il pourrait être impliqué dans le métabolisme lipidique neuronal, en aval de l'activité de l'ecto- F_1 -ATPase.

Finalement, la sous-unité α de l'ecto- F_1 -ATPase est également présente à la surface des neurones de l'hippocampe et des astrocytes, où elle joue le rôle de récepteur pour la protéine précurseur de l'amyloïde (APP *Amyloid precursor protein*) et pour la protéine β amyloïde ($A\beta$). Ces protéines sont retrouvées au niveau du système nerveux central et sont impliquées dans divers processus physiologiques et physiopathologiques liés notamment à la croissance, la survie et la transmission neuronale. Par ailleurs, l'accumulation d' $A\beta$ contribue au développement de la maladie d'Alzheimer. La liaison d'APP ou d' $A\beta$ sur l'ecto- F_1 -ATPase réduirait la synthèse d'ATP dépendante de celle-ci, ce qui conduirait à une diminution de la plasticité synaptique. Cette étude suggère ainsi un nouveau rôle potentiel de la protéine amyloïde β dans le développement de la maladie d'Alzheimer *via* son action sur l'ecto- F_1 -ATPase (Schmidt et al. 2008).

2.5.4 Kératinocytes

En 2005, Burrell et *al.* ont démontré que la lignée de kératinocytes humains, HaCaT, est capable de produire de l'ATP dans le milieu extracellulaire, en réponse à l'ajout d'ADP, de GTP ou d'UTP. Dans cette étude, comme à la surface des hépatocytes (Fabre et al. 2006), la majorité de l'ATP produit est attribuée à des activités adénylate kinase ($2\text{ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$), et nucléoside diphosphate kinase ($\text{ADP} + \text{nucléoside triphosphate} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{nucléoside diphosphate}$). Cependant, les auteurs ont également identifié une activité de synthèse d'ATP potentiellement attribuable à une ATP synthase de surface. En effet, la production d'ATP en réponse à l'ajout d'ADP, est significativement diminuée après traitement des cellules par l'oligomycine, un inhibiteur de l'activité de l'ATP synthase. La présence à la surface de la sous-unité β de l'ATP synthase a par ailleurs été confirmée par immunofluorescence sur des kératinocytes non perméabilisés (Burrell et al. 2005). Cependant, les auteurs n'ont pas pu mettre en évidence cette localisation membranaire de l'enzyme sur des échantillons de peau humaine.

Bien que la fonction de l'ATP synthase à la surface des kératinocytes reste inconnue à ce jour, elle pourrait jouer un rôle dans l'activation de certains récepteurs purinergiques présents à la surface des cellules de l'épiderme (P2Y_1 , P2Y_2 , P2Y_4). Ce processus pourrait ainsi être impliqué dans la régulation de l'apoptose, de la prolifération, et de la différenciation des kératinocytes (Burrell et al. 2003; Greig et al. 2003).

Chapitre II : L'autophagie

1. Généralités

Le système ubiquitine-protéasome (UPS) est un système multi-enzymatique qui intervient dans la dégradation régulée des protéines intracellulaires.

Schématiquement, ce système fonctionne en deux grandes étapes distinctes :

Dans un premier temps, une cascade de réactions enzymatiques va permettre à la protéine substrat d'être « marquée ». Ce marquage se fait par l'addition d'une chaîne formée de la conjugaison successive d'une ou plusieurs molécule(s) d'ubiquitine (Ub).

Dans un second temps, la chaîne de poly-ubiquitine est reconnue par une protéase appelée le protéasome 26S, qui dégrade la protéine ubiquitylée en peptides inactifs.

L'autophagie constitue un mécanisme de dégradation alternatif au système ubiquitine-protéasome. L'autophagie est un terme provenant du grec qui signifie manger («phagie»), soi-même («auto»). Ce processus désigne donc la dégradation par la cellule de ses propres constituants, par les lysosomes.

L'autophagie a été mise en évidence pour la première fois il y a environ 40 ans par microscopie électronique, dans des foies de rats perfusés au glucagon (T.P. Ashford and K.R. Porter. 1962; De Duve 1967).

Longtemps considérée comme un processus de dégradation, il est clairement démontré aujourd'hui que l'autophagie joue un rôle majoritaire dans le recyclage des composants cellulaires, et par conséquent dans le maintien de l'homéostasie de la cellule. Les métabolites générés par ce processus vont ainsi fournir une source d'énergie à la cellule et également servir à la synthèse de nouvelles macromolécules (Boya et al. 2013).

2. Les différents types d'autophagie

Trois types d'autophagie ont été identifiés. L'autophagie dépendante des chaperonnes (*CMA – Chaperone mediated autophagy*), la microautophagie, et la macroautophagie (**Figure 19**).

2.1 L'autophagie dépendante des chaperonnes (CMA)

L'autophagie dépendante des chaperonnes (CMA) est un type d'autophagie hautement sélectif dans lequel des protéines sont sélectivement adressées au lysosome pour être dégradées.

Lors de la CMA, les protéines cibles contenant le pentapeptide KFERQ (Lysine-Phénylalanine-Acide glutamique-Arginine-Glutamine) sont reconnues et prises en charge par un complexe protéique composé notamment de la chaperonne Hsc70 (*Heat Shock-Cognate protein of 70 kDa*). Cette dernière va interagir avec la partie cytosolique du récepteur Lamp2A (*Lysosome-Associated Membrane Glycoprotein 2A*), présent à la surface des lysosomes. Cette interaction induit la multimérisation du récepteur qui va ainsi pouvoir former un canal. Celui-ci, assisté par l'action de diverses autres protéines chaperonnes, va permettre à la protéine cible de rejoindre la lumière du lysosome, où elle va être dégradée par des protéases (Cuervo & Wong 2014) (**Figure 19**)

La CMA a été montrée comme ayant une activité basale, mais la privation en nutriments durant de longues périodes (8-10h) reste son stimulus le mieux caractérisé. Le rôle majoritaire de la CMA est donc de suppléer la cellule en acides aminés pendant ces longues périodes de privation (Cuervo & Wong 2014; Massey et al. 2006). La CMA joue également un rôle dans la dégradation de certains facteurs de transcription, modifiant ainsi le protéome de la cellule (Cuervo et al. 1998). De ce fait, ce processus permet aux cellules de s'adapter à certaines conditions. Ce mécanisme a par exemple été mis en évidence dans les changements métaboliques nécessaires à l'adaptation des cellules cancéreuses à de faibles quantités de nutriments (Lv et al. 2011; Kon et al. 2011). Enfin, la CMA est impliquée dans la qualité et le contrôle des composants cellulaires. En effet, elle intervient dans la dégradation des protéines cytosoliques dysfonctionnelles, notamment les protéines oxydées (Massey et al. 2006; Kiffin 2004).

Ainsi, ce sous-type d'autophagie semble avoir un rôle important dans l'homéostasie cellulaire et dans les processus adaptatifs. Des altérations de la CMA et notamment une perturbation de l'activité du complexe de translocation lysosomale formé par la multimérisation des protéines lamp2A, sont donc associées à diverses pathologies neurodégénératives, comme la maladie de parkinson, mais sont également associées à certains cancers (Cuervo & Wong 2014).

2.2 La microautophagie

La microautophagie est un processus de dégradation qui se caractérise par le recrutement de composants cytoplasmiques à proximité de la membrane lysosomale. Celle-ci va s'invaginer, et séquestrer les substrats cytoplasmiques au sein du lysosome afin qu'ils soient dégradés (Li et al. 2012). Différentes études ont mis en évidence l'existence de formes sélectives de microautophagie, telle que la microautophagie du noyau (Krick et al. 2008), la micromitophagie, ciblant les mitochondries (Kiššová et al. 2007) ou la microperoxyphagie, ciblant les peroxysomes (Bellu et al. 2001).

Brièvement, la microautophagie se décompose en différentes étapes régulées par un grand nombre de protéines. La première étape de ce processus se caractérise par la formation d'invaginations au sein de la membrane lysosomale. Ce mécanisme constitutif est fortement stimulé lors de périodes de privation en nutriments, ou lors du traitement à la rapamycine, deux inducteurs de l'autophagie (Dubouloz et al. 2005). Les invaginations générées sont de formes tubulaires et sont appelées « tubes d'autophagie ». L'enrichissement de la membrane en lipides au sein de ces « tubes d'autophagie » va par la suite générer spontanément des structures vésiculaires, qui vont se développer, et être internalisées au sein du lysosome. Cette étape d'internalisation est dépendante de l'action de protéines classiquement impliquées dans la fusion des membranes appelées SNAREs (*Soluble N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein Receptor*). Les composants cytoplasmiques internalisés au sein de ces vésicules seront ensuite dégradés par les enzymes lysosomales, puis recyclés (**Figure 19**).

La microautophagie reste la forme d'autophagie la moins connue et étudiée. Néanmoins, on lui suppose un rôle dans certaines pathologies

neurodégénératives telles que la maladie de Huntington ou la maladie de Creutzfeldt–Jakob (Li et al. 2012).

2.3 La macroautophagie

La macroautophagie sera désignée dans la suite de ce manuscrit par le terme autophagie. Elle se distingue des autres formes d'autophagie par la formation d'une structure vésiculaire formée d'une double membrane appelée « autophagosome ». Ce dernier va séquestrer les constituants cytoplasmiques, puis fusionner avec le lysosome. Ce mécanisme génère des « autolysosomes » au sein desquels le matériel séquestré sera dégradé par les enzymes lysosomales, puis recyclé (Boya et al. 2013; Sarkar 2013). La macroautophagie représente la forme la mieux caractérisée et majoritaire d'autophagie.

Brièvement, la formation de l'autophagosome peut être initiée en condition basale, ou peut être induite par un stress cellulaire, tel que la privation en nutriments ou l'hypoxie. Ce processus nécessite l'intervention de cascades de signalisation complexes, impliquant notamment le complexe mTORC1 (*mammalian target of rapamycin complex 1*), qui joue un rôle central dans la régulation de l'induction de l'autophagie. Ces voies de signalisation activent les protéines appelées *atg* (*Autophagy related gene*). Plus de 30 protéines de cette famille ont été identifiées chez la levure, dont la plupart ont des homologues chez les mammifères. Les protéines *atg* sont impliquées dans la biogénèse et l'élongation des autophagosomes, ainsi que dans la fusion de ces derniers avec les lysosomes (**Figure 19**)

Les constituants cytoplasmiques dégradés par le processus d'autophagie vont ainsi générer des acides aminés, des lipides, ou des sucres. Ces derniers permettront la synthèse de nucléotides ou de protéines, la production énergétique (cycle de krebs, glycolyse), la synthèse de membrane, ou encore le maintien de la glycémie (gluconéogenèse, synthèse de carbohydrate) (Boya et al. 2013).

Compte tenu de son rôle central dans l'homéostasie de la cellule, l'autophagie intervient dans un grand nombre de processus tels que la différenciation cellulaire, le renouvellement et le contrôle des constituants cytoplasmiques, l'adaptation à la carence énergétique ou en nutriments, l'immunité, ou encore la mort cellulaire.

Sa dérégulation a été par conséquent largement étudiée ces dernières années, et est associée à de nombreuses situations physiopathologiques telles que le cancer (White 2015), les maladies neurodégénératives (Nikoletopoulou et al. 2015), les maladies cardiovasculaires (Vindis 2015), le diabète (Gonzalez et al. 2011) ou les pathologies hépatiques (Codogno & Meijer 2013).

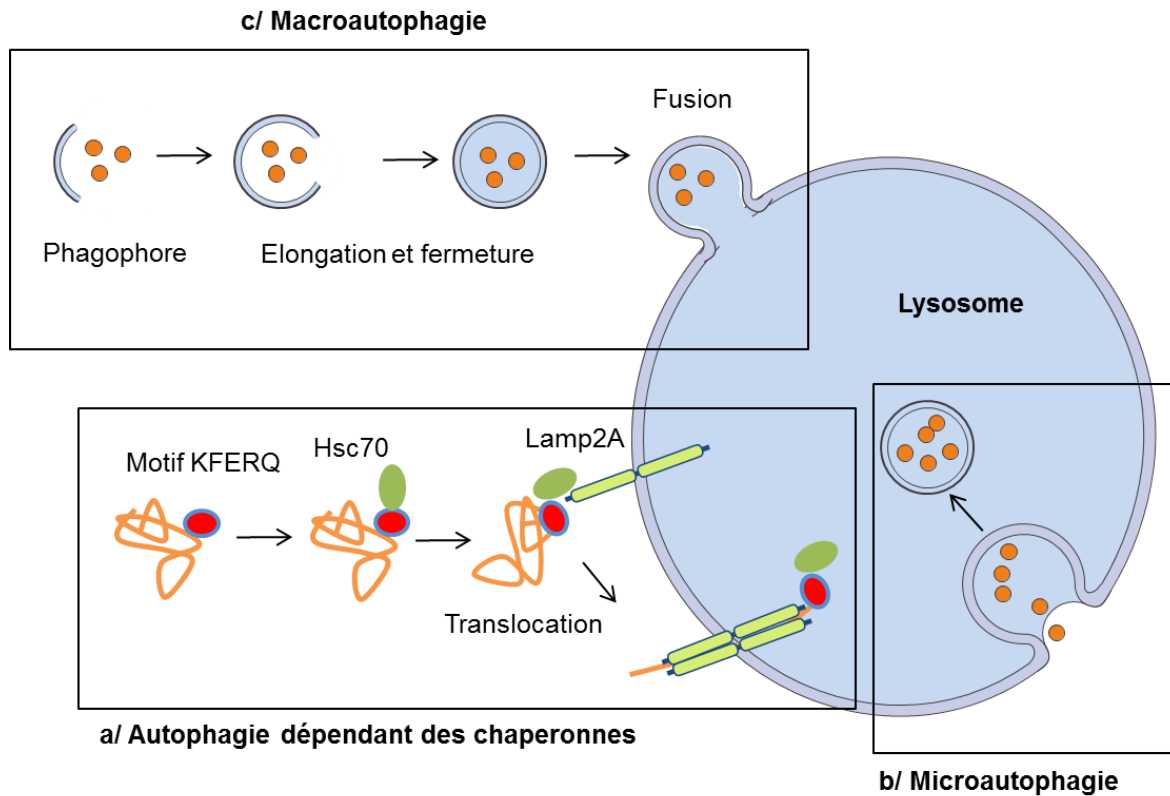


Figure 19 : Les différents types d'autophagie. (a) Durant l'autophagie dépendante des chaperonnes, les protéines destinées à la dégradation sont reconnues par des protéines chaperonnes dont Hsc70. Ces dernières vont s'associer avec Lamp2A présent à la surface lysosomale et permettre la translocation des protéines dans le lysosome afin qu'elles soient dégradées. **(b)** La microautophagie se caractérise par le recrutement direct à la membrane lysosomale des composants cytoplasmiques. Ces derniers sont internalisés au sein du lysosome puis dégradés. **(c)** La macroautophagie ou autophagie se caractérise par la séquestration de matériel cytoplasmique par une structure formée d'une double-membrane appelée « autophagosome ». Celui-ci fusionne avec le lysosome afin que son contenu soit éventuellement dégradé et recyclé. D'après Boya et al. 2013.

3. Les étapes de l'autophagie

Le processus d'autophagie peut être subdivisé en différentes étapes : l'initiation et la nucléation, l'élongation, la maturation et la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. L'initiation représente la transmission du signal d'induction de l'autophagie, et l'assemblage de complexes protéiques à proximité d'une membrane source de la membrane autophagosomale. La nucléation est la formation de la membrane à partir de cette source, générant un « pré-autophagosome » appelé phagophore. Il s'en suit l'élongation du phagophore et son incurvation autour du contenu cytoplasmique à séquestrer. Cette structure membranaire se fermera alors autour du « cargo », pour former un autophagosome mature qui par la suite fusionnera avec le lysosome (Lamb et al. 2013; Sarkar 2013). Le contenu de l'autolysosome généré sera alors dégradé puis recyclé.

3.1 Origine de la membrane de l'autophagosome

Chez la levure, l'autophagosome dérive d'une structure unique appelée PAS (*pré-autophagosomal structure*), qui se situe proche des vacuoles. C'est au niveau de ces sites que s'effectuent, sous le contrôle d'un grand nombre de facteurs *atg*, la nucléation et l'élongation de l'autophagosome (Mizushima et al. 2011).

En revanche, chez les mammifères l'origine membranaire de cette structure est encore débattue. L'augmentation importante du nombre d'autophagosomes lors de la privation en nutriments implique la capacité des cellules à mobiliser rapidement une quantité importante de lipides. Il semblerait donc que la membrane ne soit pas synthétisée *de novo* mais provienne d'organites préexistants.

En 2008, Axe et al ont mis en évidence lors de l'induction de l'autophagie par privation en nutriments, la formation de structures particulières au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Les auteurs ont nommé ces structures « omégasomes » en raison de leur forme en « Ω ». Ces dernières constitueraient une plate-forme pour le regroupement des protéines de l'autophagie, et seraient une source de membrane impliquée dans la biogénèse et l'élongation des

autophagosomes (Axe et al. 2008). Le lien entre le réticulum endoplasmique et la formation de l'autophagosome a par la suite été confirmé par une étude de tomographie électronique. Les auteurs ont en effet pu observer l'interconnexion des membranes du phagophore et du RE, lors de l'induction du processus d'autophagie par la privation en nutriments (Ylä-Anttila et al. 2009).

Par ailleurs, les sites de contact entre le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (Hamasaki et al. 2013), ou encore la membrane externe mitochondriale (Hailey et al. 2010) ont également été identifiés comme étant directement impliqués dans la nucléation des phagophores.

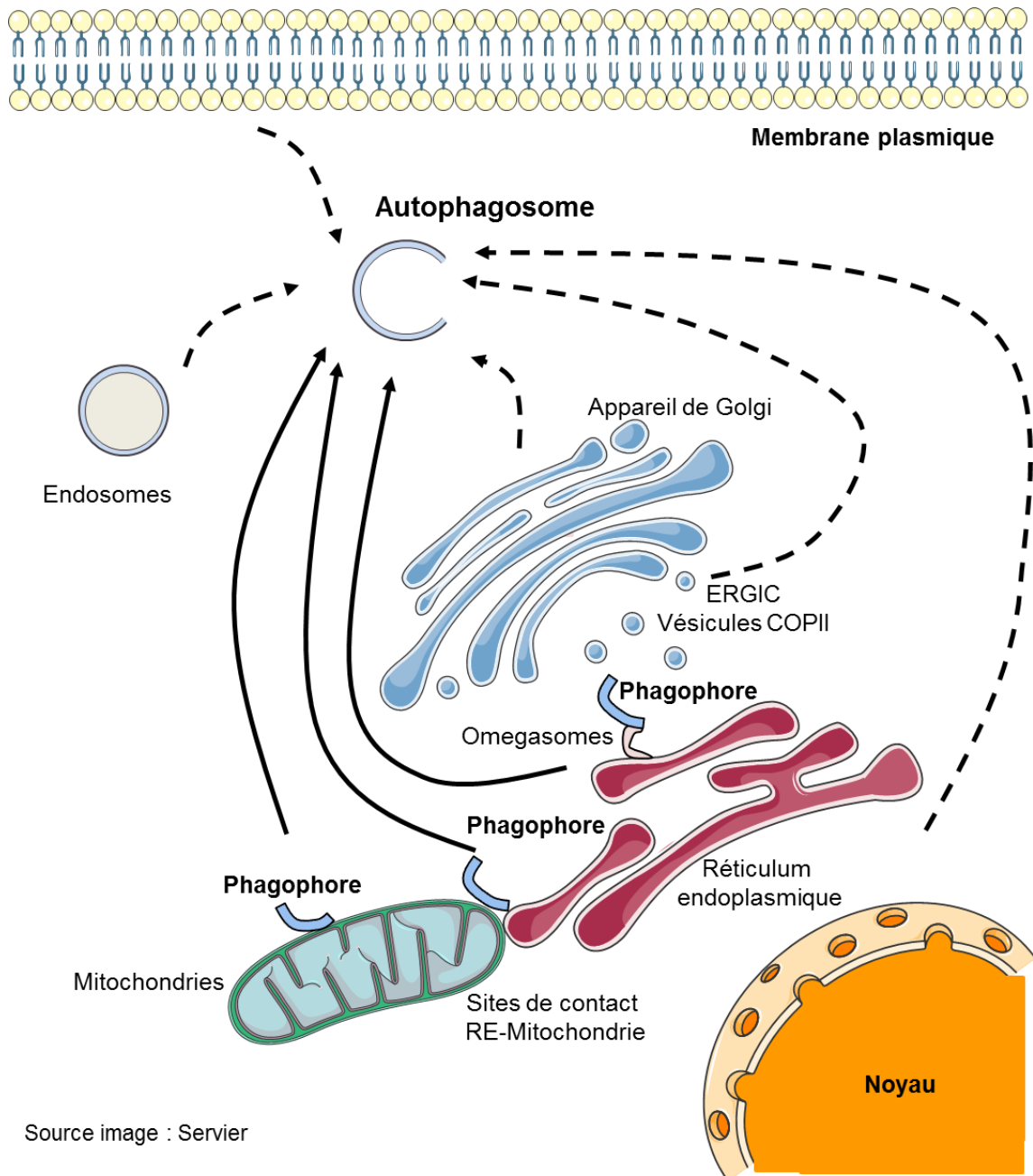
D'une part, l'induction de l'autophagie par privation en nutriments conduit au recrutement d'*atg14L*, un facteur impliqué dans la nucléation des autophagosome, au niveau des sites MAM (*mitochondria-associated ER membrane*), où le phagophore est alors formé (Hamasaki et al. 2013).

D'autre part, lors de la carence nutritive, les marqueurs précoces (*atg5*) et tardifs (LC3) de l'autophagie ont été retrouvés localisés au niveau des mitochondries. De plus, des échanges de lipides et de protéines ont été mis en évidence entre la membrane externe mitochondriale et des structures caractéristiques des autophagosomes (Hailey et al. 2010).

D'autres études ont reporté la participation de l'appareil de golgi (van der Vaart et al. 2010), du compartiment intermédiaire entre le RE et le Golgi (*ERGIC pour ER to Golgi intermediate compartment*) (Ge et al. 2014), des endosomes (Lamb et al. 2016), ou encore des membranes plasmiques (Ravikumar et al. 2010) et nucléaires (English et al. 2009), comme source de membrane lors de la formation de l'autophagosome.

Cependant, on ne sait pas encore si ces diverses sources membranaires sont impliquées dans l'étape de nucléation ou dans celle d'élongation des autophagosomes (Carlsson & Simonsen 2015).

Le processus de formation de l'autophagosome semble donc être complexe chez les mammifères (**Figure 20**), et pourrait avoir lieu dans différents compartiments cellulaires, et donc impliquer diverses sources membranaires. On ne peut cependant pas exclure que ces différentes sources pourraient être mobilisées différemment en fonction du stimulus d'autophagie.



Source image : Servier

Figure 20 : Sources potentielles de la membrane de l'autophagosome. L'autophagosome pourrait être formé au niveau des omégasomes, dérivés du réticulum endoplasmique. La nucléation pourrait également avoir lieu au niveau des sites de contact RE-mitochondrie ou à la membrane externe de la mitochondrie (Flèche pleine). D'autres sources telles que les endosomes, l'appareil de Golgi, la membrane nucléaire ou la membrane plasmique pourraient également fournir des lipides pour la formation et l'expansion des phagophores (Flèches pointillés). Le compartiment intermédiaire RE-Golgi (*ERGIC*), par l'intermédiaire des vésicules COPII classiquement impliquées dans le transport entre le RE et le Golgi) pourrait également fournir des lipides pour la formation et l'expansion des phagophores (Flèche en pointillés). La contribution de ces diverses sources dans les étapes de nucléation ou d'expansion de l'autophagosome n'est pas connue (*COP* : coat protein).

3.2 Initiation et nucléation de l'autophagosome

Les étapes d'initiation et de nucléation de l'autophagosome dépendent de 2 grands complexes protéiques. Le premier complexe se compose des protéines ULK1/2 (*UNC-51-like kinase 1/2*), *atg13*, et FIP200 (*focal adhesion kinase family-interacting protein of 200 kDa*). Le second complexe mis en jeu se compose des protéines Beclin1, VPS34, et VPS15 (*vacuolar protein sorting*) (Lamb et al. 2013; Rogov et al. 2014). En plus de ces deux complexes, la protéine *atg9* intervient également dans le processus de nucléation du phagophore (Yamamoto et al. 2012; Mari et al. 2010).

3.2.1 Le complexe ULK1/2- *atg13*-FIP200 ou complexe ULK

L'initiation de l'autophagie chez la levure est sous le contrôle du complexe *atg1-atg13-atg17*. Ce complexe est très conservé au cours de l'évolution, et correspond à son homologue ULK1/2-*atg13*-FIP200 chez les mammifères. Chez ces derniers, une quatrième protéine, *atg101*, vient s'ajouter à ce complexe ternaire. *Atg101* interagit avec *atg13* et inhibe sa dégradation par le système UPS, permettant ainsi la stabilisation du complexe ULK1/2-*atg13*-FIP200 (Mercer et al. 2009).

Les protéines ULK1/2, *atg13* et FIP200 forment un complexe stable chez les mammifères. Ce complexe est sensible au statut énergétique de la cellule *via* l'AMPK (*AMP-activated protein kinase*) et la sérine thréonine kinase mTOR (*mamalian target of rapamycin*), situées en amont (Sarkar 2013).

Ainsi, en condition riche en nutriments, la protéine mTOR phosphoryle les protéines ULK1/2 et *atg13* permettant l'association de mTOR et du complexe ULK. Cette interaction inactive le complexe ULK, ce qui empêche l'initiation de l'autophagie.

En condition de stress, comme lors d'une carence nutritionnelle, ou suite à un traitement à la rapamycine, la kinase mTOR est inhibée et se dissocie du complexe ULK. Il s'en suit une diminution de la phosphorylation d'ULK1/2 et d'*atg13* et par conséquent une activation de la kinase ULK1/2 (Lamb et al. 2013). Les protéines sérine-thréonine kinases ULK1/2 activées phosphorylent alors les

protéines *atg13* et FIP200, permettant ainsi le recrutement du complexe ULK au site d'initiation de la formation du phagophore (Chan et al. 2009; Lamb et al. 2013).

3.2.2 Le complexe Beclin1-VPS34-VPS15

La protéine Phosphatidylinositol 3-kinase (PI3-Kinase) de classe III VPS34 est une protéine lipide kinase qui produit du phosphatidylinositol-3-phosphate (PtdIns13P ou PI3P) à partir de phosphatidylinositol (PtdInsP ou PI). Cette activité lipide kinase est dépendante de la protéine régulatrice VPS15, qui permet l'ancrage du complexe au niveau des membranes.

Il existe trois complexes principaux chez les mammifères, dans lesquels VPS34 intervient :

- Un complexe de base constitué de VPS34, VPS15, et de Beclin1 (homologue de VPS30 chez la levure).
- Le Complexe I composé de Beclin1-VPS34-VPS15, associé à *atg14L* (homologue d'*atg14* chez la levure).
- Le complexe II composé de Beclin1-VPS34-VPS15 associé à UVRAG (*UV radiation resistance-associated gene*) (Backer 2016).

Lors de l'induction de l'autophagie par privation en nutriments, le complexe I interviendrait dans la nucléation du phagophore. Le PI3P généré par ce complexe permet le recrutement de divers effecteurs *via* leurs domaines FYVE (*Fab-1*, *YGL023*, *Vps27*, and *EEA1*) ou PX (*Phox homology*). Ces effecteurs, tels que la protéine DFCP1 (*double-FYVE-domain-containing protein 1*), ou les protéines WIPI (*WD repeat domain phosphoinositide-interacting protein*) (Axe et al. 2008; Lamb et al. 2013), sont recrutés au niveau des sites d'initiation de l'autophagie et participent à la nucléation du phagophore (Lamb et al. 2013; Velikkakath et al. 2012; Backer 2016).

Certains travaux ont décrit un rôle du complexe II dans la nucléation des autophagosomes (Liang et al. 2006). Cependant, son rôle est sujet à controverse puisque l'extinction d'UVRAG dans la lignée cellulaire HeLa n'affecte pas le processus d'autophagie (Parzych & Klionsky 2014). D'autre part, certaines études

seraient plutôt en faveur d'un rôle d'UVRAG dans les étapes de fusion de l'autophagosome avec les lysosomes (Backer 2016; Liang et al. 2008) (Partie 3-4).

Ces différents complexes peuvent également recruter d'autres partenaires ce qui conduit à la modulation de l'activité lipide kinase de VPS34, ou à la modification de la localisation intracellulaire des complexes (Backer 2016).

- **La protéine AMBRA1** (*Autophagy And Beclin 1 Regulator 1*) peut interagir avec Beclin1. La liaison préférentielle d'AMBRA1 aux complexes I ou II n'est pas encore connue.

La liaison d'AMBRA1 à Beclin1 module la localisation cellulaire du complexe Beclin1-VPS34-VPS15. En effet, AMBRA1 interagit avec la dynéïne, ce qui permet la séquestration du complexe Beclin1-VPS34-VPS15 le long du réseau de microtubules. Lors de l'induction de l'autophagie par privation en nutriments, AMBRA1 se dissocie de la dynéïne, permettant le recrutement du complexe Beclin1-VPS34-VPS15 au niveau du site de formation du phagophore (Di Bartolomeo et al. 2010; Backer 2016).

- **La protéine Bif-1** (*Endophilin-B1*) est une protéine cytosolique contenant un domaine BAR (*bin-ampiphysin-Rvs*) en N-terminal, qui lui permet d'interagir avec les membranes incurvées. Ainsi, il a été proposé que Bif-1, *via* son interaction avec UVRAG, forme un complexe Beclin1-VPS34-VPS15-UVRAG-Bif-1. Ce complexe serait recruté au site de formation de l'autophagosome, où il interviendrait alors pour stimuler l'incurvation membranaire, un mécanisme nécessaire à la génération des autophagosomes.
- **La protéine Bcl2** (*B-Cell lymphoma 2*). La liaison de Beclin1 au niveau de son domaine BH3, avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, empêche son interaction avec VPS34. Ce mécanisme inhibe ainsi l'initiation de l'autophagie. L'interaction Bcl-2-Beclin1 peut-être régulée par divers mécanismes que nous détaillerons dans la partie 4.1.3.

D'autre part, l'activité des complexes I et II peut être modulée par un grand nombre de modifications post-traductionnelles. Dans ce contexte, lors de l'induction de l'autophagie par privation en nutriments, ULK1 stimule l'activité lipide kinase de VPS34 par phosphorylation de Beclin1 sur la sérine 14 (Backer 2016).

3.2.3 La protéine *atg9*

La protéine transmembranaire *atg9* serait également impliquée dans le processus de nucléation mais aussi d'élongation de l'autophagosome. Chez la levure, *atg9* est impliquée dans le transport de lipides de l'appareil de golgi, vers les structures pré-autophagosomales (PAS), par l'intermédiaire de vésicules golgiennes.

Cette fonction est conservée chez les mammifères. En effet, en condition riche en nutriments, des vésicules portant la protéine *atg9* sont observées comme transitant entre l'appareil de golgi et les endosomes.

Lors de l'induction de l'autophagie par privation en nutriments, ces vésicules circulent et permettent le transport de lipides de l'appareil de golgi, vers l'autophagosome naissant. *Atg9* pourrait également fournir des lipides à partir des endosomes.

Atg9 n'est pas retrouvé au niveau des autolysosomes. Ainsi, ce facteur interviendrait uniquement afin de fournir des membranes, lors des étapes de formation du phagophore, et lors de l'étape d'élongation de l'autophagosome. Il n'interviendrait pas lors de la maturation de l'autophagosome (Orsi et al. 2012; Puri et al. 2013; Lamb et al. 2013; Rogov et al. 2014; Reggiori & Tooze 2012).

3.3 Elongation de l'autophagosome

Après la nucléation de l'autophagosome, ce dernier va subir une étape d'élongation jusqu'à sa fermeture. Deux systèmes principaux, dit UBL (pour *ubiquitin-like-system*), en référence au mécanisme d'ubiquitylation sont impliqués dans cette étape. La protéine *atg9* joue également un rôle dans ce processus (Rogov et al. 2014).

3.3.1 Le complexe *atg12-atg5-atg16L*

Dans ce système UBL, *atg12* est apparenté à l'ubiquitine. En présence d'ATP, *atg12* est activée puis transférée sur *atg10* (*E2-like conjugating enzyme*) par la protéine *atg7* (*E1-like activating enzyme*). *Atg10* va ensuite permettre la formation d'une liaison covalente entre *atg12* et la protéine *atg5*. Ce complexe *atg12-atg5* va finalement s'associer de manière non covalente avec *atg16L*, formant ainsi le complexe *atg12-atg5-atg16L*. Les protéines *atg16L* vont alors s'oligomériser, ce qui permet la formation de larges complexes multimériques *atg12-atg5-atg16L* (**Figure 21**).

Ces complexes sont recrutés à la membrane externe du phagophore, où ils sont nécessaires à l'élongation de cette structure (Romanov et al. 2012; Rogov et al. 2014). Ce complexe joue également un rôle d'*E3 ubiquitin ligase like*, en participant au processus de lipodation du 2^{ème} système essentiel à l'étape d'élongation, MAP-LC3 (*microtubule-associated protein light chain 3*) (**Figure 21**). Le complexe *atg12-atg5-atg16L* sera ensuite dissocié après la fermeture des membranes de l'autophagosome.

3.3.2 Le système *atg8*/MAP-LC3

Six homologues de la protéine *atg8*, une protéine *ubiquitin-like* présente chez la levure ont été identifiés chez l'homme.

Ces homologues sont regroupés en trois grandes sous-familles : la sous-famille MAP-LC3 (nommée également LC3), contenant les membres LC3A, LC3B et LC3C, la sous-famille GAPARAP (*γ- amino-butyric acid receptor associated-protein*), contenant les membres GABARAP et GABARAPL1, et la sous-famille

GATE16 (*Golgi-associated ATPase enhancer of 16kDA*) dont le seul membre est GABARAPL2/GATE16.

LC3 reste la sous-famille la plus étudiée. Cependant, tous les membres de cette famille de protéines sont impliqués dans l'élongation et la fermeture de l'autophagosome mais à différentes étapes. En effet, les membres de la sous-famille LC3 participeraient à l'expansion du phagophore et ceux de la sous-famille GABARAP permettraient plutôt la fermeture de l'autophagosome. De plus, les membres de la sous-famille GABARAP participeraient au détachement du complexe *atg12-atg5-atg16L* de la membrane externe autophagosomale (Weidberg et al. 2010; Lamb et al. 2013).

LC3 est synthétisée sous la forme d'un précurseur appelé pro-LC3. Lorsque l'autophagie est activée, celui-ci est clivé en C-terminal par la cystéine protéase *atg4*, laissant ainsi la glycine 116 exposée. La forme générée par ce clivage est appelée LC3-I, et va être prise en charge par *atg7* (*E1-like activating enzyme*), qui va l'activer et la transférer sur *atg3* (*E2-like conjugating enzyme*). La glycine 116 sera alors conjuguée à un phospholipide, le phosphatidyléthanolamine (PE), par le complexe *atg12-atg5-atg16L* précédemment décrit. La forme générée est appelée LC3-II et sera associée aux membranes internes et externes de l'autophagosome par l'intermédiaire du groupement PE (**Figure 21 et 22**). Contrairement aux autres protéines *atg* qui se dissocient de l'autophagosome après sa fermeture, les protéines LC3-II présentes à la membrane interne de l'autophagosome seront dégradées après la fusion de ce dernier avec le lysosome. Les protéines LC3-II liées à la membrane externe seront en revanche clivées au niveau du groupement PE par *atg4*, afin qu'elles soient recyclées.

De ce fait, LC3 constitue un des marqueurs les plus utilisés pour suivre le processus et le niveau d'autophagie grâce à ses trois formes (Mizushima et al. 2010).

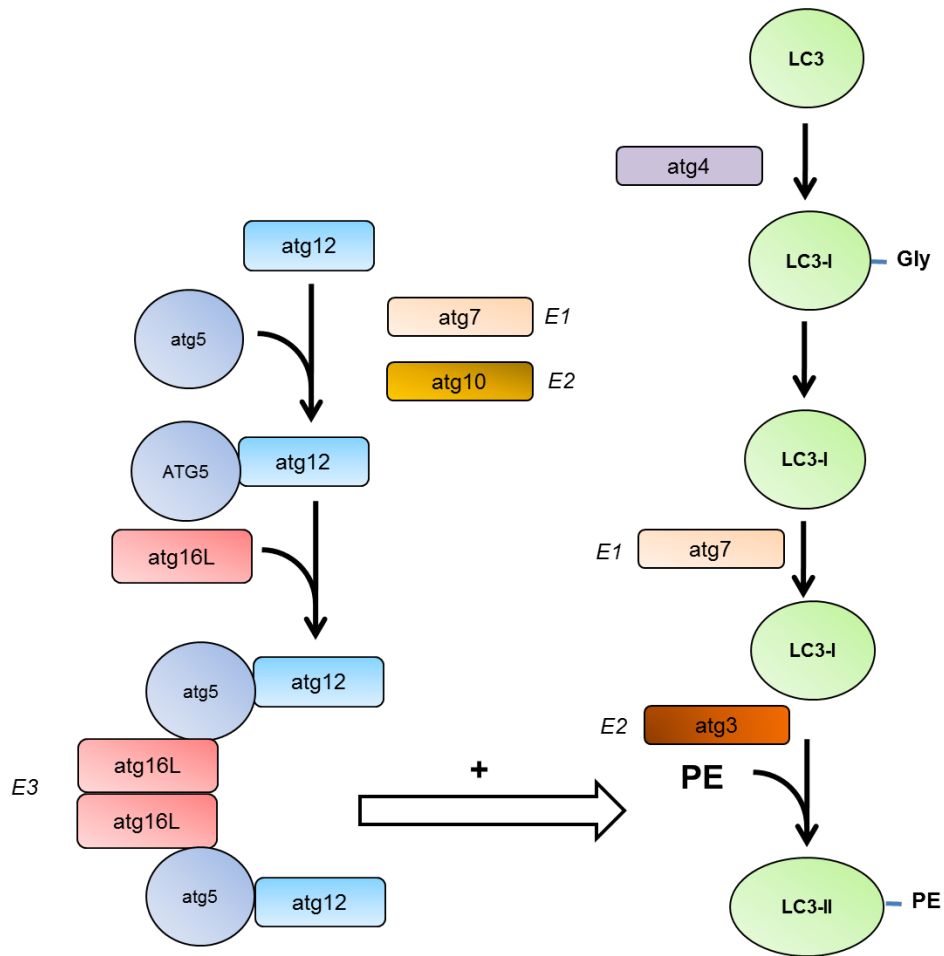


Figure 21 : Systèmes UBL impliqués dans l'élongation de l'autophagosome. *Atg12* est apparentée à l'ubiquitine et est conjuguée à *atg5* de façon dépendante d'*atg7*, l'enzyme d'activation *E1-like*, et de l'enzyme de conjugaison *E2-like atg10*. Le complexe *atg12-atg5* s'associe à *atg16L* qui s'oligomérisent formant un complexe multimérique. La protéine Pro-LC3 est clivée en C-terminal par la protéase *atg4*. La forme LC3-I est ensuite conjuguée à du phosphoéthanolamine (PE) de façon dépendante d'*atg7*, l'enzyme d'activation, et d'*atg3*, l'enzyme de conjugaison *E2-like*. Finalement, le complexe *atg12-atg5-atg16L* joue un rôle d'enzyme de transfert *E3-like* et permet la lipidation de la protéine LC3-I. Ces deux systèmes sont impliqués dans l'élongation de la membrane de l'autophagosome.

3.3.3 La protéine *atg9*

Atg9 intervient également dans l'étape d'élongation de l'autophagosome, de la même manière que dans l'étape de la nucléation, comme cela est mentionné dans la partie 3.2.3.

Un modèle résumant la formation et l'élongation de l'autophagosome est proposé dans la figure suivante (**Figure 22**).

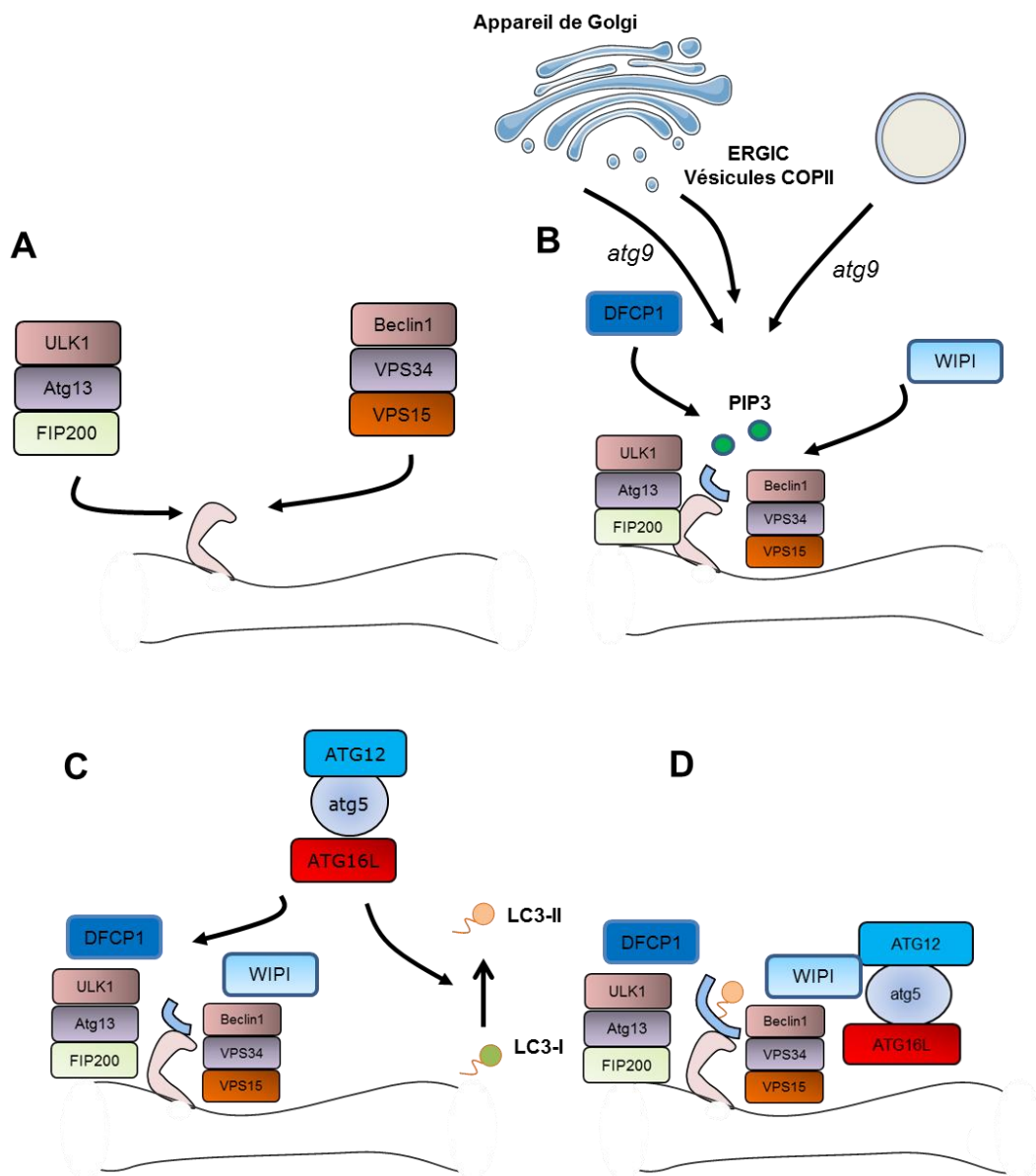


Figure 22 : Modèle proposé de formation et d'élongation de la membrane de l'autophagosome. (A) Les complexes ULK1/2-*atg13*-FIP200 et Beclin1-VPS34-VPS15 sont d'abord recrutés au site de nucléation du phagophore où ils initient sa formation. **(B)** Le PI3P produit par VPS34 permet le recrutement des effecteurs DFCP1 et WIPI qui participent également à la nucléation. *Atg9* permet l'apport de lipides de l'appareil de golgi, et potentiellement des endosomes, vers le phagophore. Les lipides pourraient également provenir de l'ERGIC par l'intermédiaire de vésicules COPII. **(C)** *atg12-atg5-atg16L* est ensuite recruté au niveau de l'autophagosome en cours d'élongation et permet la conversion du LC3-I en LC3-II. **(D)** *atg12-atg5-atg16L* et LC3-II sont nécessaires à l'élongation de l'autophagosome. *Atg9* fournit également des lipides provenant de l'appareil de golgi et potentiellement des endosomes durant cette étape. Adapté de Lamb et al. 2013 ; Carlsson et al. 2015.

3.4 Fusion de l'autophagosome avec les lysosomes : l'étape de maturation

L'étape de maturation de l'autophagie correspond à la fusion directe des autophagosomes avec les lysosomes formant des autolysosomes, ou à la fusion indirecte des autophagosomes avec les lysosomes. Dans le cas d'une fusion indirecte, les autophagosomes fusionnent d'abord avec le système endosomal, formant des structures appelées amphisomes, qui fusionneront par la suite avec les lysosomes (Parzych & Klionsky 2014).

Compte-tenu de la localisation des endosomes tardifs/lysosomes, l'étape de maturation des autophagosomes est précédée d'un transport de ces derniers dans la région péri-nucléaire, *via* le réseau de microtubules. L'actine pourrait également intervenir dans le transport des autophagosomes (Ganley 2013).

Cette dernière étape de maturation de l'autophagosome est indispensable pour avoir un flux autophagique complet, permettant la dégradation et le recyclage des composants séquestrés. Ce processus de fusion est régulé par un grand nombre de protéines. Nous allons brièvement détailler certains acteurs majeurs intervenant dans ce mécanisme.

Les GTPases de la famille Rab font partie d'une super famille de GTPase comptant plus de 60 membres, et sont capables d'hydrolyser le GTP en GDP. Les protéines Rab jouent un rôle majeur dans le trafic vésiculaire puisqu'elles sont impliquées dans le rapprochement et la fusion des membranes des vésicules. La protéine Rab7 joue un rôle important dans la fusion des autophagosomes avec les endosomes tardifs/lysosomes. En effet, l'inactivation de Rab7 dans la lignée cellulaire HeLa conduit à une accumulation de vésicules d'autophagie (Jäger et al. 2004). De plus, Rab11 intervient dans la fusion de l'autophagosome avec les corps multivésiculaires, une large structure contenant les endosomes tardifs. En effet, un dominant négatif de Rab11 abolit la fusion entre les autophagosomes et ces corps multivésiculaires (Fader et al. 2008). Finalement, le rôle de Rab24 a également été suggéré dans la fusion des autophagosomes avec les lysosomes (Egami et al. 2005).

Comme nous l'avons vu précédemment, UVRAG est impliqué dans l'étape de maturation des autophagosomes. UVRAG est en effet recruté au niveau des endosomes, où il peut alors stimuler l'activité GTPase de Rab7, ce qui favorise la fusion des autophagosomes avec les endosomes tardifs et les lysosomes. L'implication d'UVRAG dans l'étape de maturation de l'autophagosome pourrait dépendre ou non de sa liaison au complexe Beclin1-VPS34-VPS15. Cependant, le mécanisme d'action d'UVRAG reste sujet à controverse (Parzych & Klionsky 2014; Backer 2016; Liang et al. 2008).

La protéine RUBICON (*Run domain Beclin-1-interacting and cysteine-rich domain-containing protein*) peut également se lier à UVRAG, et interagir avec la protéine Rab7, régulant négativement la maturation endosomale et autophagique (He & Levine 2010; Funderburk et al. 2010). De plus, la liaison de RUBICON au complexe Beclin1-VPS34-VPS15 diminue l'activité lipide kinase de VPS34 ce qui inhiberait également la maturation des autophagosomes (Backer 2016).

Les protéines SNAREs Soluble (*N-éthylmaleimide-sensitive-factor Attachment protein REceptor*) sont des protéines transmembranaires pouvant interagir les unes avec les autres, formant un complexe impliqué dans la fusion des membranes. La fusion entre deux membranes nécessite l'intervention de protéines t-SNARE (*target*) et v-SNARE (*vesicle*).

La protéine v-SNARE VAMP3 (*Vesicle Associated Membrane Protein 3*) est présente au niveau des corps multivésiculaires. VAMP3 serait ainsi impliquée dans la fusion de l'autophagosome avec ces corps multivésiculaires. En revanche, VAMP7 (*Vesicle Associated Membrane Protein 7*) serait quant à elle nécessaire à la formation des autolysosomes (Fader et al. 2009).

Plus récemment, la synthaxine-17 a été identifiée à la membrane de l'autophagosome mature. Cette SNARE interagit avec VAMP8 (*Vesicle Associated Membrane Protein 8*) présente au niveau des lysosomes. Ce mécanisme permet ainsi la fusion de ces deux types de vésicules. Ce processus requière également la protéine SNAP29 (*Synaptosomal-associated protein 29*), qui se lie à la synthaxine-17 et favorise ainsi la fusion des membranes de l'autophagosome et du lysosome. (Itakura & Mizushima 2013).

Les protéines lysosomales Lamp1 et Lamp2 (*Lysosome-associated membrane glycoprotein*) sont des glycoprotéines transmembranaires qui représentent des constituants majeurs de la membrane des lysosomes.

Ces glycoprotéines sont nécessaires à la fusion des autophagosomes avec les endosomes/lysosomes. En effet, l'extinction de Lamp1 ou Lamp2 chez la souris conduit à une accumulation de vacuoles d'autophagie due à un défaut de fusion avec les lysosomes, dans un grand nombre de tissus (Tanaka et al. 2000; Eskelinen 2006).

La machinerie ESCRT (*Endosomal Sorting Complex Required for Transport*) est formée par les complexes ESCRT 0, I, II, et III. Le complexe ESCRT est notamment responsable de la formation des corps multivésiculaires. Ainsi, Lee et al ont démontré que l'extinction de la protéine mSnf7-2, un composant majoritaire du complexe ESCRT III, conduit à une accumulation d'autophagosomes dans les neurones, ce qui illustre le rôle du complexe ESCRT III dans la maturation autophagosomale (Lee et al. 2007).

Une fois la fusion réalisée, le contenu des autophagosomes sera dégradé. Ce processus requiert l'intervention des hydrolases acides des lysosomes telles que les lipases, qui vont générer des acides gras à partir de lipides, les protéases, qui vont produire des peptides à partir de protéines, ou les nucléases, qui vont générer des nucléosides à partir d'acide nucléiques. Ces produits de dégradation pourront ainsi être réutilisés par la cellule.

Dans ce contexte, l'acidification des lysosomes représente également une étape cruciale pour le maintien d'un processus d'autophagie complet. L'inhibition de l'acidification avec différents agents tels que la bafilomycin A1 ou la chloroquine empêche l'activité des enzymes lysosomales. Le traitement des cellules avec ces différents agents est couramment utilisé afin de bloquer le flux autophagique et étudier ainsi l'implication de l'étape de maturation de l'autophagosome.

4. La régulation de l'autophagie

L'autophagie est une réponse de la cellule à différents stress intra et extracellulaires tels que la privation en nutriments, la privation en facteurs de croissance, l'hypoxie ou le stress du réticulum endoplasmique.

Un grand nombre d'acteurs régulent l'induction de l'autophagie. Parmi ces acteurs, le complexe mTORC1 joue un rôle central. Cependant, diverses voies de signalisation indépendantes de ce dernier complexe ont également été mises en évidence.

4.1 L'autophagie dépendante du complexe mTORC1

TOR (ou mTOR chez les mammifères) est une protéine sérine-thréonine kinase jouant un rôle majeur dans la signalisation de la cellule. En effet, on lui attribue diverses fonctions notamment dans la traduction protéique, dans la survie et la prolifération cellulaire, dans la mobilité des cellules, mais également dans l'autophagie. Les études chez la levure ont permis de démontrer que la protéine TOR est présente sous forme de deux complexes majeurs, conservés chez les mammifères : TORC1 (mTORC1) et TORC2 (mTORC2) (Costa-Mattioli & Monteggia 2013; Sarkar 2013).

mTORC1 se compose de la sous-unité catalytique Raptor, (*regulated associated protein of mTOR*) impliquée dans la reconnaissance des substrats, de PRAS40 (*proline-rich akt substrate of 40 kDA*), de mLST8 (*mammalian level with sec13 protein 8*) et de Deptor (*DEP-domain containing mTOR-interacting protein*). Ce complexe est sensible à la rapamycine.

mTORC2 se compose de Rictor (*rapamycin insensitive companion of mTOR*), de mSIN1 (*mammalian stress-activated mitogen-activated protein kinase interacting protein 1*), et de mLS8 et de deptor.

Le rôle du complexe mTORC1 dans l'autophagie est largement documenté. Son activité est notamment régulée par la présence de facteurs de croissance et de nutriments (Jewell & Guan 2013).

Ainsi, lorsque le complexe mTORC1 est actif, il inhibe le complexe initiateur de l'autophagie ULK1/2-*atg13*-FIP200, par interaction directe avec ce dernier, et par phosphorylation des protéines ULK1/2 et *atg13*. Ces phosphorylations inhibent l'activité kinase des protéines ULK (Sarkar 2013), ce qui empêche l'induction de l'autophagie. De plus, le complexe mTORC1 activé régule également négativement le complexe I d'initiation de l'autophagie (Beclin1-VPS34-VPS15-*atg14L*), par phosphorylation d'*atg14L* sur les résidus sérines 3, 223, 233, 383 et 440 (Backer 2016).

4.1.1 Régulation du complexe mTORC1 par les facteurs de croissance

La liaison des facteurs de croissance à leurs récepteurs membranaires à activité tyrosine kinase active les PI3 kinases de classe I. Ces dernières produisent alors du PIP3 (*Phosphatidyl inositol (3, 4, 5)-triphosphate*) à partir de PIP2 (*Phosphatidyl inositol (4, 5)-biphosphate*). Le PIP3 permet l'activation de la protéine Akt (*protein kinase B*).

Akt inhibe par phosphorylation des complexes protéiques de type GAP (*GTPase-activating protein*), appelés TSC 1/2 (*tuberous sclerosis complexe*). Ces complexes TSC 1/2 agissent sur une protéine G nommé Rheb (*RAS homolog enriched in brain*).

Rheb est présente sous deux formes au sein de la cellule : une forme désactivée, liée au GDP, et une forme activée, liée au GTP. Rheb-GTP est capable d'activer mTORC1 en se liant au domaine kinase de la protéine mTOR.

Ainsi, lorsque les complexes TSC 1/2 sont inhibés par Akt (lors de la présence de facteurs de croissance), ils ne peuvent plus exercer leur activité GTPasique sur la protéine Rheb. Rheb est donc maintenue dans un état lié au GTP actif, et active par conséquent mTORC1. Ce mécanisme conduit donc à l'inhibition de l'autophagie (**Figure 23**).

A l'inverse, en absence de facteurs de croissance, la protéine Akt est inactive. Les complexes TSC1/2 sont donc actifs et stimulent l'activité GTPasique de Rheb. Rheb est donc liée au GDP, inactive, et ne peut donc plus activer mTORC1. Ce processus induit donc l'autophagie (Sarkar 2013; Inoki et al. 2002).

Finalement, Akt activée peut également phosphoryler le facteur de transcription FOXO3, entraînant sa rétention au niveau cytosolique. Ce mécanisme empêche ainsi la transcription des différents effecteurs de l'autophagie (Brunet et al. 1999; Zhao et al. 2007; Mammucari et al. 2007).

4.1.2 Régulation du complexe mTORC1 par les nutriments

La présence d'acides aminés dans le milieu extracellulaire régule également l'activité du complexe mTORC1.

Lorsque le milieu est riche en acides aminés, ces derniers sont importés au sein de la cellule et s'accumulent notamment dans les lysosomes. Cette accumulation active un complexe multiprotéique présent à la surface lysosomale, qui se compose des GTPases RAG A/B, RAG C/D (*Ras-related GTP-binding protein*), de Ragulator, et de l'ATPase vacuolaire V-ATPase. Ce complexe est communément appelé RAG-Ragulator.

Dans le cas où ce complexe est actif (en présence d'acides aminés), il interagit avec mTORC1 au niveau de sa sous-unité Raptor. RAG-Ragulator permet ainsi la séquestration du complexe mTORC1 à la surface du lysosome, où il est maintenu dans un état actif par la protéine Rheb lié au GTP. Ce processus inhibe donc l'autophagie.

A l'inverse, lors de l'absence d'acides aminés, mTORC1 n'est plus séquestré à la surface du lysosome. Il est alors retrouvé au niveau cytosolique, où il est dans un état inactif. Dans ce cas, l'autophagie est induite (Sarkar 2013).

De plus, la carence en nutriments modifie également le statut énergétique de la cellule et tend à augmenter le ratio AMP/ATP cytosolique.

L'AMP kinase (*Adénosine monophosphate kinase*) est une protéine sensible au statut énergétique cellulaire. C'est une protéine hétérotrimérique composé des sous-unités α , β , et γ .

Lors de l'augmentation du ratio AMP/ATP ou ADP/ATP, la sous-unité γ de l'AMPK se lie à l'AMP ou l'ADP, ce qui permet son activation. D'autre part, lors d'une carence nutritionnelle, l'AMPK peut également être activé par LKB1 (*liver kinase B1*), une protéine kinase sensible au stress métabolique de la cellule.

Cette activation se fait par phosphorylation sur le résidu thréonine 172 de l'AMPK (Shaw et al. 2004; Hardie 2007). L'AMPK active alors les complexes TSC 1/2 par phosphorylation. Ces complexes inactivent la protéine Rheb, qui ne peut plus activer mTORC1 (Sarkar 2013). Ce processus induit donc l'autophagie.

De plus, différentes études ont mis en évidence un rôle direct de l'AMPK dans la phosphorylation de la sous-unité Raptor, ce qui inactive mTORC1 (Gwinn et al. 2008).

Finalement l'AMPK peut activer directement l'autophagie par phosphorylation des protéines d'initiation ULK1, et par phosphorylation du complexe I d'initiation de l'autophagie, au niveau des résidus sérine 91 et 94 de la protéine Beclin1 (Sarkar 2013; Kim et al. 2011).

Dans ce contexte, la rapamycine est souvent utilisée afin d'induire le processus d'autophagie. La rapamycine forme un complexe avec l'immunophiline FKBP12 (*FK506-binding protein of 12kDA*) inhibant l'activité du complexe mTORC1, selon un mécanisme qui n'est pas encore totalement connu (Weichhart et al. 2015; Shimobayashi & Hall 2014).

Pour conclure, bien que nous ayons uniquement traité ici l'autophagie induite par la carence en facteurs de croissance, ou par la carence nutritionnelle, d'autres stress peuvent activer l'autophagie *via* l'inhibition du complexe mTORC1. Pour exemple, l'activation du système UPR (*unfolded protein response*) lors d'un stress du réticulum endoplasmique, inhibe le complexe mTORC1 *via* l'activation de la protéine Akt. L'hypoxie peut également stimuler l'autophagie par activation de l'AMPK (Papandreou et al. 2008).

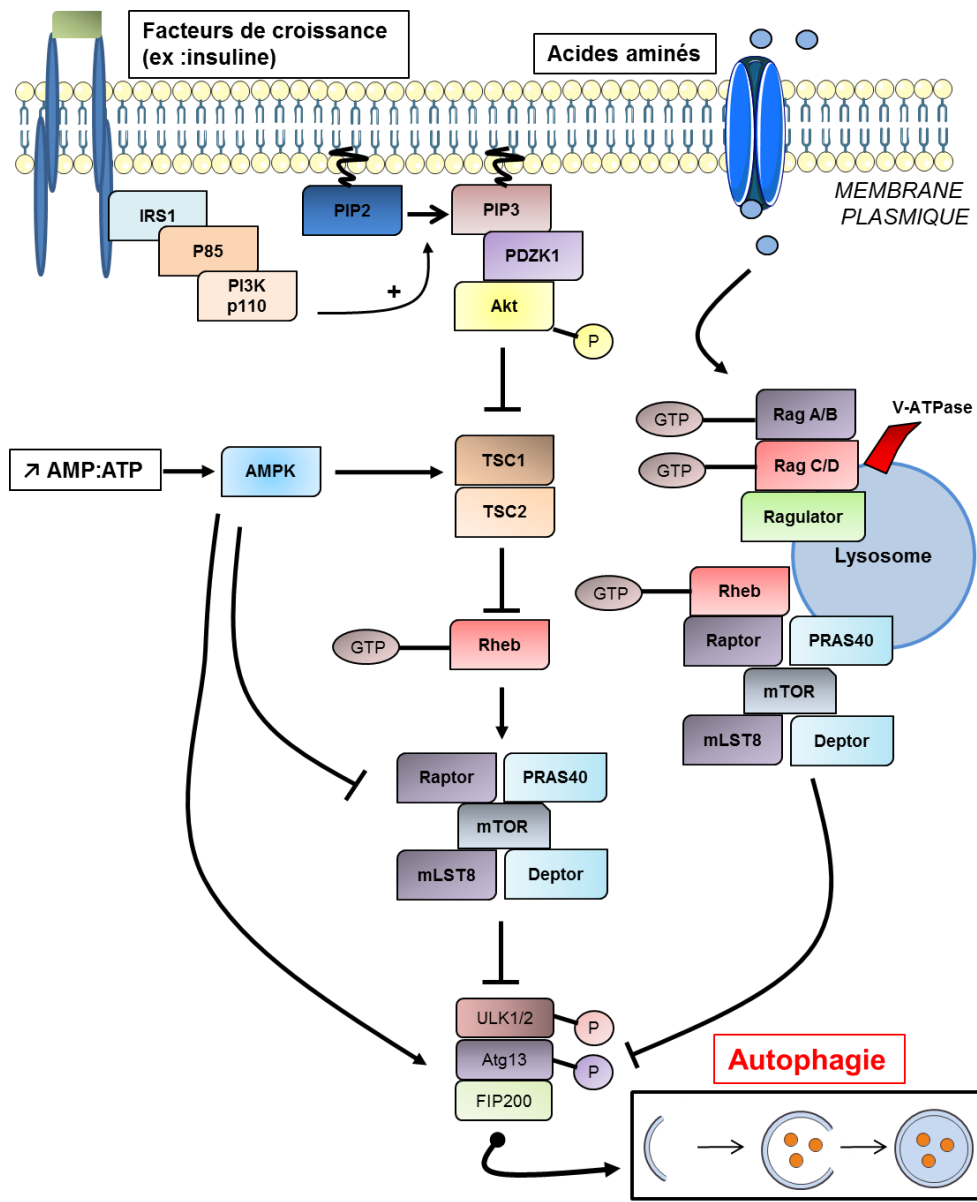


Figure 23 : Les signaux de régulation de l'autophagie dépendants du complexe mTORC1. Divers signaux telle que la privation en nutriments ou en facteurs de croissance régulent négativement mTORC1 et active l'autophagie. Les facteurs de croissance, notamment l'insuline, activent la voie PI3K/Akt. Cette dernière inhibe le complexe TSC1/2, ce qui maintient Rheb liée au GTP dans un état actif. Rheb-GTP active le complexe mTORC1 ce qui inhibe le complexe d'initiation de l'autophagie ULK1/2-atg13-FIP200 (ainsi que le complexe I, non représenté ici). L'absence de facteurs de croissance empêche l'activation de cette voie, ce qui maintient mTORC1 inactif et active l'autophagie. L'influx d'acides aminés active le complexe Rag-Ragulator qui maintient le complexe mTORC1 localisé au niveau des lysosomes dans un état actif, *via* Rheb-GTP. La privation en acides aminés conduit donc à l'inactivation et au relargage du complexe mTORC1 dans le cytoplasme, ce qui active l'autophagie. L'augmentation du ratio AMP/ATP stimule l'activité de l'AMP kinase, qui active TSC1/2. Rheb est ainsi maintenu dans un état inactif par TSC1/2. Le complexe mTORC1 n'est plus actif et l'autophagie est induite. L'AMPK peut également activer le complexe ULK et le complexe I, ou inactiver mTORC1, de façon directe, par phosphorylation. D'après Sarkar 2013.

4.2 L'induction de l'autophagie indépendante de mTORC1

Plusieurs mécanismes interviennent dans la modulation de l'autophagie indépendamment du complexe mTORC1. Parmi ces mécanismes, comme nous l'avons vu précédemment (partie 3.2.2), l'interaction de la protéine Beclin1 avec les protéines anti-apoptotiques Bcl-2, inhibe le processus d'autophagie. En effet, la liaison de Beclin1 au niveau de son domaine BH3, avec Bcl-2, prévient son association avec le complexe d'initiation de l'autophagie VPS34-VPS15. Divers mécanismes peuvent moduler la liaison entre Beclin1 et Bcl-2.

Tout d'abord, outre son rôle dans l'autophagie dépendante du complexe mTORC1, la privation en nutriments active également la kinase JNK1 (*c-Jun N-terminal kinase*). JNK1 activée phosphoryle la protéine Bcl-2 au niveau de ses domaines BH3 et BH4 sur de multiples sites (Thréonine 69, Sérine 70 et sérine 87). Cette phosphorylation conduit à la dissociation de Beclin1 et de Bcl-2. Beclin1 pourra alors s'associer au complexe VPS34-VPS15, ce qui permettra d'induire la formation de l'autophagosome (Wei et al. 2008; Pattingre et al. 2005).

L'hypoxie peut également induire l'autophagie en modulant la liaison entre Beclin1 et Bcl-2. En effet, le facteur de transcription HIF-1 α (*Hypoxia inducible factor- 1 α*), activé lors de la privation en oxygène, stimule la transcription des protéines pro-apoptotiques NIX (ou BNIP3L)/BNIP3 (*BCL2 Interacting Protein 3 Like*) (Bellot et al. 2009). Ces dernières interagissent avec Bcl-2, ce qui empêche son association avec Beclin1 (Eng & Abraham 2011) (**Figure 24**).

La voie de signalisation des inositols peut également réguler l'autophagie de manière indépendante de mTORC1. La voie des inositols est stimulée par l'activation de la phospholipase C (PLC), en aval des récepteurs couplés aux protéines G (RCPG). La PLC hydrolyse le PIP2 en IP3 (Ins (1, 4, 5) P₃), et en DAG (diacylglycerol). L'IP3 est dégradé pour former de l'InsP (IP), qui est à son tour hydrolysé pour former de l'inositol. Des niveaux élevés d'IP3, ou d'inositol, inhibent la formation de l'autophagosome. En effet, l'utilisation d'un inhibiteur de la déphosphorylation de l'InsP déplete la cellule en inositols, stimulant ainsi l'autophagie (Sarkar et al. 2005). De manière similaire, l'autophagie est induite par une surexpression de l'inositol-1,4,5-trisphosphate kinase A, qui diminue les

niveaux d'IP₃, en le phosphorylant pour former de l'Ins(1,3,4,5)P₄ (IP₄) (Williams et al. 2008).

L'augmentation de la concentration calcique intracellulaire régule négativement l'étape de nucléation de l'autophagosome, par l'activation des cystéines protéases calpaïnes. Ces dernières, impliquées dans le clivage de certains facteurs *atg* tels qu'*atg5* empêchent la formation de l'autophagosome. L'augmentation calcique inhibe également l'étape de maturation de l'autophagie.

Enfin, l'augmentation des niveaux d'AMPc (*Adénosine mono phosphate cyclique*) inhibe également la nucléation de façon directe, ou indirecte, en activant la protéine ePAC (*Exchange protein directly activated by cAMP*). Cette dernière stimule la protéine GTPase Rab2b, qui active alors la PLC ϵ (*Phospholipase C ϵ*). Celle-ci produit ainsi de l'IP₃, un inhibiteur de l'autophagie mTOR indépendant, comme est mentionné dessus (Sarkar 2013) **(Figure 24)**.

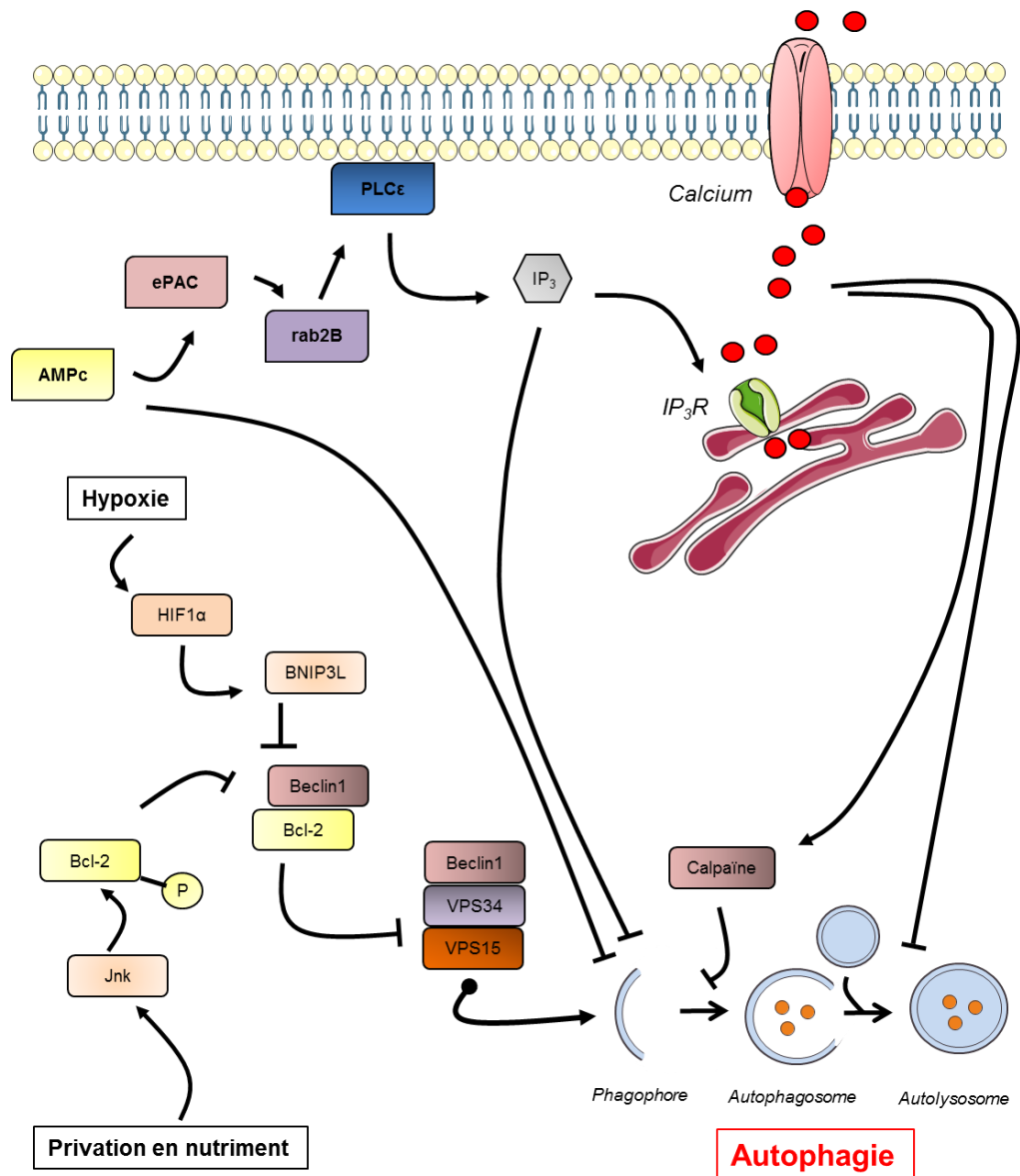


Figure 24 : Les signaux de régulation de l'autophagie indépendants du complexe mTORC1. Lorsque Beclin1 et Bcl-2 sont liées, Beclin-1 ne peut plus interagir avec VPS34 et VPS15, ce qui inhibe l'induction de l'autophagie. La privation en nutriments active la kinase JNK1 qui phosphoryle Bcl-2. Cette dernière ne peut plus s'associer à Beclin1 qui se lie alors à VPS34-VPS15. Ce mécanisme induit ainsi l'autophagie.

L'hypoxie induit, *via* HIF1- α , la transcription des protéines pro-apoptotiques NIX/BNIP3. Ces dernières se lient à Bcl-2, empêchant son association avec Beclin1. Beclin1 peut alors interagir avec VPS34-VPS15 ce qui active l'autophagie. L'augmentation de calcium inhibe l'induction de l'autophagie *via* les calpaïnes et inhibe également la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. L'augmentation d'IP₃ inhibe également la formation de l'autophagosome de façon directe, ou indirecte en stimulant l'efflux calcique du RE. L'augmentation d'AMPc inhibe la formation de l'autophagosome de façon directe, ou indirecte en stimulant la production d'IP₃ *via* la voie ePAC, Rab2B, PLC ϵ .

En conclusion, les principaux acteurs moléculaires impliqués dans le processus d'autophagie sont résumés dans la figure suivante (Figure 25).

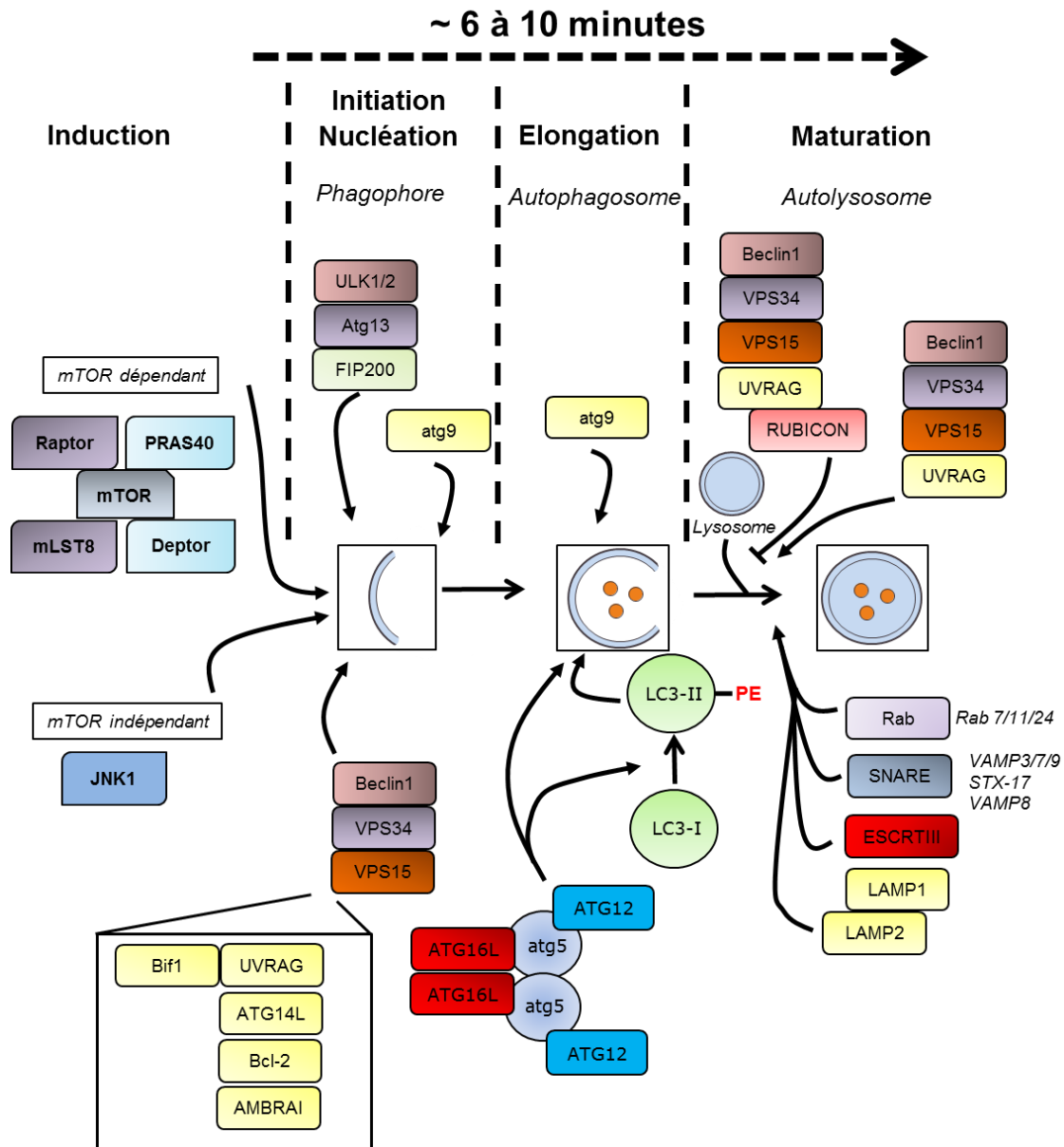


Figure 25 : Schéma bilan du mécanisme d'autophagie. L'induction du processus d'autophagie peut être dépendante ou indépendante du complexe mTORC1. La nucléation du phagophore met en jeu les complexes ULK1/2-*atg13*-FIP200 et Beclin1-VPS34-VPS15, ainsi que la protéine *atg9*. Le complexe Beclin1-VPS34-VPS15 est régulé par son interaction avec d'autres partenaires telles qu'UVRAG, *atg14L*, AMBRA1 ou Bcl-2. UVRAG peut lui-même interagir avec Bif1, régulant alors l'incurvation membranaire. L'élongation de l'autophagosome est dépendante du complexe *atg12-atg5-atg16L*, des protéines LC3-II et d'*atg9*. La fusion de l'autophagosome avec le lysosome est dépendante de certaines protéines SNAREs, des protéines lysosomales Lamp1 et Lamp2, et de certaines protéines Rab (7/11/24). UVRAG est également impliquée dans l'étape de fusion. Lorsque UVRAG est lié à RUBICON, l'étape de maturation est en revanche inhibée.

5. Les différents sous-types d'autophagie

5.1 Généralités

L'autophagie a longtemps été considérée comme un mécanisme de dégradation non sélectif permettant l'adaptation de la cellule à des conditions de stress métaboliques. Il est à présent admis qu'elle peut être sélective de certains composants et organites cellulaires. L'autophagie est fortement impliquée dans l'homéostasie des cellules en exerçant sa fonction de contrôle qualité, par le recyclage ou l'élimination des organites défectueux, des agrégats protéiques, ou des pathogènes intracellulaires (Stolz et al. 2014).

Durant l'autophagie sélective, les composants destinés à la dégradation sont ubiquitinylés. Ce mécanisme permet leur reconnaissance par des récepteurs spécifiques qui pourront interagir avec la protéine LC3 présente sur l'autophagosome (Kimura et al. 2016).

Chez la levure, plusieurs récepteurs impliqués dans divers sous-types d'autophagie ont été identifiés. Ainsi, *atg19* et *atg34* seraient impliqués dans la voie appelée Cvt (*cytoplasme to vacuole targeting*). Ce sous-type d'autophagie permet à certaines hydrolases d'être délivrées au niveau vacuolaire. De plus, *atg32* serait impliqué dans l'autophagie des mitochondries (mitophagie). Enfin, *atg30* et *atg36* seraient quant à eux impliqués dans l'autophagie des péroxysomes (péxophagie) (Stolz et al. 2014).

Le premier récepteur sélectif de l'autophagie identifié chez les mammifères est la protéine p62 ou sequestosome-1 (SQTM1). Découvert par Pankiv et al en 2007, il possède une séquence dite UBD (*ubiquitine-binding domain*) en C-terminal qui permet sa liaison à l'ubiquitine. P62 possède également un domaine d'interaction avec LC3 dit LIR pour « LC3-*interacting region* ». P62 a ainsi été montré comme étant impliqué dans la dégradation d'agrégats protéiques (Pankiv et al. 2007).

Depuis, de nombreux récepteurs qui possèdent des domaines de liaison à l'ubiquitine ainsi qu'à LC3, tels que l'optineurin (OPTN), ou NRB1 (*protein phosphatase 1 regulatory subunit 9A*) ont été identifiés comme des modulateurs de divers sous types d'autophagie (Rogov et al. 2014; Zaffagnini & Martens 2016) **(Tableau V)**.

Cependant, d'autres mécanismes indépendants de l'ubiquitylation ont été mis en évidence. Dans ce cas, le récepteur interagit directement avec LC3. Parmi ces récepteurs, on trouve les protéines pro-apoptotiques NIX(BNIP3L)/BNIP3, ou encore FUNDC1 (*FUN14 domain-containing protein 1*).

Récemment, les récepteurs TRIM (*T cell receptor (TCR)-interacting molecule*) ont également été mis en évidence. Au-delà de leur rôle dans la reconnaissance des composants à dégrader, ces derniers exercent également des fonctions dans l'assemblage et la régulation des autophagosomes (Kimura et al. 2016; Kimura et al. 2017) (**Tableau V**).

Type d'autophagie sélective	Substrats de l'autophagie	Récepteurs (<i>ub-dépendants</i>)	Récepteurs (<i>ub-indépendants</i>)
Mitophagie	Mitochondries	P62-OPTN NRB1-NDP52	NIX/BNIP3 FUNDC1
Lipophagie	Gouttelettes lipidiques	?	?
Glycophagie	Protéines glycosylées	?	stbd1
Aggréphagie	Agrégats protéiques	P62-OPTN-NRB1	?
Ribophagie	Ribosomes	?	?
Réticulophagie	Réticulum endoplasmique	?	FAM134B
Granulophagie	Granules de stress	?	?
Xénophagie	Microbes/virus	P62-OPTN-NRB1-NDP52	Galentin-8
Zymophagie	Particules zymogènes	P62	?
Péxophagie	Peroxisome	NRB1	NRB1

Tableau V : Principaux sous-types d'autophagie sélective et récepteurs associés chez les mammifères. *NRB1: Neighbor of BRCA1 gene 1, NDP52: Nuclear Domain 10 Protein 52, OPTN: Optineurin, FAM134B: Family with Sequence Similarity 134 member B, Stbd1: Starch-binding domain-containing protein 1, FUNDC1: FUN14 Domain-Containing protein 1, BNIP3/NIX: BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein.* Adapté de Khaminet et al.2016

5.2 La mitophagie : un exemple d'autophagie sélective

La mitophagie est un sous-type d'autophagie sélective, qui a pour rôle principale l'élimination des mitochondries défectueuses. La mitophagie intervient également dans la dégradation des mitochondries lors de la maturation des réticulocytes, et pourrait être impliquée dans l'élimination des mitochondries présentant des mutations de l'ADN mitochondrial (Ashrafi & Schwarz 2013; Suen et al. 2010). La mitophagie est principalement activée lorsque les dommages de la mitochondrie sont importants, et qu'ils s'accompagnent d'une altération du potentiel membranaire mitochondrial (Ashrafi & Schwarz 2013).

A l'heure actuelle, la voie dépendante du couple de protéines Pink1/Parkin est considérée comme la voie principale et la mieux étudiée de la mitophagie dans les cellules immortalisées. D'autres voies ont été également identifiées lors de l'élimination sélective des mitochondries, telles que la voie NIX/BNIP3, impliquée dans la mitophagie nécessaire à la maturation des réticulocytes en érythrocytes (plus communément appelé globules rouges). Enfin, la mitophagie induite par l'hypoxie fait intervenir la protéine FUNDC1.

- le système PINK1/Parkin

Dans une mitochondrie saine, la sérine-thréonine kinase PINK1 (*PTEN-induced putative kinase protein1*) est importée par le système d'import TIM/TOM (*Translocase of the inner membrane/outer membrane*), où elle subit des clivages consécutifs par les protéases MPP (*Mitochondrial processing protease*), et PARL (*presenilin-associated rhomboid-like protease*). PINK1 clivée sera ensuite dégradée par le protéasome, expliquant la faible quantité de PINK1 dans les conditions normales. La dépolarisation mitochondriale stabilise PINK1 à la membrane externe de la mitochondrie, *via* son interaction avec la protéine TOM. PINK1 recrute alors la protéine cytosolique Parkin, une ubiquitine E3 ligase, la phosphoryle, et promeut son activité E3 ubiquitine ligase (Kubli & Gustafsson 2012; Khaminets et al. 2016).

Une fois activée, Parkin catalyse l'ubiquitinylation de nombreuses protéines présentes à la membrane externe mitochondriale dont Mfn1/Mfn2, impliquées dans la fusion des mitochondries, et MIRO1/MIRO2, impliquées dans la mobilité des mitochondries le long du réseau de microtubules. Mfn1/Mfn2 et MIRO1/MIRO2 sont ensuite dégradées par le protéasome afin d'éviter la fusion et la mobilité des mitochondries défectueuses. Ceci favorise la fission des mitochondries défectueuses, leur séparation du réseau mitochondrial fonctionnel et par la suite leur dégradation par l'autophagosome.

Suite à son recrutement et à son activation à la mitochondrie, il est suggéré que Parkin ubiquitinye également de manière non spécifique un large panel de protéines de la membrane externe mitochondriale, dont VDAC1 (*Voltage dependant anion channel*). Cette ubiquitinylation est une étape cruciale pour l'induction de l'autophagie car elle permet le marquage de l'organelle entier par l'ubiquitine, et constitue un signal pour l'élimination de la mitochondrie par autophagie (Sarraf et al. 2013). La formation de la membrane autophagosomale autour des mitochondries défectueuses est alors médiée par des récepteurs autophagiques. Ces derniers sont capables de lier à la fois les protéines ubiquitinylées *via* leur domaine d'union à l'ubiquitine UBD, et la protéine LC3 présente à la membrane de l'autophagosome *via* leur domaine LIR (Khaminets et al. 2016) (**Figure 26**).

Divers récepteurs jouant un rôle dans la mitophagie dépendante de la voie PINK1/Parkin ont été identifiés (Pickrell & Youle 2015; Yoshii & Mizushima 2015). Parmi ces récepteurs, on peut citer SQSTM1/p62 (Geisler et al. 2010), NBR1 (Kirkin et al. 2009), NDP52 (Lazarou et al. 2015) et l'optineurine (Wong & Holzbaur 2014).

Certaines études suggèrent que l'optineurine à elle seule est suffisante pour activer la mitophagie, alors que p62 et NBR1 ne sont pas indispensables à ce processus (Lazarou et al. 2015; Wong & Holzbaur 2014). De plus, il a été montré que l'Optineurine et NDP52 sont recrutées par PINK1 *via* la génération de phospho-ubiquitine, ce qui n'est pas le cas de p62. Ce mécanisme servirait de signal pour la mitophagie indépendante de Parkin, (Lazarou et al. 2015).

- Le système NIX/BNIP3

BNIP3 est une protéine résidente du réticulum endoplasmique et de la mitochondrie. Elle exerce des fonctions pro-apoptotiques en neutralisant par interaction la protéine anti-apoptotique Bcl-2. L'inactivation de la protéine Bcl-2 conduit à l'homodimérisation des protéines pro-apoptotiques BAX (*Bcl-2-associated X protein*) / BAD (*Bcl-2-associated death promoter*), présentes à la membrane externe de la mitochondrie, ce qui induit la perméabilisation de la membrane mitochondriale, et l'apoptose.

Indépendamment de leurs fonctions dans l'apoptose cellulaire, les protéines NIX (BNIP3L) et BNIP3 jouent également un rôle dans la mitophagie (**Figure 26**).

Bien que la voie impliquée dans l'activation de NIX/BNIP3 soit peu connue, des études suggèrent néanmoins que cette protéine pourrait s'homodimériser à la membrane externe de la mitochondrie. Le domaine LIR d'interaction avec LC3 de NIX/BNIP3 leur permettrait alors de recruter des autophagosomes à la membrane mitochondriale. Ce mécanisme a notamment été mis en évidence dans le processus de maturation des réticulocytes en érythrocytes. En effet, durant cette maturation, les mitochondries des réticulocytes sont dégradées par mitophagie *via* le système NIX. De ce fait, les souris invalidées pour NIX (NIX^{-/-}) présentent des érythrocytes chargés en mitochondries (Ashrafi & Schwarz 2013; Hanna et al. 2012).

- FUNDC1

FUNDC1 est une protéine de la membrane externe mitochondriale fortement impliquée dans la mitophagie induite par l'hypoxie. En effet, FUNDC1 s'accumule au niveau des sites de contacts RE-mitochondrie lors de période d'hypoxie, où elle interagit avec la calnexine (une protéine résidente des sites de contacts). Lors de la mitophagie, FUNDC1 se dissocie de la calnexine et permet le recrutement de la protéine de fission Drp1 aux sites de contact RE-mitochondrie. Les mitochondries sont alors fissionnées.

De plus, FUNDC1 possède un site de liaison à la protéine LC3. Ainsi, en condition de normoxie, FUNDC1 est phosphorylée au niveau de ce domaine d'interaction sur la Tyrosine 18 par la kinase Src (*SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase*), ce qui empêche son interaction avec LC3. Lors de période d'hypoxie, la kinase Src est inactivée, ce qui conduit à la déphosphorylation de FUNDC1. Ce

dernier peut alors interagir avec LC3 et permet la prise en charge de la mitochondrie par l'autophagosome (Liu et al. 2012) (**Figure 26**). Enfin, ULK1 peut également phosphoryler FUNDC1 sur la sérine17 lors de période d'hypoxie. Cette modification favorise également sa liaison à LC3 (Wu et al. 2014).

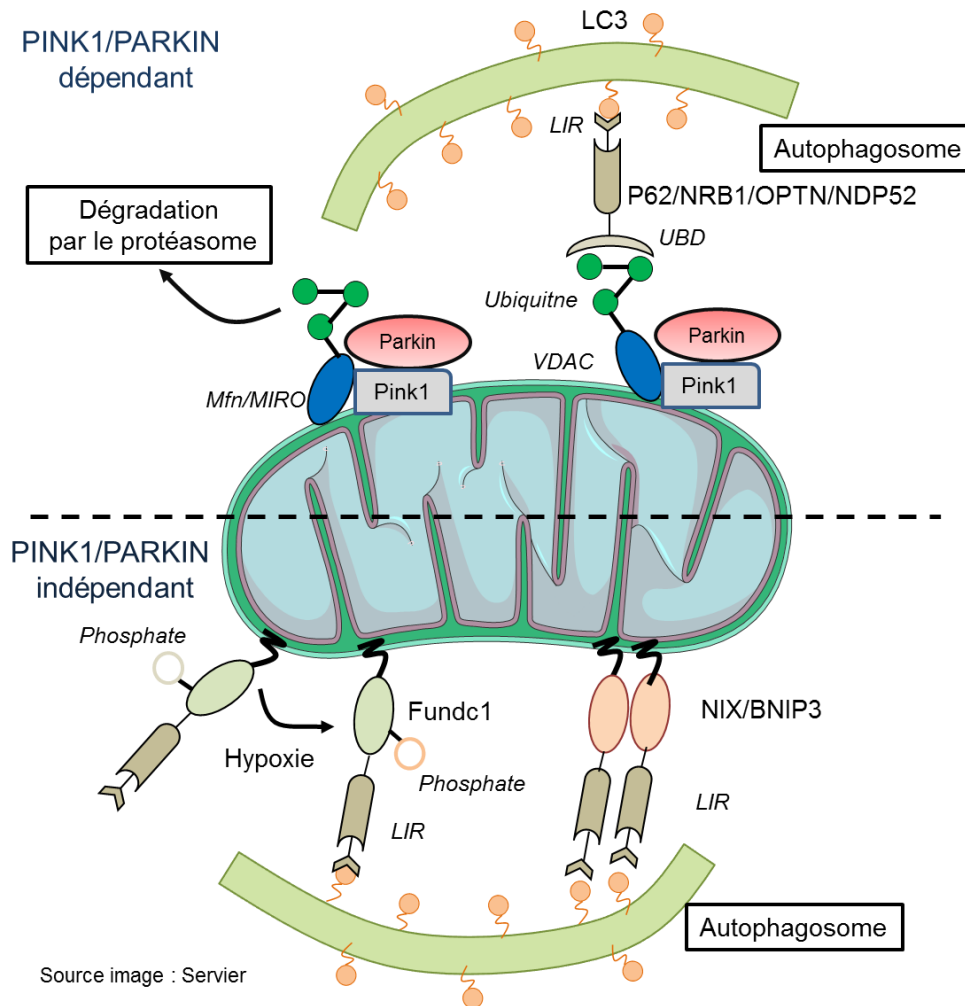


Figure 26 : Principaux mécanismes de la mitophagie. Les protéines de la membrane externe des mitochondries défectueuses sont ubiquitinylées par le système PINK1/Parkin. Ce processus conduit à la dégradation des protéines Mfn et MIRO, ce qui permet la fission et la séquestration des mitochondries défectueuses dans la zone périnucléaire. Certaines protéines ubiquitinylées (VDAC) sont reconnues par des récepteurs possédant un domaine UBD (*Ubiquitin-binding-domain*), qui font le lien avec l'autophagosome *via* leur domaine LIR (*LC3-interacting region*). Certains récepteurs (NIX/BNIP3, FUNDC1) présents sur la membrane externe de la mitochondrie possèdent des domaines LIR permettant une interaction directe avec les autophagosomes indépendamment du mécanisme d'ubiquitinylation et donc de la voie PINK1/Parkin. En situation d'hypoxie, FUNDC1 peut être déphosphorylé par inactivation de la tyrosine kinase SRC, ou phosphorylé par la sérine-thréonine kinase ULK1. Ce mécanisme permet son interaction avec LC3 *via* le domaine LIR. Les protéines NIX/BNIP3 présentes à la membrane externe mitochondriale peuvent s'homodimériser et s'associer *via* leur domaine LIR avec LC3.

6. Autophagie et dynamique mitochondriale

La dynamique mitochondriale est régie par des évènements de fusion et de fission des mitochondries. De manière intéressante, diverses études ont mis en évidence un lien étroit entre la dynamique mitochondriale et l'autophagie/mitophagie.

La fusion des mitochondries est principalement dépendante des Mitofusines (Mfn 1, Mfn2) au niveau des membranes externes mitochondriales, et d'OPA1 (*optic atrophy*), au niveau de la membrane interne mitochondriale.

Les mitofusines sont des protéines présentant un domaine de liaison au GTP en N-terminal, et un domaine d'ancrage à la membrane externe de la mitochondrie en C-terminal. Ainsi l'interaction homo ou hétérotypique des mitofusines permet, de façon dépendante de l'hydrolyse du GTP, la fusion des membranes externes de la mitochondrie (Wai & Langer 2016).

La fusion des membranes internes quant à elle, est due à la protéine OPA1, une GTPase ancrée à la membrane interne de la mitochondrie par l'intermédiaire de son domaine N-terminal (Wai & Langer 2016).

Finalement, la fission des mitochondries est dépendante de la protéine Drp1 (ou DMN1L pour *Dynamamin-1-Like Protein*). Celle-ci est localisée dans le cytoplasme et est recrutée au niveau de la membrane externe de la mitochondrie par l'intermédiaire de différents récepteurs comme FIS1 (*Fission mitochondrial1*), MFF (*Mitochondrial Fission Factor*), MID49/51 (*Mitochondrial Dynamics protein of 49kDa*). Une fois recrutée, l'hydrolyse du GTP lié à Drp1 induit son changement de conformation, ce qui permet la fission des membranes mitochondriales (Wai & Langer 2016; Ashrafi & Schwarz 2013).

Dans ce contexte, la fission des mitochondries est un prérequis nécessaire au processus de mitophagie. Cette fission permet la génération de mitochondries ayant une taille leur permettant d'être capturées au sein de l'autophagosome. Ainsi, lors d'une altération du potentiel membranaire mitochondriale, un signal classiquement décrit comme induisant la mitophagie, les mitochondries fissionnent *via* l'élimination des protéines de fusion (Mfn) *et via* l'action de Drp1. De plus, la protéine GTPase MIRO (*mitochondrial Rho GTPase*), impliquée dans le transport

des mitochondries le long du réseau de microtubules, est aussi dégradée. Ces deux processus concourent ainsi à isoler les mitochondries défectueuses qui seront alors dégradées par mitophagie.

A l'inverse, lors de la carence en nutriments, les mitochondries tendent plutôt à former un réseau hyperfusionné. En effet, lors de ce type de stress, la protéine Drp1 est déphosphorylée sur la Ser⁶¹⁶, et est phosphorylée sur la Ser⁶³⁷ par la kinase PKA (*protéine kinase A*). Drp1 est alors retenue au cytoplasme pour empêcher la fission mitochondriale. Ce processus favoriserait alors l'élongation des mitochondries dépendante des protéines de fusion MFN et OPA1. Cette élongation éviterait la séquestration des mitochondries par l'autophagosome, empêchant ainsi leur dégradation. Cette hyperfusion serait nécessaire pour la production énergétique essentielle à la survie cellulaire en absence de nutriments, et permettrait aux mitochondries de participer à la formation de l'autophagosome, en lui fournissant des membranes (Rambold et al. 2011; Hailey et al. 2010; Gomes et al. 2011).

7. L'autophagie « sécrétoire »

Outre le rôle bien décrit de l'autophagie dans la dégradation, des études récentes montrent que l'autophagie peut également avoir des fonctions dans l'export extracellulaire d'agrégats protéiques, d'organites intracellulaires, et de microbes (Ponpuak et al. 2015). De plus, l'autophagie permet l'adressage à la membrane plasmique de protéines solubles et transmembranaires, un processus que nous allons détailler ci-dessous.

Cette forme particulière d'autophagie dite « sécrétoire » pourrait intervenir dans l'adressage à la membrane plasmique de protéines ne possédant pas de peptide signal dans leur partie N-terminale, et qui ne peuvent donc pas emprunter la voie d'adressage canonique RE/Golgi.

7.1 Mise en évidence chez la levure

La formation des spores chez l'amibe *dictyostelium discoideum* est dépendante de la sécrétion par les cellules pré-spores de la protéine AcbA (*acyl-CoA binding protein*). AcbA subira ensuite une protéolyse extracellulaire, formant ainsi du SDF-2 (*spore differentiation factor 2*). AcbA ne possédant pas de peptide signal lui permettant d'emprunter la voie RE-Golgi, elle est sécrétée par une voie dite « non conventionnelle », dépendante des protéines de structure de l'appareil de golgi GRASP (*Golgi Reassembly Stacking protein*) (Kinseth et al. 2007; Rabouille et al. 2012).

En 2010, Duran et al se sont intéressés à la sécrétion de la protéine orthologue d'AcbA chez *Saccharomyces cerevisiae*: Acb1. Comme chez *dictyostelium discoideum*, les auteurs ont démontré que cette sécrétion est dépendante des protéines GRASP (et plus précisément de Grh1 pour *GRASP65 homolog protein 1*). De plus, l'induction de la sécrétion d'Acb1 en réponse à la privation en nitrogène implique des mécanismes moléculaires nécessaires au processus d'autophagie. En effet, l'extinction des protéines *atg5*, *atg7*, *atg8*, ou *atg12* empêche la sécrétion d'Acb1. De manière intrigante, l'inhibition de la fusion entre les autophagosomes et la vacuole de dégradation n'a aucun effet sur cette sécrétion. Ainsi, l'autophagosome contenant Acb1 échappe à la dégradation par la vacuole, en empruntant une voie dépendante du compartiment endosomal et/ou des corps multivésiculaires pour atteindre la membrane plasmique. Enfin, la dernière étape de la sécrétion d'Acb1 implique de manière spécifique la protéine de surface t-SNARE, *Sso1*, permettant la fusion de l'amphisome contenant Acb1, avec la membrane plasmique (Duran et al. 2010). Un mécanisme similaire a été caractérisé chez la souche de levure *Pichia Pastoris* (Manjithaya et al. 2010).

Ces deux études constituent le premier modèle de sécrétion de protéines, dépendant des protéines GRASP et des protéines nécessaires à la formation d'un autophagosome. Ce mécanisme sécrétoire semble indépendant de la fusion des autophagosomes avec les vacuoles de dégradation. En revanche, la sécrétion d'Acb1 pourrait impliquer la fusion de l'autophagosome avec des endosomes précoces ou avec des corps multivésiculaires, qui pourraient ensuite déverser leurs contenus dans l'espace extracellulaire (Duran et al. 2010).

7.2 Autophagie « sécrétoire » et protéines solubles chez les mammifères

L'exemple le plus ancien de protéines sécrétées par un mécanisme « non conventionnel » chez les mammifères est l'interleukine 1 β (IL-1 β), une cytokine pro-inflammatoire qui ne possède pas de peptide d'adressage à la membrane plasmique (Muesch et al. 1990).

L'IL-1 β est sécrété par les cellules du système immunitaire, majoritairement par les monocytes et les macrophages activés lors d'un stress (par exemple induit par les bactéries ou les microbes), mais aussi par les lymphocytes B, les lymphocytes T, et les cellules endothéliales. L'IL-1 β agit par l'intermédiaire de ses récepteurs présents à la surface cellulaire, et est impliqué dans une grande variété de réponse cellulaire incluant par exemple la synthèse de prostaglandine, l'activation des cellules neutrophiles et des lymphocytes T, ou encore la prolifération des fibroblastes.

Cette protéine est synthétisée sous forme d'une protéine précurseur pro-IL-1 β inactive. La formation de l'IL-1 β mature nécessite un clivage par la caspase-1, une protéase présente au sein de l'inflammasome, un complexe protéique impliqué dans l'immunité innée et formé lors de la reconnaissance d'agents pathogènes tels que les bactéries ou les virus. La caspase 1 induit donc la transformation et la sécrétion d'une IL-1 β mature et biologiquement active (Piccioli & Rubartelli 2013). Cette sécrétion d'IL-1 β par des monocytes humains activés implique un mécanisme différent de la voie canonique ER-Golgi (Piccioli & Rubartelli 2013).

Dupont et *al.* ont démontré en 2011 que la sécrétion d'IL-1 β par les macrophages après activation de l'inflammasome, est strictement dépendante de l'autophagie induite par la privation en nutriments. En effet, cette sécrétion est abolie dans une lignée de macrophages qui n'exprime plus la protéine *atg5*. De plus, cette étude a montré que la sécrétion d'IL-1 β nécessite la coopération entre le processus de l'autophagie, les protéines GRASP, et Rab8a (une GTPase impliquée dans le trafic et dans l'exocytose à la membrane plasmique). Cependant, et contrairement au mécanisme mis en évidence chez la levure, le maintien du flux autophagique semble nécessaire à cette sécrétion. En effet, le traitement des cellules avec la bafilomycine A1, un inhibiteur de l'acidification

lysosomale qui empêche la dégradation du contenu de l'autophagosome, réduit la sécrétion d'IL-1 β induite par la privation en nutriments (Dupont et al. 2011).

La protéine associée aux microtubules de bout (+), EB-1 (*end-binding protein-1*), classiquement impliquée dans la régulation de la polymérisation, le transport intracellulaire, et l'attachement des microtubules à d'autres structures, pourrait également jouer un rôle dans la sécrétion d'IL-1 β . EB-1 servirait de plate-forme pour la maturation de la pro-IL-1 β , en recrutant l'inflammasome au centre organisateur des microtubules (MTOC), et en induisant la capture du complexe inflammasome-IL-1 β par les autophagosomes. Ceci permettrait ainsi la sécrétion de ce complexe (Wang et al. 2014).

Très récemment, Kimura et al ont démontré qu'en réponse à la privation en nutriments, le récepteur autophagique TRIM16 permet le recrutement d'IL-1 β au niveau de structures membranaires contenant LC3. La sécrétion d'IL-1 β est également dépendante de la formation d'un complexe formé de TRIM16 et de la protéine R-SNARE sec22b. IL-1 β sera sécrétée après la fusion des autophagosomes avec la membrane plasmique. Ce dernier processus n'implique pas la protéine SNARE syntaxine 17 nécessaire à la fusion autophagosome-lysosome, mais est dépendant des protéines sec22b en combinaison avec les protéines Q-SNAREs ; SNAP23, SNAP29, syntaxine 3 et syntaxine 4 présentes à la membrane plasmique (Kimura et al. 2017) **(Figure 27)**.

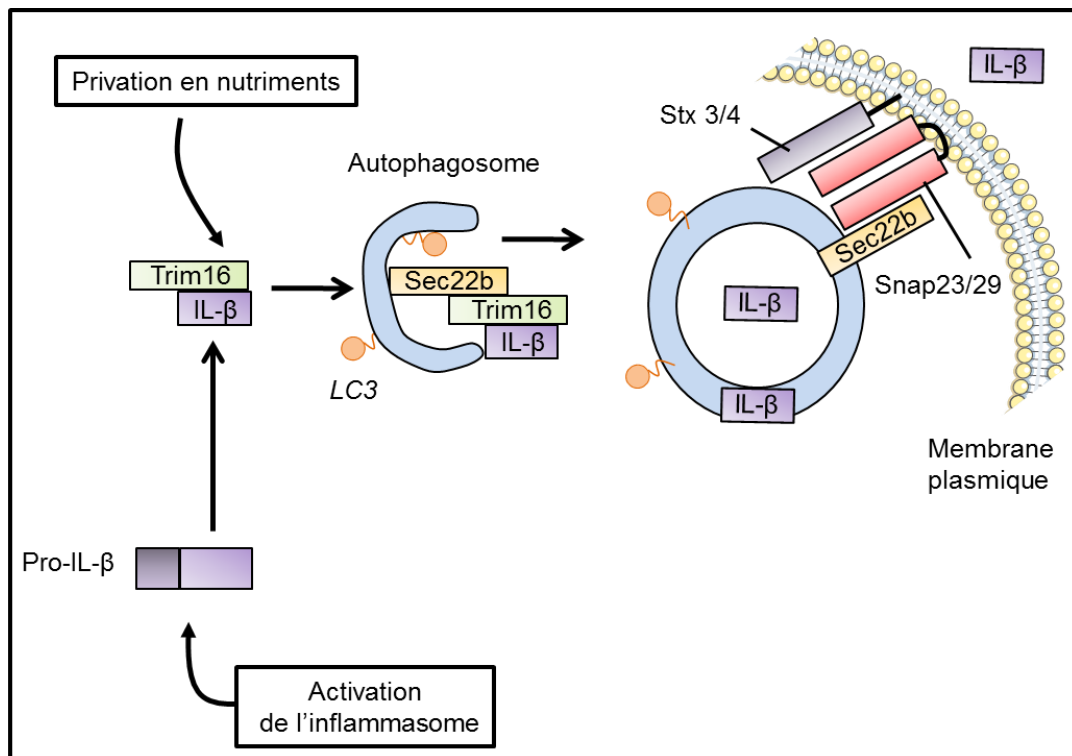


Figure 27 : Mécanisme proposé de la sécrétion d'IL-1 β par l'autophagie. L'activation de l'inflammasome induit la formation d'IL-1 β mature. La privation en nutriments promeut la prise en charge l'IL- β par le récepteur autophagique TRIM16. IL-1 β est chargé au sein des autophagosomes par la protéine SNARE Sec22b. A noter la présence d'IL-1 β dans la lumière du phagosome mais également dans l'espace phagosomal intermembranaire (Zhang et al. 2015). L'autophagosome va ensuite fusionner avec la membrane plasmique et délivrer l'IL-1 β dans le milieu extracellulaire. Ce processus de fusion est dépendant de Sec22b, SNAP23/29/Synthaxine 3/4. D'après Kimura et al.2017.

Ce processus d'autophagie sécrétoire n'est pas restreint à l'IL-1 β . En effet, d'autres cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL18, HMGB1 (*High-mobility Group Box-1*), l'IL6, ou l'IL8 seraient également sécrétées par les macrophages, selon un mécanisme dépendant de l'autophagie (Dupont et al. 2011; Narita 2011).

De plus, ce mécanisme d'adressage non conventionnel n'implique pas que les substrats de l'inflammasome. En effet, l'analyse du sécrétome dépendant de l'autophagie, des macrophages (Kimura et al. 2017; Ohman et al. 2014), ou de cellules cancéreuses de mélanome humain (Kraya et al. 2015), a permis de mettre en évidence la sécrétion d'un grand nombre de protéines provenant de différents compartiments cellulaires, notamment du RE, de la mitochondrie, des péroxysomes ou encore du noyau.

7.3 Autophagie « sécrétoire » et protéines transmembranaires chez les mammifères

L'autophagie a également été associée au trafic non conventionnel de protéines transmembranaires.

Ce mécanisme a été décrit pour la première fois pour le CFTR (*cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*). Ce dernier est un canal anionique dont l'activité est de réguler les échanges d'ions de chlore, et de bicarbonate, au niveau des cellules épithéliales de différents tissus, et notamment des voies respiratoires. La mutation la plus courante du CFTR est une délétion de la phénylalanine en position 508. Cette mutation induit un mauvais repliement de la protéine, et conduit à sa rétention au niveau du réticulum endoplasmique, puis à sa dégradation. Cette incapacité du canal muté $\Delta 508$ -CFTR à rejoindre la membrane plasmique se traduit par des altérations épithéliales notamment la fibrose cystique. Celle-ci se caractérise par une augmentation de la viscosité des sécrétions bronchiques, et une inflammation chronique des voies respiratoires (Gee et al. 2011; De Stefano et al. 2014).

En 2011, Gee et *al.* ont démontré que lorsque la voie d'adressage canonique RE-Golgi est inactivée par surexpression de la protéine muté Sar1, nécessaire au trafic entre le RE et l'appareil de Golgi, les formes immatures non glycosylées du CFTR sauvage et du $\Delta 508$ -CFTR peuvent être adressées directement du RE vers la membrane plasmique.

Ce mécanisme nécessite une interaction entre les protéines GRASP55 et le CFTR, et implique également les mécanismes moléculaires de l'autophagie. En effet, ce processus est inhibé lors de l'extinction par si-RNA des protéines *atg1*, *atg5*, *atg7*, et *atg8*. En revanche le mécanisme d'adressage du CFTR est indépendant de la fusion de l'autophagosome avec le lysosome.

De ce fait, dans un modèle de souris muté pour le CFTR (souris *CftrF508del*) et traité par voie orale avec la cystamine, un activateur de l'autophagie, l'expression du canal muté est restaurée à la membrane plasmique des cellules épithéliales nasales. Ce traitement suffit à réduire l'inflammation pulmonaire ainsi que la mortalité observées chez les souris *CftrF508del* non traitées (De Stefano et al. 2014).

Ce mécanisme d'adressage non conventionnel dépendant de l'autophagie a également été caractérisé pour le récepteur à la thrombopoïétine : Mpl (*myeloproliferative leukemia virus oncogene*). Ce récepteur est exprimé dans les plaquettes et dans les cellules hématopoïétiques, où lorsqu'il est activé, il induit la prolifération et la survie de ces cellules.

La forme mature du récepteur Mpl transite par la voie d'adressage canonique impliquant le réticulum endoplasmique et le Golgi.

De plus, la forme immature de ce récepteur peut également être adressée directement du RE à la membrane plasmique, *via* un mécanisme dépendant des protéines GRASP et de la machinerie d'autophagie. Lors de cet adressage, Mpl a pu être mis en évidence au sein des vésicules d'autophagie par microscopie électronique et photonique.

A l'inverse du CFTR, le maintien d'un flux d'autophagie complet est nécessaire à cet adressage, puisque le traitement des cellules à la bafilomycine A1 induit une accumulation de la forme immature dans le cytosol. Ceci suggère que le récepteur Mpl pourrait transiter par les lysosomes avant d'être adressé à la membrane plasmique (Cleyrat et al. 2014).

Le CFTR et la protéine Mpl sont les seuls exemples connus à ce jour, de protéines transmembranaires pouvant être adressées à la membrane plasmique par un mécanisme dépendant des GRASP et du processus de l'autophagie. Dans ce cas, l'autophagie semble offrir une voie de transport alternative à la voie canonique, et permettrait un processus d'adressage direct, du RE à la membrane plasmique.

8. Implications physiologiques et physiopathologiques de l'autophagie : au niveau vasculaire et hépatique

Au niveau cellulaire, l'autophagie joue un rôle essentiel dans les processus adaptatifs ainsi que dans la qualité et le contrôle des composants cytoplasmiques. De ce fait, de nombreuses altérations de l'autophagie ont été associées à un grand nombre de pathologies, notamment le cancer, les pathologies neurodégénératives, cardio-vasculaires, ou encore hépatiques.

8.1 L'autophagie au niveau vasculaire

Comme nous l'avons vu dans le chapitre I partie 1.3.1, la paroi artérielle se compose de différents types cellulaires, notamment les cellules endothéliales, les cellules musculaires lisses (CML) et les cellules du système immunitaire. Lors du développement de la plaque d'athérome, l'homéostasie de ces différents types de cellules est altérée.

L'autophagie exerce diverses fonctions liées au développement de la plaque d'athérome. Elle peut être activée par divers stimuli pro-athérogéniques tels que les cytokines pro-inflammatoires (TNF- α , Osteopontin), les lipides oxydés (LDLox), les dérivés réactifs de l'oxygène (ROS), l'hypoxie, ou les facteurs de croissance (Vindis 2015). Cependant, le rôle de l'autophagie dans l'athérosclérose est complexe compte tenu des différents types cellulaires composants la plaque, ou encore des différents stades de développement de la pathologie.

Les avancées récentes démontrent cependant que l'autophagie des macrophages a un rôle protecteur dans le développement de la plaque d'athérome.

En effet, Razani et al ont pu démontrer que les aortes athéromateuses expriment un niveau élevé de p62, normalement dégradé durant l'autophagie, suggérant qu'une autophagie dysfonctionnelle est une caractéristique des plaques d'athérosclérose. D'autre part, les souris apoE^{-/-} dont la protéine d'initiation de l'autophagie *atg5* a été invalidée spécifiquement au niveau des macrophages (apoE^{-/-} x m Φ atg5^{-/-}), présentent un développement plus rapide de la plaque d'athérome (Razani et al. 2012).

Ce phénotype pourrait être expliqué par l'augmentation du stress oxydant et de l'apoptose des macrophages déficients pour la protéine *atg5*, ainsi que par la diminution de leur capacité de phagocytose (Vindis 2015).

D'autre part, le rôle protecteur de l'autophagie au niveau des macrophages pourrait également être attribué à sa fonction dans l'efflux de cholestérol. En effet, dans ce type cellulaire, les gouttelettes lipidiques sont délivrées aux lysosomes par le mécanisme d'autophagie. Ce processus permet l'efflux du cholestérol intracellulaire issu de la dégradation de ces gouttelettes, *via* le transporteur ABCA1 (Ouimet et al. 2011). De manière intéressante, ce mécanisme a été confirmé *in vivo* sur un modèle de souris déficientes pour la protéine Wip1 (*Protein Phosphatase 1D*). L'absence de cette protéine induit l'autophagie par inhibition du complexe mTORC1. Ainsi, chez les souris déficientes pour Wip1, les macrophages ont une capacité d'efflux du cholestérol améliorée en réponse aux HDL ou à l'apoA-I. Ce mécanisme diminue la transformation de ces macrophages en cellules spumeuses, et réduit le développement de la plaque d'athérome (Le Guezennec et al. 2012).

Comme nous l'avons vu dans la partie 1.3.1 du chapitre I, les stades précoces de l'athérosclérose se caractérisent par l'infiltration de LDLox dans l'espace sous-endothélial, induisant une dysfonction de l'endothélium vasculaire. L'autophagie contribue à préserver l'intégrité de l'endothélium vasculaire, en participant à la dégradation des LDLox. En effet, l'exposition de cellules endothéliales HUVEC à des LDLox promeut l'autophagie. Les LDLox sont par ailleurs retrouvées localisées dans des structures caractéristiques des autolysosomes marquées avec les protéines Lamp2 et LC3 (Y.-L. Zhang et al. 2010). Au niveau endothélial, l'autophagie pourrait également contribuer à l'élimination des protéines mitochondriales défectueuses, et pourrait réduire la sécrétion endothéliale de facteurs favorisant l'adhésion plaquettaire, tel que le facteur de Von Willebrand (Vindis 2015).

L'autophagie exerce également des fonctions protectrices au niveau des cellules musculaires lisses. En effet, des études ont démontré que l'induction de l'autophagie par le 7-Kétocholestérol (un oxystérol majoritairement représenté dans la plaque d'athérome), ou par traitement à la rapamycine, prévient l'apoptose

des CML (Martinet et al. 2004; Martinet et al. 2008; Xu et al. 2010). A l'inverse, l'inhibition de l'autophagie induit l'apoptose et la nécrose des CML (Xu et al. 2010). Ce rôle protecteur au niveau des CML serait ainsi bénéfique dans les stades tardifs de la pathologie. En effet, l'autophagie pourrait réduire la rupture de la chape fibreuse et par conséquent l'apparition d'un thrombus.

L'ensemble de ces études révèle un rôle protecteur de l'autophagie au niveau de la plaque d'athérome. Néanmoins, certaines études ont démontré qu'une stimulation excessive de l'autophagie peut conduire à la mort cellulaire. Ce processus est délétère car la mort des CML réduit la chape fibreuse de la plaque et donc la déstabilise, favorisant par conséquent l'apparition du thrombus. D'autre part, la mort des cellules endothéliales augmente la perméabilité vasculaire et stimule l'agrégation plaquettaire et donc la formation d'un thrombus (Martinet & De Meyer 2009).

A l'heure actuelle, la modulation de l'autophagie représente une cible thérapeutique potentielle dans le contexte de l'athérosclérose. Différents activateurs de l'autophagie ont été testés sur des modèles pré-cliniques (Vindis 2015). Notamment, le traitement de souris au sirolimus, un dérivé de la rapamycine, réduit le développement de la plaque d'athérome (Basso et al. 2003). Cependant, ces inhibiteurs du complexe mTORC1 induisent également des hyperglycémies et des hypercholestérolémies. L'enjeu à présent serait donc le développement d'inhibiteurs du complexe mTORC1 ne présentant pas d'effets « hors-cibles ».

8.2 L'autophagie au niveau hépatique

Au niveau hépatique, durant les périodes de jeûne, l'autophagie fournit les acides aminés et les acides gras nécessaires au processus de gluconéogenèse et de β -oxydation. Elle joue par ailleurs un rôle dans le maintien de la glycémie. L'autophagie est également contrôlée de façon hormonale au niveau hépatique. De ce fait, l'insuline inhibe l'autophagie contrairement au glucagon qui la stimule. L'autophagie joue donc un rôle primordial dans l'homéostasie du foie. Son inhibition conduit par conséquent à diverses pathologies telles que des syndromes

métaboliques alcooliques ou non, des hépatites, ou encore le développement de tumeurs (Codogno & Meijer 2013).

L'altération du processus d'autophagie est associée à divers syndromes métaboliques alcooliques ou non.

En effet, un défaut d'autophagie responsable d'une accumulation de lipides au niveau des hépatocytes serait impliqué dans la stéatose hépatique (Czaja 2011; Codogno & Meijer 2013). Cette dernière constitue une hépatopathie chronique grave, qui se caractérise par l'accumulation de graisses au niveau du foie pouvant, en fonction des sous-types de stéatose, être associée ou non à une fibrose et à une inflammation du tissu hépatique. D'autre part, des altérations de l'autophagie sont observées dans les syndromes alcooliques chroniques. Un défaut d'autophagie induit par la consommation chronique d'alcool conduit à l'accumulation de mitochondries défectueuses, d'agrégats protéiques ainsi qu'une augmentation du stress oxydant. Ces processus conduisent à l'apoptose et/ou la nécrose des cellules hépatiques. Ce processus est responsable d'importantes lésions au niveau du foie

Une dérégulation de l'autophagie a également été associée au développement de tumeurs hépatiques (hépatocarcinome).

En effet, un défaut d'autophagie lors du stade d'initiation du développement tumoral induit l'augmentation du stress oxydatif et des dommages à l'ADN. L'accumulation de la protéine p62 au niveau cytosolique activerait également la voie de signalisation impliquant les protéines NF κ B (*nuclear factor-kappa B*) et Nrf2 (*Nuclear Factor-Like2*), impliquées dans la survie et dans la prolifération cellulaire. Ainsi, ce défaut d'autophagie conduirait donc à une prolifération excessive des cellules (Cursio et al. 2015). Néanmoins, le rôle de l'autophagie dans l'hépatocarcinogénèse semble être complexe. En effet, durant les stades les plus avancés de la tumorigénèse, l'autophagie semble jouer un rôle protecteur favorisant plutôt la survie des cellules cancéreuses hépatiques (Cursio et al. 2015).

Finalement, des altérations du processus d'autophagie ont été rapportées comme étant associées à des infections virales (Hépatites B et C). En effet, ces

virus utilisent la machinerie d'autophagie pour leur propre réplication (Harada 2011).

Chapitre III : Résultats expérimentaux et perspectives des travaux

Objectifs du travail

L'effet protecteur des HDL sur les pathologies cardio-vasculaires est principalement attribué à leur rôle central dans le "Transport Retour du Cholestérol" (TRC), des cellules périphériques vers le foie, où il est éliminé.

Dans ce contexte, l'ecto-F₁-ATPase joue un rôle clef dans l'endocytose hépatique des HDL. En effet, la liaison de l'apoA-I (protéine majoritaire des HDL) stimule l'activité ATPasique de l'enzyme, entraînant la production d'ADP extracellulaire puis l'activation spécifique du récepteur nucléotidique P2Y₁₃, aboutissant à l'endocytose des HDL.

Les objectifs de ce travail de thèse visent à déterminer les mécanismes de régulation de l'ecto-F₁-ATPase, et à évaluer leurs contributions dans l'endocytose hépatique des HDL dépendante de cette enzyme.

Pour cela, d'une part, nous nous sommes intéressés aux autres acteurs impliqués dans la régulation du métabolisme nucléotidique extracellulaire, et particulièrement à l'ANT ou adénine nucléotide translocase.

D'autre part, nous avons également étudié le mécanisme d'adressage de l'ecto-F₁-ATPase à la membrane plasmique. Dans ce cadre nous avons évalué l'implication de l'autophagie dans la régulation de l'expression de l'ecto-F₁-ATPase à la surface cellulaire.

Etude I :

**Rôle de l'Adénine Nucléotide Translocase
(ANT) dans la régulation de la voie ecto-F₁-
ATPase d'endocytose des HDL**

1. Contexte

La génération d'ADP extracellulaire est une étape clé du processus d'endocytose hépatique des HDL dépendante de la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃. La liaison de l'apoA-I stimule l'activité ATPasique de l'ecto-F₁-ATPase, entraînant la production d'ADP extracellulaire. L'ADP va ensuite activer spécifiquement le récepteur nucléotidique P2Y₁₃, et stimuler *in fine* l'endocytose des HDL, *via* un récepteur de basse affinité dont l'identité reste encore inconnu (Martinez et al. 2003; Fabre et al. 2010; Malaval et al. 2009; Jacquet et al. 2005).

Dans ce contexte, notre laboratoire a identifié l'adénylate kinase (AK, 2ADP \leftrightarrow ATP+AMP) à la surface des hépatocytes et a montré que cette enzyme régule négativement l'endocytose des HDL dépendante de l'activité ecto-F₁-ATPase, en consommant l'ADP généré par cette dernière (Fabre et al. 2006).

Compte tenu de l'importance de la régulation des taux d'ADP et d'ATP extracellulaires dans cette voie d'endocytose des HDL, je me suis intéressé à un autre acteur qui pourrait être impliqué dans ce processus. En effet, j'ai étudié la régulation du métabolisme nucléotidique par l'adénine nucléotide translocase (ANT). Ce transporteur membranaire est classiquement connu comme étant présent à la membrane interne de la mitochondrie, où il permet l'échange des nucléotides adényliques ATP et ADP entre la matrice mitochondriale et le cytosol (Brenner et al. 2011).

L'ANT et la F₀F₁-ATP-synthase ont été décrites comme étant étroitement localisées au niveau de la membrane interne de la mitochondrie suggérant ainsi l'interdépendance du mécanisme de synthèse et d'export d'ATP, ainsi que d'import d'ADP et de Pi (Ko et al. 2003; Chen et al. 2004).

D'autre part, plusieurs études ont rapporté la présence de l'ANT à la membrane plasmique de différents types cellulaires tels que les lignées tumorales mammaires MCF-7 et fibroblastiques HT-1080 où elle jouerait un rôle dans la migration de ces dernières (Radichev et al. 2009). L'ANT présente à la surface des neurones primaires participe quant à elle, à la sortie d'ATP du milieu intracellulaire vers le milieu extracellulaire, régulant ainsi la croissance neuronale (Loers et al. 2012). De plus, une étude de protéomique récente (Rai et al. 2013) a également mis en évidence la présence de l'ANT ainsi que l'ensemble des sous-unités de la F₀F₁-ATPase dans des préparations de membrane plasmique de foie

de rat suggérant un rôle potentiel de cette translocase dans la régulation du métabolisme nucléotidique extracellulaire lié à l'activité de l'ecto-F₁-ATPase.

L'objectif de cette partie de ma thèse a donc consisté à étudier dans un premier temps, l'expression et l'activité de l'ANT à la surface des cellules HepG₂ (lignée cellulaire d'hépatocarcinome humain). Dans un second temps, mon objectif a été de déterminer le rôle de l'ANT dans la régulation des nucléotides adényliques extracellulaires (ADP et ATP), dont les niveaux sont également modulés par l'activité de l'ecto-F₁-ATPase. J'ai enfin étudié son implication dans la régulation de l'endocytose des HDL dépendante de l'ecto-F₁-ATPase.

2. Article

Ectopic adenine nucleotide translocase activity controls extracellular ADP levels and regulates the F₁-ATPase-mediated HDL endocytosis pathway on hepatocytes

Cardouat G¹, Duparc T¹, Fried S¹, Perret B^{1,2}, Najib S^{1*} and Martinez LO^{1*}.

Running title: ecto-ANT in HDL endocytosis

¹Institute of Metabolic and Cardiovascular diseases, I2MC, Inserm, Université de Toulouse, UMR 1048, Toulouse, 31000, France.

²Service de Biochimie, Pôle biologie, Hôpital de Purpan, CHU de Toulouse, Toulouse, France.

Corresponding authors: Laurent Martinez and Souad Najib, INSERM UMR1048, 1 avenue Jean-Poulhès BP 84225, 31432 Toulouse Cedex 4, France.

Email: souad.najib@inserm.fr, laurent.martinez@inserm.fr

***Authorship note:** S. Najib and LO. Martinez are co-senior authors.

Abstract

Ecto-F₁-ATPase is a complex related to mitochondrial ATP synthase which has been identified as a plasma membrane receptor for apolipoprotein A-I (apoA-I), the major protein of high-density lipoprotein (HDL), and has been shown to contribute to HDL endocytosis in several cell types. On hepatocytes, apoA-I binding to ecto-F₁-ATPase stimulates extracellular ATP hydrolysis into ADP, which subsequently activates a P2Y₁₃-mediated HDL endocytosis pathway. Interestingly, other mitochondrial proteins have been found to be expressed at the plasma membrane of several cell types. Among these, adenine nucleotide translocase (ANT) is an ADP/ATP carrier but its role in controlling extracellular ADP levels and F₁-ATPase-mediated HDL endocytosis has never been investigated. Here we confirmed the presence of ANT at the plasma membrane of human hepatocytes. We then showed that ecto-ANT activity increases or reduces extracellular ADP level, depending on the extracellular ADP/ATP ratio. Interestingly, ecto-ANT co-localized with ecto-F₁-ATPase at the hepatocyte plasma membrane and pharmacological inhibition of ecto-ANT activity increased extracellular ADP level when ecto-F₁-ATPase was activated by apoA-I. This increase in the bioavailability of extracellular ADP accordingly translated into an increase of HDL endocytosis on human hepatocytes.

This study thus uncovered a new location and function of ANT for which activity at the cell surface of hepatocytes modulates the concentration of extracellular ADP and regulates HDL endocytosis.

Keywords (6): Adenine Nucleotide Translocator, High Density Lipoprotein, ATP synthase, apolipoprotein A-I, Inhibitory Factor 1, Nucleotide

1. Introduction.

Cell surface receptors for high-density lipoprotein (HDL) are major partners in the regulation of cholesterol homeostasis and other atheroprotective properties displayed by HDL, including vascular endothelial protection [1]. Among these receptors, cell surface F_1 -ATPase is a high affinity receptor for apolipoprotein A-I (apoA-I), the main HDL protein [2]. F_1 -ATPase is the catalytic part of F_0F_1 -ATP synthase, an enzymatic complex classically located at the mitochondrial inner membrane and coupled to the mitochondrial respiratory chain. However, a majority of subunits of this complex, are found ectopically expressed on the plasma membrane of a broad range of cells, including hepatocytes and endothelial cells [3–5]. Under physiological conditions, the cell surface F_1 -ATPase (henceforth ecto- F_1 -ATPase) works catalytically in a direction opposite to that described within functional mitochondria. Indeed, apoA I binding to ecto- F_1 -ATPase stimulates the hydrolysis of extracellular ATP into ADP and inorganic phosphate. The ADP released transduces this enzymatic activity into cellular effects through the activation of ADP-responsive P2Y receptors and downstream signaling pathways. For instance, on hepatocytes, ecto- F_1 -ATPase activity is specifically coupled to the P2Y₁₃-ADP receptor, which promotes HDL holoparticle endocytosis and contributes to atheroprotection [6]. On endothelial cells, ecto- F_1 -ATPase activation by HDL-apoA-I inhibits apoptosis induced by serum deprivation and promotes proliferation [7]. On endothelial cells, ecto- F_1 -ATPase is also described as coupled to the P2Y₁₂-ADP receptor and as contributing to the uptake of HDL and lipid-free apoA-I [8]. In recent years, other selected inner mitochondrial membrane proteins have also been reported to be expressed at the plasma membrane, including three of the four respiratory complexes and the adenine nucleotide translocator (ANT) [9,10].

ANT, also known as ADP/ATP carrier, is a protein of the mitochondrial inner membrane which allows the electrogenic exchange of adenine nucleotides, namely ADP and ATP, between the matrix and the intermembrane space of mitochondria. ANT, phosphate carrier (PiC) and F_0F_1 -ATP synthase are closely localized in mitochondrial inner membrane cristae, supporting a mechanism in which the entry of the substrates ADP and Pi into mitochondria, the synthesis of ATP and the release and exit of ATP are localized and highly coordinated events [11–13].

In this study, we investigated the functional activity of ANT at the plasma membrane of hepatocytes where it is able to modulate extracellular adenine nucleotide levels, in close relationship with ecto- F_1 -ATPase activity. We found that ANT was expressed at the plasma membrane of two human hepatocytes cell lines (HepG2 and IHH), and demonstrated that its activity controlled extracellular ADP level depending on the extracellular ADP/ATP ratio. Interestingly, plasma membrane ANT was closely localized with ecto- F_1 -ATPase and pharmacological inhibition of ANT activity increased extracellular ADP levels when ecto- F_1 -ATPase activity was stimulated by apoA-I. Accordingly, F_1 -ATPase-mediated HDL endocytosis was significantly increased when ANT activity was pharmacologically inhibited.

2. Material and methods.

2.1. Cell culture.

The human hepatocyte cell line HepG2 was obtained from the American Type Culture Collection (#HB-8065). Immortalized human hepatocytes (IHH cells) were provided by P. Cordelier [14]. Both cell types were seeded on Collagen-I-coated plates or dishes (C3867, Sigma) and allowed to adhere and grow for 24h in high glucose DMEM (D0822, Sigma) supplemented with 10% fetal bovine serum (10270-098, Life technologies), 100 units/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin (P0781, Sigma) at 37 °C in a 5% CO₂ and 95% air incubator. HepG2 and IHH cells were then serum starved for 24h and 72h respectively, in order to synchronize the cell cycles. They were then given another 16h with the growth medium before being used in experiments. This constitutes 'basal conditions', meaning that no additional specific compound had been added.

2.2. Apolipoprotein A-I (apoA-I) isolation and inhibitory factor 1 (IF1) production.

Total plasma samples were obtained from healthy volunteers (<35 years old) who signed an informed consent form, in accordance to the Declaration of Helsinki. HDL and LDL were isolated by ultracentrifugation [15]. HDL were delipidated and apoA-I was isolated by Sephadex G-150 size exclusion chromatography, using Tris-HCl 10 mM pH 8.0, NaCl 154 mM, EDTA 2.7 mM, and urea 7 M as elution buffer [16].

The inhibitor peptide of F₁-ATPase (IF1¹⁰⁻⁴⁷) consists of residues 10-47 of Inhibitory Factor 1, which has been characterized as the minimal inhibitory sequence [17]. IF1¹⁰⁻⁴⁷ was chemically synthesized on solid-phase using Fmoc-α amine-protected amino acids (Biotem, France). Peptides were eluted from the solid phase and purified by HPLC, and then analyzed by mass spectroscopy. The final peptide was delivered with a purity >95%.

2.3. Cell surface protein biotinylation.

HepG2 and IHH cells, seeded on 100 mm dishes (10⁶ cells/dish), were washed 3 times with ice cold phosphate-buffered saline (PBS) supplemented with 2 mM CaCl₂ and 2 mM MgCl₂ and labeled for 30 min at 4°C with EZ-link™ NHS-SS-biotin (0.5 mg/mL, Pierce, #21331) to biotinylate surface proteins. Afterwards, the unconjugated biotin was quenched for 20 min with 20 mM NH₄Cl in PBS and the cells were lysed in 20 mM Tris pH7.4, 150 mM NaCl, 1mM EDTA, 1% NP-40 supplemented with protease inhibitors (P8340, Sigma). The protein concentration was determined using the Bio-Rad protein assay dye and equal amounts of proteins were incubated with Streptavidin agarose beads (Pierce, #20353) at 4°C overnight. The biotinylated proteins were then eluted by boiling at 95°C in 2.5x SDS sample buffer for 15 min.

2.4. Western blots.

Cell lysates of 50 µg total or of 300 µg biotinylated proteins were SDS-PAGE electrophorized under reducing conditions, transferred onto nitrocellulose membranes (Life Science) and analyzed by immunoblotting. Primary antibodies against the β subunit of F₁-ATPase (#MA1-930, 4.3E8.D10,

Pierce), ANT (#14671S, Sigma) and aldolase (#GTX101408, GeneTex) were used at 1:1000 dilution and mouse or rabbit-HRP-labeled secondary antibodies (#W4021, #W401B, Promega) at 1:10 000. The chemiluminescent blots were acquired using ChemiDoc MP imaging system (Bio-RAD®).

2.5. Fluorescence microscopy.

HepG2 cells, seeded on collagen-I coated coverslips placed in 12-well plates ($2 \cdot 10^5$ cells/well), were incubated with 50 nM MitoTracker Red CMXRos (#M7512, ThermoFisher Scientific) for 30 min at 37°C. After 3 washes with ice cold PBS, cells were incubated for 30 min at 4°C with primary antibodies diluted in PBS 1.5% BSA (Anti-ANT, #sc-9299, Santa Cruz, 1:100; Anti- βF_1 , #MA1-930, 4.3E8.D10, Pierce, 1:100). The cells were washed again and stained with Alexa fluor conjugated secondary antibodies (ThermoFisher Scientific) diluted in PBS 1.5% BSA, for 30 minutes at 4°C. Cells were then fixed in 4 % paraformaldehyde, nuclei were stained using DAPI (5 μ g/mL, 5 min), slides were mounted with coverslips and examined using a LSM780 confocal microscope (Carl Zeiss).

2.6. Flow cytometry.

HepG2 cells, seeded on 100 mm dishes (10^6 cells/dish), were washed 3 times with ice cold PBS, harvested using EDTA (10 mM) and fixed in 4% paraformaldehyde diluted in PBS, pH 7.4. After three washes in PBS 1.5 % BSA, cells were incubated with primary antibody against ANT (#sc-9299, Santa Cruz) for 60 min at room temperature. Samples were then washed and stained with a donkey antibody against goat IgG conjugated to AlexaFluor®488 (ThermoFisher Scientific) before analysis on a BD LSR Fortessa (BD Biosciences).

2.7. Measurement of extracellular ADP and ATP.

HepG2 cells, seeded on 24-well plates at 75,000 cells/well (~60% confluence), were washed and equilibrated in fresh culture medium without red phenol for 1 h (#D1145, Sigma). The cells were then treated with ADP (1 μ M, 20 min, #A2754, Sigma), ATP (1 μ M, 20 min, #A2383, Sigma), apoA-I (10 μ g/ml, 15 min), cATR (5 μ M, 10 min, #C4992, Sigma) or IF1¹⁰⁻⁴⁷ (5 μ M, 10 min). Supernatants were removed and centrifuged (10,000g, 5 min, 4°C) then processed for ADP and ATP measurement.

For ADP measurement, ADP was converted into ATP in 150 mM NaCl, 5mM KCl, 2mM MgCl₂, pH 7.5 buffer containing 0.5 mM phosphoenolpyruvate (PEP) and pyruvate kinase (PK, 6U for 15 min at 37 °C).

For ATP measurement, 100 μ l of sample was analyzed using the ATP bioluminescence assay kit CLS II (Roche Diagnostics) [18]. Samples were added to the ATP assay mixture and luminescence was measured in a microplate luminometer Infinite F500 (Tecan) for 1000 ms. The ATP standard curve was produced in the same medium as the samples and in the 10^{-5} to 10^{-10} M concentration range. The ADP concentration was then calculated as the ATP concentration

following ADP conversion minus the basal ATP concentration. Data are expressed as nanomoles of ATP or ADP produced.

2.8 F₁-ATPase activity assay.

The activity of IF1¹⁰⁻⁴⁷ was assayed for the inhibition of ATPase of isolated, nucleotide-stripped and inhibitor-free, bovine F₁-ATPase [17]. Briefly, bovine heart mitochondrial F₁-ATPase [19] (60 µg, 160 pmol), stored in ammonium sulfate solution, was precipitated and resuspended in 100 µl of activity assay buffer (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 0.5 mM phosphoenolpyruvate, 250 µM NADH, 100 µM ATP, 20U lactate dehydrogenase, 120U pyruvate kinase). The mixture was incubated at 37 °C for 30 min. Then the ATPase activity was measured in a 96-well microplate by adding 5 µL of the mixture (3 µg of F₁-ATPase per point) per well to 200 µL of activity assay buffer at 37 °C, and by adding 5 µL of buffer with or without increasing concentration of IF1¹⁰⁻⁴⁷. The reduction in the absorbance of NADH was measured at 340 nm for 5 min with a VarioskanTM Flash Multimode Reader (Thermo Fisher Scientific). A slope was calculated for each well and the results expressed as a percentage of the control slope.

2.9. HDL and LDL endocytosis assays.

HepG2 and IHH cells were seeded on 12-well plates (150,000 cells/well) on round, collagen-I coated coverslips. Lipoproteins endocytosis (HDL or LDL) was measured by our standard method [20]. Briefly, HDL or LDL were fluorescently labeled with AlexaFluor®568 dye (A10238, ThermoFisher Scientific) according the instructions of manufacturer. Then, 100 µg/mL AlexaFluor568®-labeled HDL or LDL particles were endocytosed for 20 min at 37 °C in HepG2 or IHH cells. For each condition, the same experiment was performed with a 25-fold excess of unlabeled HDL or LDL (2.5 mg / mL) to determine the nonspecific fluorescence signal.

Cells were then washed 3 times in serum-free DMEM. Extracellular membrane-bound HDL was disassociated by incubating cells at 4 °C in serum-free DMEM for 90 min. Following washes, cells were fixed using 4 % paraformaldehyde, and nuclei were stained using DAPI. The endocytosis of fluorescent HDL or LDL was examined using an LSM780 confocal microscope (Carl Zeiss). Fluorescence quantification was done using the Image J platform and normalized on cell number. For each condition, fluorescence signal was normalized on cell number. Specific fluorescence signal for HDL and LDL endocytosis was calculated by subtracting value of nonspecific fluorescence signal (which represents ~30% for HDL and ~ 20% for LDL) to the total fluorescence signal. Data were expressed as a percentage above or below the control value (i.e. non-treated cells set at 0).

2.10. Statistical analysis.

All results are presented as mean (SEM). Comparison between two groups was made using Student's t-test. Differences between more than two groups were analyzed by one-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni post-hoc test. Outcomes of $p < 0.05$ were considered statistically significant. Analyses were performed using the GraphPad Prism 5.00 software.

3. Results.

3.1. Expression of ANT at the cell surface of hepatocytes.

A biochemical approach was first used to assess the presence of ANT at the plasma membrane of HepG2 cells. Briefly, cell surface proteins were labeled with a membrane impermeable biotinylation reagent and biotinylated proteins retained on immobilized streptavidin were analyzed by Western blots. The detection of ANT in streptavidin precipitates indicates that ANT is expressed at the cell surface (Figure 1A). A similar result was obtained with the β -subunit of F_1 -ATPase (βF_1), another mitochondrial protein expressed at the cell surface of hepatocytes [2]. As a control, the absence of aldolase in streptavidin pull-down of biotinylated cell surface proteins indicates the absence of cytosolic contamination in streptavidin precipitates (Figure 1A). As expected, aldolase, ANT and βF_1 proteins were all found in cell lysate (input). This reflects the classical cytosolic expression of aldolase and the mitochondrial expression of ANT and βF_1 .

In addition, flow cytometry analysis of ANT expression at the plasma membrane of intact HepG2 cells (selected as cells excluding propidium iodide) showed significantly more surface staining than the isotypic control (Figure 1B).

The presence of ANT at the plasma membrane of HepG2 cells was further confirmed by confocal microscopy. Indeed, ANT labeling in non-permeabilized cells revealed patch-like structures over the entire surface of the cell which did not co-localize with MitoTracker red, a specific marker of mitochondria (Figure 1C, panels a, b, c). On the other hand, after cell permeabilization, ANT labeling showed a conventional mitochondrial distribution that colocalized with MitoTracker (Figure 1C, panels d, e, f). ANT staining was specific as isotypic controls did not show fluorescence (not shown).

Cell surface biotinylation assay was also performed on non-tumoral Immortalized Human Hepatocytes, IHH cells, showing that ANT is also expressed on plasma membrane of these cells (Figure 1D).

These data taken together clearly identify the presence of ANT (henceforth "ecto-ANT") on the cell surface of both tumoral and non-tumoral hepatocytes

Figure 1

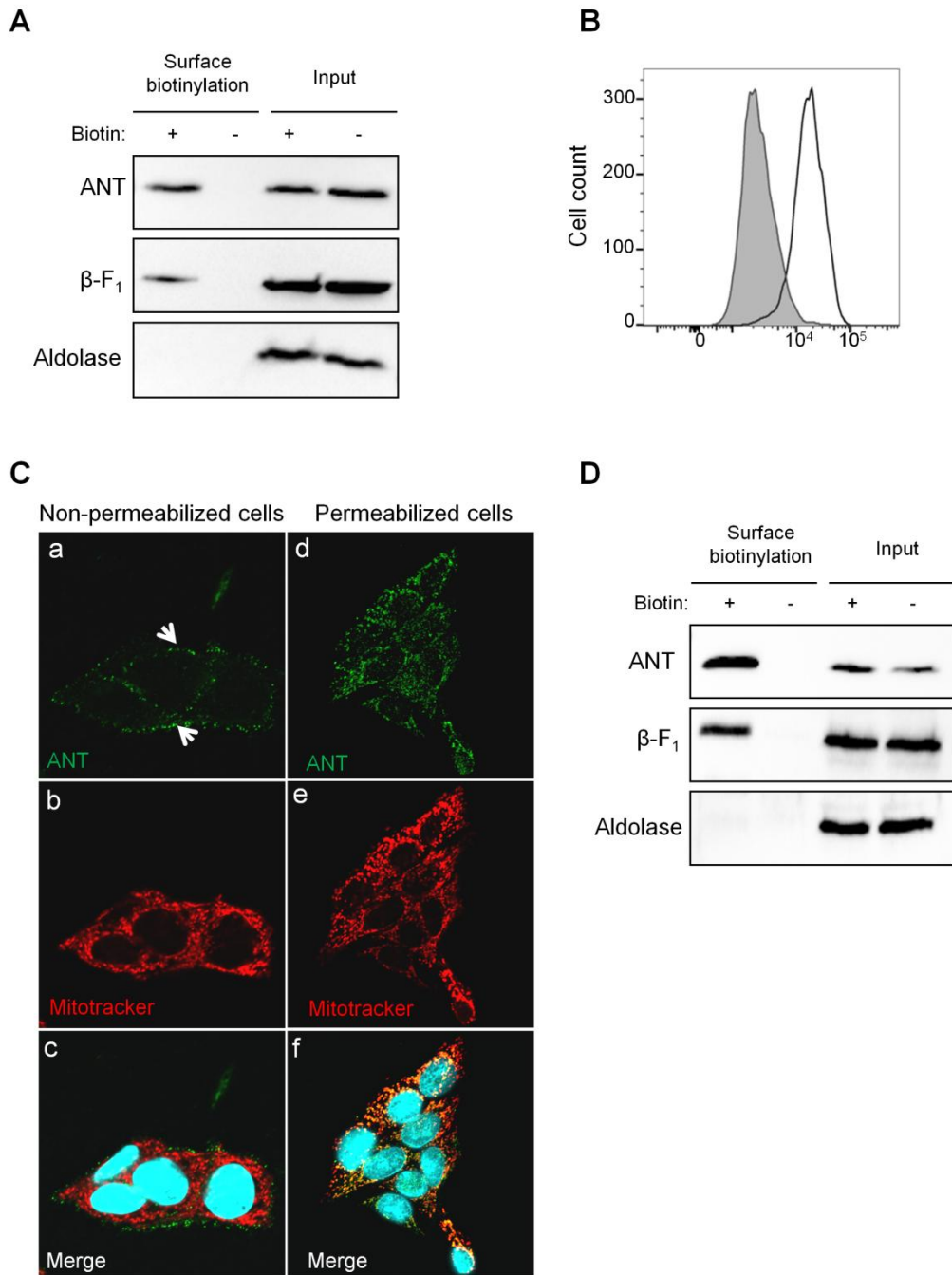


Figure 1: ANT is localized within the mitochondria and on the plasma membrane of hepatocytes. (A, D) The cell surface proteins of intact HepG2 (A) and IHH (D) cells were biotinylated as described in Materials and Methods then surface-biotinylated and the total (input) proteins were analyzed by western blot for ANT, β subunit of F₁-ATPase (β -F₁) and aldolase. **(B)** Analysis of intact HepG2 cells by flow cytometry. Representative histogram of cells stained with anti-ANT antibody. The grey histogram represents the isotypic control staining. **(C)** Representative confocal images of intact (panels a, b, c) and permeabilized (panels d, e, f) HepG2 cells stained for ANT (green), mitochondria (MitoTracker red) and nucleus (DAPI, blue). Control experiments were performed using an isotype control antibody (not shown).

3.2. Ecto-ANT activity regulates basal level of extracellular ADP.

Mitochondrial ANT allows the electrogenic exchange of ADP and ATP between the matrix and the intermembrane space [21]. We therefore investigated whether cell surface ecto-ANT displays a similar function by measuring extracellular ADP and ATP concentrations (henceforth “eADP” and “eATP”) of cultured HepG2 cells. Under basal cell culture conditions, in growth medium, eATP and eADP concentrations were stable over time. The basal value for eATP was 6.26 ± 2.20 nM and for eADP 3.78 ± 1.37 nM ($p = 0.39$, Figure 2A, 2B). Interestingly, pharmacological inhibition of ANT for 20 min by carboxyatractyloside (cATR) significantly reduced eADP concentration by more than 50% compared to untreated cells (1.91 ± 0.34 nM versus 4.00 ± 0.83 nM, $p < 0.05$, Figure 2B) but had no effect on eATP concentration (Figure 2A).

We then measured intracellular concentrations of ADP and ATP (henceforth “iADP” and “iATP”) and analyzed whether cATR treatment for 20 min could modulate their value (Figure 2C). First, under basal conditions, concentrations of iADP and iATP were both much higher than those of the corresponding eADP and eATP, suggesting that export of adenine nucleotide from the cell is so regulated that a concentration gradient is maintained. Concentration of iATP was significantly higher than that of iADP (6246.0 ± 166.2 nM versus 1135.0 ± 154.8 nM, $p < 0.05$) with an iADP:iATP of 0.18 ± 0.02 , which is a feature of healthy and proliferating HepG2 cells [22]. In contrast to that observed for eADP, cATR treatment did not have any effect on iADP concentration or on that of iATP. This suggests that cATR did not inhibit mitochondrial ANT in those conditions and that cATR activity on ecto-ANT had no effect on the intracellular pool of adenine nucleotide.

These results indicate that ecto-ANT is functional under basal conditions and contributes to maintaining the eADP concentration close to that of eATP.

Figure 2

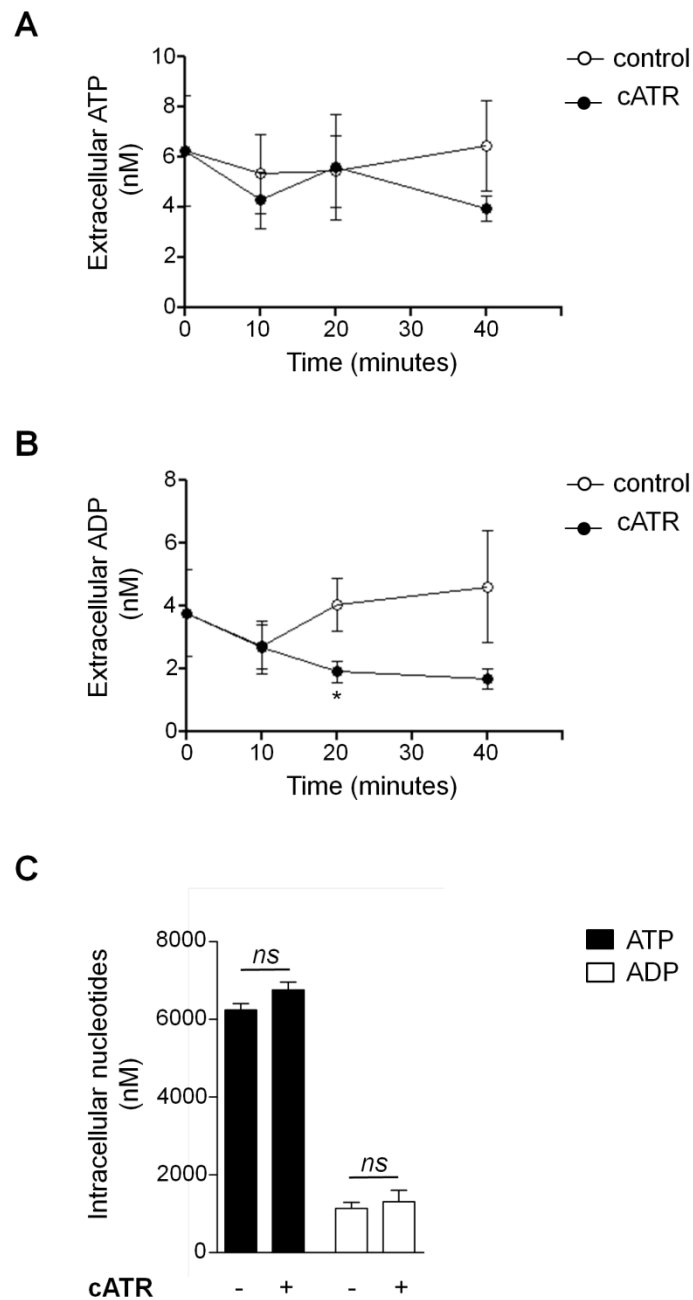


Figure 2. Ecto-ANT regulates basal extracellular ADP concentration. HepG2 cells were incubated in growth medium with or without 5 μ M cATR. Extracellular medium was collected at 10, 20 and 40 min. For each time point, extracellular ATP (**A**) and ADP (**B**) concentration were measured by luciferin-luciferase assay as described in Materials and Methods. (**C**) HepG2 cells were incubated in growth medium with or without 5 μ M cATR for 20 min. Cells were then lysed and intracellular concentrations of ADP and ATP were measured. Values are expressed as the mean (SEM) of at least three independent experiments. Data are analyzed compared to control condition (without cATR) by Student's t-test (* $p < 0.05$, *ns* not significant).

3.3. Ecto-ANT activity depends on extracellular ADP/ATP ratio.

To evaluate the effect of extracellular adenine nucleotides concentration on ecto-ANT activity, HepG2 cells were incubated for 20 min with an excess of either ADP or ATP and extracellular concentrations of these nucleotides were then measured (Figure 3).

After adding 1 μ M ADP to HepG2 cells (Figure 3A), eADP concentration was 328.5 ± 41.1 nM, indicating that one part of added ADP might have been hydrolyzed. However, pharmacological inhibition of ecto-ANT with cATR resulted in a significant increase in eADP concentration (450.8 ± 27.4 nM) as compared to non-treated cells ($p < 0.05$), which indicate that ecto-ANT activity contributed to reduce the excess of eADP. Furthermore, addition of ADP to HepG2 cells increased eATP compared to basal conditions (30.9 ± 4.2 nM, Figure 3A versus 6.26 ± 2.20 nM, Figure 2A). This feature has been attributed to adenylate kinase activity ($2\text{ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$) [18] and is not likely to be due to ecto-ANT activity since eATP level was not altered by cATR treatment (33.2 ± 3.8 nM).

After addition of 1 μ M ATP to HepG2 cell (Figure 3B), eATP concentration was 262.4 ± 41.9 nM, indicating that one part of added ATP might have been hydrolyzed (Figure 3B). Addition of ATP also translated into an increase of eADP concentration as compared to basal conditions (186.3 ± 42.1 nM, Figure 3B versus 3.78 ± 1.37 nM, Figure 2B). Interestingly, pharmacological inhibition of ecto-ANT with cATR reduced eADP concentration by about 50% (88.9 ± 20.7 , $p < 0.05$ compared to untreated cells, Figure 3B). Furthermore, as observed under basal conditions (Figure 2A) or after adding ADP (Figure 3A), cATR treatment did not affect eATP concentration when ATP was added (Figure 3B).

Collectively, these data indicate that ecto-ANT regulates eADP level in a manner that depends on extracellular adenine nucleotide concentration. Indeed, as observed here, when eADP concentration is higher than that of eATP, ecto-ANT activity contributes to lower eADP and conversely, when eATP is higher, ecto-ANT increases eADP.

Figure 3

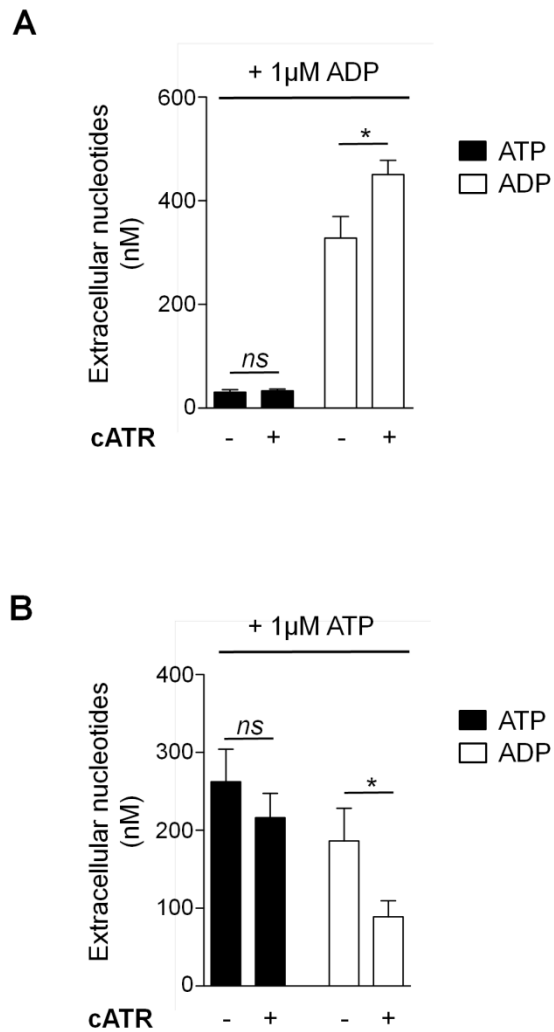


Figure 3. ANT regulates extracellular ADP concentration dependently on extracellular adenine nucleotides concentration. HepG2 cells were pre-incubated for 10 min with or without 5 µM cATR then incubated for 20 min with 1µM ATP (A) or 1µM ADP (B). Concentrations of extracellular ATP (black bars) and ADP (white bars) were then measured by luciferin-luciferase assay as described in Materials and Methods. Values are expressed as the mean (SEM) of at least three independent experiments. Data are analyzed compared to control condition (without cATR) by Student's t-test (* $p < 0.05$, *ns* not significant).

3.4. Close association between ecto-ANT and ecto-F₁-ATPase at the plasma membrane of hepatocytes.

Both mitochondrial ANT and FoF₁-ATP synthase are localized in the mitochondrial inner membrane where they work in close synchrony and co-localize within cristae in structures called ATP synthasomes, supporting a mechanism in which the entry of the substrates ADP into mitochondria, the synthesis of ATP and the release and exit of ATP are very localized and highly coordinated events [11–13].

We first checked the mitochondrial localization of these two enzymes on permeabilized HepG2 cells. As expected, ANT and the β F₁ subunit of ATP synthase showed a mitochondrial distribution that colocalized with MitoTracker Red (Figure 4A).

We then analyzed whether they were also co-localized at the plasma membrane by confocal microscopy using non-permeabilized HepG2 cells (Figure 4B). Staining of the β F₁ subunit revealed patch-like structures on the cell surface, as already reported on different cell types, including HepG2 cells [7,23–25]. Similar patches were also revealed for ANT although the fluorescence signal was also present on the remainder of the plasma membrane where they were more evenly distributed. Superimposition of the ANT and β F₁ images indicates that both proteins co-localized at the plasma membrane but, unlike F₁-ATPase, ANT is distributed, albeit spottily, over the entire surface of the cell.

These results indicates that ecto-ANT and ecto-F₁-ATPase are closely localized at the cell surface and could work together to regulate eADP level.

Figure 4

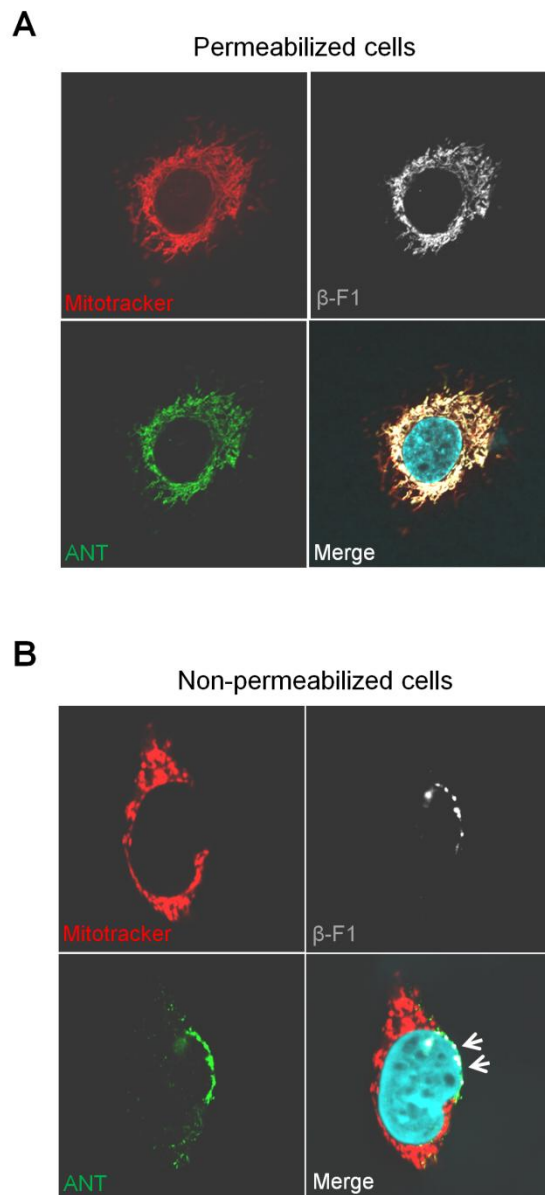


Figure 4. Ecto-ANT co-localizes with ecto-F₁-ATPase on the surface of HepG2 cell. Representative confocal microscopy images of permeabilized (**A**) or non-permeabilized (**B**) HepG2 cells. Cells were stained simultaneously for ANT (green), β subunit of F₁-ATPase (F₁- β , grey) and MitoTracker (red). Arrows indicate colocalization of ecto-ANT with ecto-F₁-ATPase on the plasma membrane.

3.5. Ecto-ANT activity counteracts the effect of ecto-F₁-ATPase activation by apoA-I on eADP level.

Under physiological conditions, cell surface ecto-F₁-ATPase works catalytically in a direction opposite to that described in functional mitochondria [2,26]. Indeed, apoA-I binding to ecto-F₁-ATPase stimulates the hydrolysis of extracellular ATP into ADP and phosphate whereas IF1, a natural inhibitor of F₁-ATPase, inhibits this ATPase activity [2].

Here, we used the minimal inhibitory sequence of IF1, namely IF1¹⁰⁻⁴⁷, to inhibit ecto-F₁-ATPase activity [17]. We first confirmed the ability of IF1¹⁰⁻⁴⁷ to inhibit ATPase activity of purified F₁-ATPase in a concentration dependent manner (Figure 5A). As expected, incubation of HepG2 cells with apoA-I increased eADP concentration [2], and inhibition of F₁-ATPase activity with IF1¹⁰⁻⁴⁷ blunted this effect (Figure 5B), which reflects the ability of apoA-I to stimulate ecto-F₁-ATPase hydrolytic activity [2,7,8].

Interestingly, pharmacological inhibition of ecto-ANT activity by cATR before apoA-I treatment induced a 2-fold increase of eADP concentration as compared to apoA-I alone (59.2 ± 7.0 nM versus 116.5 ± 21.5 nM, $p < 0.05$, Figure 5B), indicating that ecto-ANT activity dampened the effect of apoA-I on F₁-ATPase-mediated eADP production.

Extracellular ATP level remained unchanged by cATR treatment (Figure 5B), as observed in basal conditions (Figure 2A) and after addition of adenine nucleotides (Figure 3).

Figure 5

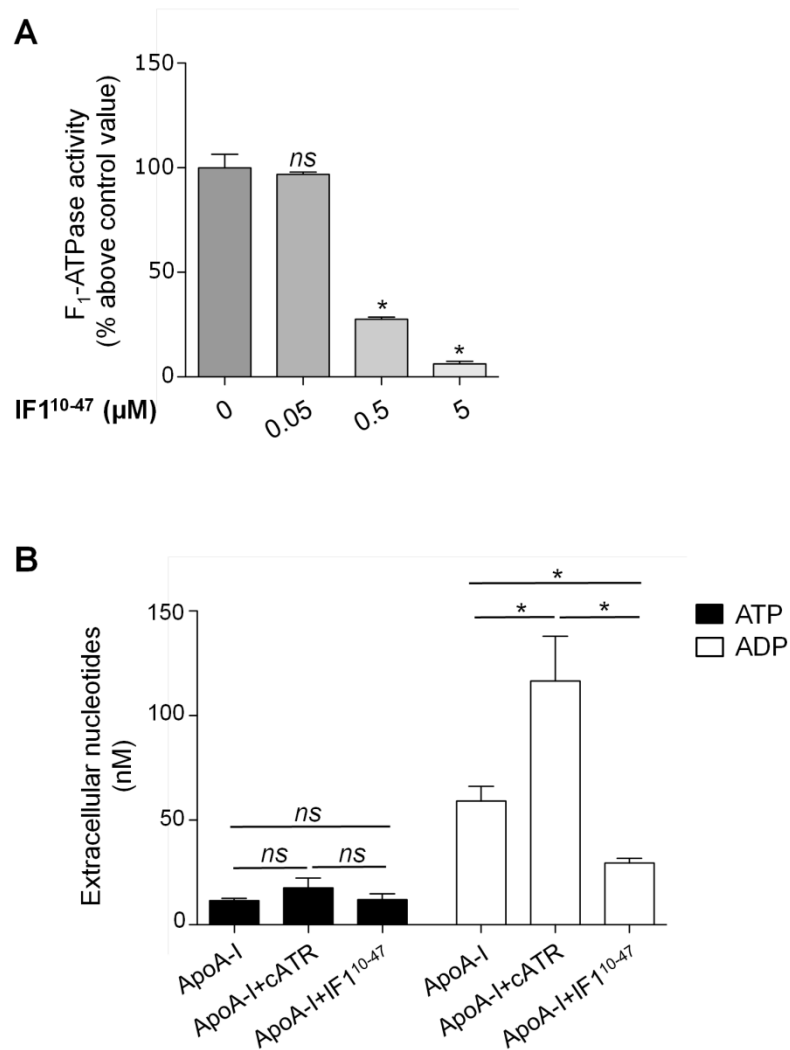


Figure 5. Ecto-ANT activity counteracts the effect of ecto-F₁-ATPase activation by apoA-I on eADP level. (A) Purified F₁-ATPase was incubated with increasing concentration of IF1¹⁰⁻⁴⁷ for measurement of F₁-ATPase activity. Values are expressed as the mean (SEM) of at least three independent experiments. Data are analyzed compared to control condition (without IF1¹⁰⁻⁴⁷) by Student's t-test (*p < 0.05, ns not significant).

(B) HepG2 cells were pre-incubated for 10 min with or without 5μM cATR or 5μM IF1¹⁰⁻⁴⁷ then incubated for 15 min with 10 μg/mL apoA-I. Concentrations of extracellular ATP (black bars) and ADP (white bars) were then measured by luciferin-luciferase assay as described in Materials and Methods. Values are expressed as the mean (SEM) of at least three independent experiments. Data are analyzed compared to control condition (without cATR) by Student's t-test (*p < 0.05, ns not significant).

3.6. Plasma membrane ANT regulates F₁-ATPase-mediated HDL endocytosis

F₁-ATPase-mediated HDL endocytosis pathway depend on ecto-F₁-ATPase activation by apoA-I and subsequent eADP production and P2Y receptors activation [2,8]. Given that ecto-ANT activity counteracted the effect of apoA-I on F₁-ATPase-mediated eADP production (Figure 5B), we wondered whether ecto-ANT activity could repress F₁-ATPase-mediated HDL endocytosis by hepatocytes.

As previously reported [2], in HepG2 cells, apoA-I significantly stimulated HDL endocytosis by 30 % compared to non-stimulated cells in a process that strictly depends on ecto-F₁-ATPase activity since pre incubation with IF1¹⁰⁻⁴⁷ abolished the effect of apoA-I on HDL endocytosis (Figure 6A, 6B).

In addition, we observed here that pharmacological inhibition of ecto-ANT activity by cATR further enhanced the effect of apoA-I on HDL endocytosis (64.7 ± 14.7 versus 30.0 ± 4.6 % for apoA-I alone, p < 0.05) (Figure 6A, 6B). These results were confirmed in IHH cell line (74.2 ± 15.7 versus 38.2 ± 10.4 % for apoA-I alone, p < 0.05) (Figure 7A, 7B). It is noteworthy that cATR alone had no significant effect on HDL endocytosis (Figure 6A, 6B, 7A, 7B).

A principal feature of ecto-F₁-ATPase-mediated endocytosis is its specificity toward HDL [2]. Accordingly, we show here that LDL endocytosis by HepG2 cells is neither stimulated by apoA-I treatment nor by ecto-ANT inhibition using cATR (Figure 6C, 6D).

Thus, in agreement with the activity of ecto-ANT in counteracting F₁-ATPase activity on eADP level (Figure 5), these results indicate that ecto-ANT activity negatively regulates F₁-ATPase-mediated HDL endocytosis.

Figure 6

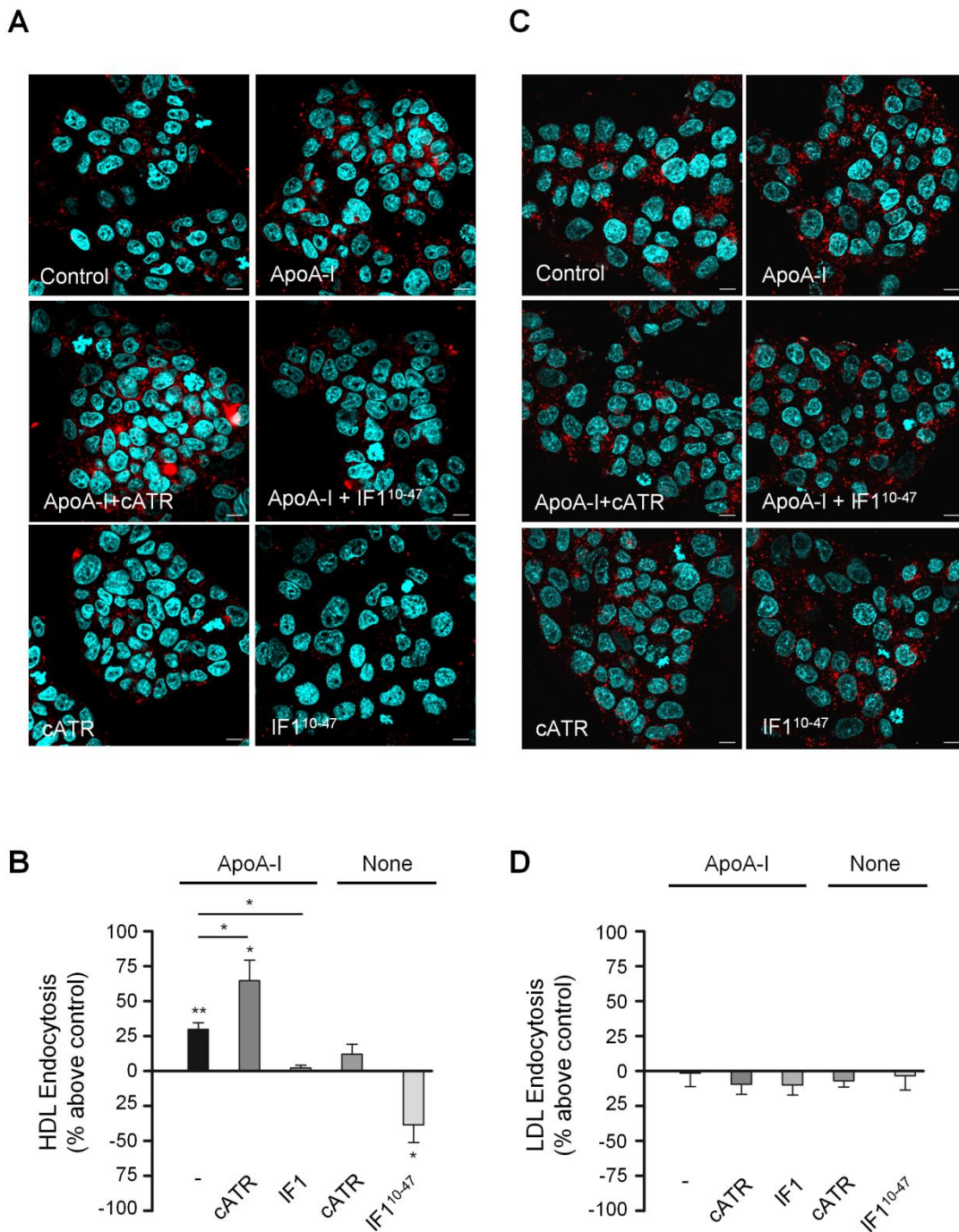
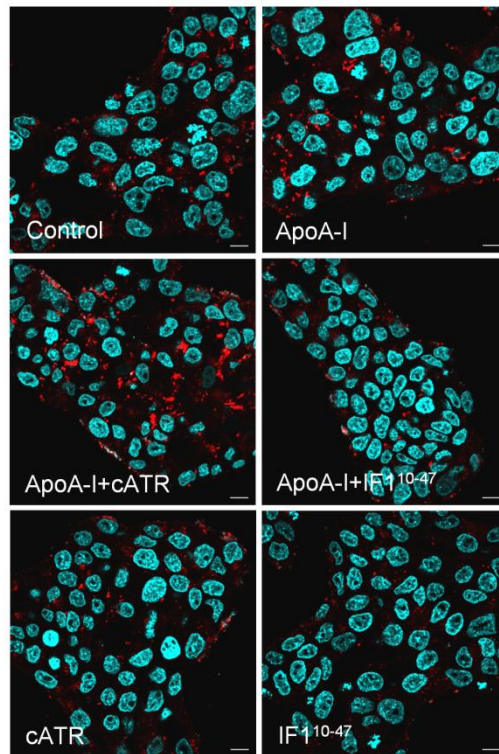


Figure 6. Pharmacological inhibition of ecto-ANT activity stimulates HDL endocytosis by Hepatocytes. HepG2 cells were pre-incubated for 10 min with 5 μ M IF1¹⁰⁻⁴⁷ or 5 μ M cATR then treated or not with 10 μ g / mL apoA-I for 15 min. Subsequently, 100 μ g / mL AlexaFluor568@-labeled HDL (**A**, **B**) or 100 μ g / mL AlexaFluor568@-labeled LDL (**C**, **D**) were added and cells were analyzed by fluorescence microscopy. (**A**, **C**) Representative confocal images. Scale bar, 10 μ M. (**B**) Quantification of AlexaFluor568@-labeled HDL endocytosis. (**D**) Quantification of AlexaFluor568@-labeled LDL endocytosis. Results are expressed as the mean (SEM) of at least three independent experiments and as a percentage above or below the control value (i.e. non-treated cells set at 0). Data with different superscript letters are significantly different by one-way Anova followed by the Bonferroni post hoc test (* p <0.05, ** p < 0. 01).

Figure 7

A



B

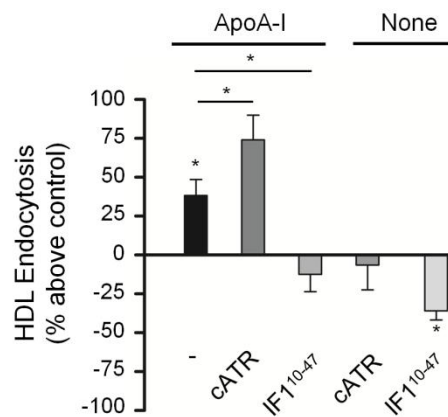


Figure 7. Pharmacological inhibition of ecto-ANT activity stimulates HDL endocytosis by IHH cells. IHH cells were pre-incubated for 10 min with 5 μ M IF1¹⁰⁻⁴⁷ or 5 μ M cATR and treated or not with 10 μ g / mL apoA-I for 15 min. Subsequently, 100 μ g / mL AlexaFluor568[®]-labeled HDL were added and cells were analyzed by fluorescence microscopy. **(A)** Representative confocal images. Scale bar, 10 μ M. **(B)** Quantification of AlexaFluor568[®]-labeled HDL endocytosis. Results are expressed as the mean (SEM) of at least three independent experiments and as a percentage above or below the control value (i.e. non-treated cells set at 0). Data are analyzed by one-way Anova followed by the Bonferroni post hoc test (* p <0.05, ** p < 0. 01).

4. Discussion.

The F_1 -ATPase-mediated HDL endocytosis pathway depends strictly on the production of eADP by ecto- F_1 -ATPase, a process that is stimulated by apoA-I, the quantitatively major protein of HDL [2,8]. More precisely, apoA-I binding to the ecto- F_1 -ATPase stimulates eATP hydrolysis into ADP. On hepatocytes, the eADP generated selectively activates the $P2Y_{13}$ purinergic receptor, resulting in cytoskeleton reorganization and subsequent clathrin-dependent endocytosis of HDL holoparticles through a low-affinity receptor that has yet to be identified [27,28]. This F_1 -ATPase-mediated HDL endocytosis pathway occurs independently of the SR-BI-mediated cholesteryl selective uptake [29].

Subunits of both the catalytic F_1 and the membrane-embedded F_o sector of mitochondrial ATP synthase have been found to be expressed at the plasma membrane [10,26], suggesting that mitochondrial F_oF_1 -ATP synthase and ecto- F_1 -ATPase, the name of which was chosen to reflect its strict ability to hydrolyze ATP into ADP without ATP synthesis activity [5], are structurally similar although naturally displaying an opposite enzymatic activity.

The strict dependence of HDL endocytosis on eADP level led us to study whether cell surface proteins other than ecto- F_1 -ATPase were able to regulate eADP level. We identified ecto-ANT as a cell surface protein whose activity regulates eADP and F_1 -ATPase-mediated HDL endocytosis on hepatocytes. It is noteworthy that pharmacological inhibition of ecto-ANT activity increased extracellular ADP levels when ecto- F_1 -ATPase activity was stimulated by apoA-I. Accordingly, F_1 -ATPase-mediated HDL endocytosis was significantly increased when ANT activity was pharmacologically inhibited.

So far, Adenine Nucleotide Translocase (ANT) has been considered as a mitochondrial inner membrane carrier which allows the electrogenic exchange of ADP and ATP between the matrix and the intermembrane space of mitochondria. Likewise, ANT activity brings ADP into mitochondria to support respiration while simultaneously supplying cytosolic energy-consuming processes with ATP. It is noteworthy that mitochondrial ANT is in the close vicinity of F_oF_1 -ATP synthase and the phosphate carrier (PiC) within structures called ATP synthasomes. This close relationship allows an optimal mechanism for the final steps of oxidative phosphorylation, in which the entry of the substrates ADP and Pi into mitochondria, the synthesis of ATP and the exit of ATP are localized and highly coordinated events [11–13]. However, mitochondrial ANT is the major inner membrane protein and is present in much higher amounts than ATP synthase to account for its relatively slow transport rates compared to the rate of ATP synthesis [21]. This suggests that mitochondrial inner membrane ANT is not strictly localized within ATP synthasomes [21].

There is evidence that ANT was not exclusively found in mitochondria but could be ectopically expressed at the plasma membrane. In particular, an elegant proteomic study has identified that ANT is associated with ecto- F_1 -ATPase complexes in plasma membrane preparation from rat liver [10]. Accordingly, we observed that ANT co-localized with the β subunit of F_1 -ATPase at the plasma membrane of hepatocytes, which suggests that ecto-ANT and ecto- F_1 -ATPase form an ATP synthasome-like structure. However, as reported in mitochondria [21], we observed that ecto-ANT was more expressed than ecto- F_1 -ATPase, as reflected by a distribution of ecto-ANT over the

entire cell surface, whereas ecto-F₁-ATPase was more restrictively distributed in a patch-like structure.

It is possible to hypothesize that ANT and FoF₁-ATP synthase are first addressed to the mitochondria from where they are addressed to the cell surface. Accordingly, ecto-F₁-ATPase contains subunits encoded by the mitochondrial genome (a and A6L) [10], supporting the hypothesis that, once assembled into the mitochondria, ATP synthase then reaches the cell surface. Considering that structures called Mitochondria Derived Vesicles (MDVs) have been recently characterized as specific mitochondrial cargo targeted to either peroxisomes or lysosomes [30], it is possible that ANT and ATP synthase are targeted from mitochondria to the plasma membrane through some distinct, still uncharacterized, MDVs.

Our study gives some insight into ecto-ANT activity in regulating the extracellular nucleotide level. When cells were cultured in medium alone or with an excess of ATP, two conditions for which eADP level was lower than that of eATP, ecto-ANT activity contributed to increased eADP. Conversely, after addition of an excess of ADP in culture medium or after activation of ecto-F₁-ATPase activity by apoA-I, i.e. in conditions for which eADP level was higher than that of eATP, ecto-ANT activity reduced eADP. Hence, it is likely that ecto-ANT exports cellular ADP when eADP/eATP < 1 and imports eADP when eADP/eATP > 1.

By analogy with the mitochondrial model in which ANT catalyzes the reversible exchange of ADP for ATP with 1:1 stoichiometry across the inner membrane [21], it would be expected that ecto-ANT activity would also regulate the level of eATP. However, none of the above-mentioned conditions had any effect on eATP level. This feature might result from a dynamic equilibrium between constitutive ATP release governed by vesicle secretion [31,32] and ATP-generating and consuming extracellular pathways involving proteins other than ecto-ANT such as ecto-nucleotidase, ecto-F₁-ATPase, ecto-nucleoside diphosphate kinases (NDPK), ecto-adenylate kinases (AK), ATP binding cassette (ABC) transporters and cell surface voltage-dependent anion channel (VDAC) [2,18,32–38]. These coexisting pathways controlling ATP release and interconversion are likely to maintain surrounding eATP at a steady state level. Pharmacological inhibition of ecto-ANT activity also had no effect on intracellular levels of ADP and ATP. However, given that intracellular concentrations of ADP and ATP are much higher than their extracellular concentrations, it was somewhat expected that ecto-ANT activity had no effect on their intracellular pool.

From a functional point of view, it is tempting to postulate that mitochondrial and ecto-ANT might share some common feature. Mitochondrial ADP/ATP exchange is controlled by the proton electrochemical gradient [39]. Since ADP has three, but ATP has four negative charges, the equimolar ADP³⁻/ATP⁴⁻ exchange mediated by ANT is driven by the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) generated by respiration [21,40]. Considering that the plasma membrane potential ranges from –40 mV to –80 mV (+ out, - in), an electrogenic ADP³⁻/ATP⁴⁻ exchange mediated by ecto-ANT would lead to the import of eADP into the cell and the export of iATP out of the cell. However, our data indicate that, under basal conditions of cell culture, ecto-ANT is likely to export eADP, suggesting that its activity is not strictly governed by $\Delta\psi_m$. At the physiological pH, it has been reported that ecto-F₁-ATPase activity is accompanied by a transient influx of H⁺ [26], which

might alter $\Delta\psi_m$ in the vicinity of ecto- F_1 -ATPase. It is possible to hypothesize that ecto-ANT activity might also depend on this local modulation of $\Delta\psi_m$ by ecto- F_1 -ATPase activity. However, further study will be required to elucidate the processes governing ADP/ATP exchange activity of ecto-ANT.

5. Conclusion.

This work provides a better understanding of extracellular adenine nucleotide metabolism and provides new insights into the regulation of F_1 -ATPase-mediated HDL endocytosis.

We found that ANT was expressed at the plasma membrane of hepatocytes and demonstrated that its activity controlled extracellular ADP level depending on the extracellular ADP/ATP ratio. Interestingly, plasma membrane ANT was closely localized with ecto- F_1 -ATPase and pharmacological inhibition of ANT activity increased extracellular ADP level when ecto- F_1 -ATPase activity was stimulated by apoA-I. Accordingly, F_1 -ATPase-mediated HDL endocytosis was significantly increased when ecto-ANT activity was pharmacologically inhibited, without affecting LDL endocytosis. Thus, inhibition of ecto-ANT activity *in vivo* should specifically stimulate hepatic HDL uptake by ecto- F_1 -ATPase pathway and thus stimulate “reverse cholesterol transport” (RCT). This opens up new strategies for the design of drugs inhibiting ecto-ANT activity to prevent and treat cardiovascular diseases. Carboxyatractyloside (CATR) and bongkreikic acid (BKA) are known to be powerful and highly selective ANT inhibitors but they are also able to induce mitochondrial dysfunction at molecular level and poisoning at physiological level [41]. Thus, further studies are needed to identify more specific and less toxic inhibitors targeting ecto-ANT.

Acknowledgments

We thank Prof. John E. Walker (MRC, Mitochondrial Biology Unit, Cambridge, U.K) for generously providing bovine heart mitochondrial F_1 -ATPase and Pierre Cordelier for IHH cells. We acknowledge the Cellular Imaging facility Ranguelil – I2MC / TRI platform. A pre-submission version of the manuscript was edited by English Experience Language Services, Goettingen, Germany.

Funding

This study was supported by the National Research Agency (#ANR-16-CE18-0014-01) and the Midi-Pyrénées Region. G.C. was a recipient of a PhD. fellowship from the Midi-Pyrénées Region (#13050102 - CK43001 allocation de recherche et de valorisation) and the French Society of Cardiology (Groupe de Réflexion en Recherche Cardio-Vasculaire, GRRC). T.D was supported by a post-doctoral fellowship from Foundation Lefoulon-Delalande – Institut de France.

BIBLIOGRAPHY

- [1] L.O. Martinez, B. Perret, R. Barbaras, F. Tercé, X. Collet, Hepatic and Renal HDL Receptors, in: High-Density Lipoproteins, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2008: pp. 307–338.
- [2] L.O. Martinez, S. Jacquet, J.P. Esteve, C. Rolland, E. Cabezon, E. Champagne, T. Pineau, V. Georgeaud, J.E. Walker, F. Terce, X. Collet, B. Perret, R. Barbaras, Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis, *Nature*, 421 (2003) 75–79.
- [3] E. Champagne, L.O. Martinez, X. Collet, R. Barbaras, Ecto-F₁F₀ ATP synthase/F₁ ATPase: metabolic and immunological functions, *Curr Opin Lipidol*, 17 (2006) 279–284.
- [4] L.O. Martinez, S. Najib, B. Perret, C. Cabou, L. Lichtenstein, Ecto-F₁-ATPase/P2Y pathways in metabolic and vascular functions of high density lipoproteins, *Atherosclerosis*, 238 (2015) 89–100.
- [5] P. Vantourout, C. Radojkovic, L. Lichtenstein, V. Pons, E. Champagne, L.O. Martinez, Ecto-F(1)-ATPase: A moonlighting protein complex and an unexpected apoA-I receptor, *World J Gastroenterol*, 16 (2010) 5925–5935.
- [6] L. Lichtenstein, N. Serhan, S. Espinosa-Delgado, A. Fabre, W. Annema, U.J.F. Tietge, B. Robaye, J.-M. Boyenaems, M. Laffargue, B. Perret, L.O. Martinez, Increased Atherosclerosis in P2Y13 / Apolipoprotein E Double-Knockout Mice: Contribution of P2Y13 to Reverse Cholesterol Transport, *Cardiovasc. Res.*, 106 (2015) 315–23.
- [7] C. Radojkovic, A. Genoux, V. Pons, G. Combes, H. De Jonge, E. Champagne, C. Rolland, B. Perret, X. Collet, F. Tercé, L.O. Martinez, Stimulation of cell surface F₁-ATPase activity by apolipoprotein A-I inhibits endothelial cell apoptosis and promotes proliferation, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 29 (2009) 1125–1130.
- [8] C. Cavelier, P.M. Ohnsorg, L. Rohrer, A. Von Eckardstein, The ??-chain of cell surface F₀F₁ ATPase modulates ApoA-I and HDL transcytosis through aortic endothelial cells, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 32 (2012) 131–139.
- [9] S.K. Yonally, R.A. Capaldi, The F(1)F(0) ATP synthase and mitochondrial respiratory chain complexes are present on the plasma membrane of an osteosarcoma cell line: An immunocytochemical study, *Mitochondrion*, (2006).
- [10] A.K. Rai, B. Spolaore, D.A. Harris, F. Dabbeni-Sala, G. Lippe, Ectopic F₀F₁ ATP synthase contains both nuclear and mitochondrially-encoded subunits, *J. Bioenerg. Biomembr*, 45 (2013) 569–79.
- [11] Y.H. Ko, M. Delannoy, J. Hullihen, W. Chiu, P.L. Pedersen, Mitochondrial ATP synthasome Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP, *J. Biol. Chem.*, 278 (2003) 12305–9.
- [12] C. Chen, Y. Ko, M. Delannoy, S.J. Ludtke, W. Chiu, P.L. Pedersen, Mitochondrial ATP synthasome: three-dimensional structure by electron microscopy of the ATP synthase in complex formation with carriers for Pi and ADP/ATP, *J. Biol. Chem.*, 279 (2004) 31761–8.

- [13] I. Wittig, H. Schägger, Structural organization of mitochondrial ATP synthase, *Biochim. Biophys. Acta*, 1777 (2008) 592–8.
- [14] T. Diab, N. Hanoun, C. Bureau, C. Christol, L. Buscail, P. Cordelier, J. Torrisani, The Role of the 3' Untranslated Region in the Post-Transcriptional Regulation of KLF6 Gene Expression in Hepatocellular Carcinoma, *Cancers (Basel)*, 6 (2013) 28–41.
- [15] R.J. Havel, H.A. Eder, J.R. Bragdon, The distribution and chemical composition of ultracentrifugally separated lipoproteins in human serum, *J Clin Invest*, 34 (1955) 1345–1353.
- [16] L.O. Martinez, V. Georgeaud, C. Rolland, X. Collet, F. Tercé, B. Perret, R. Barbaras, Characterization of Two High-Density Lipoprotein Binding Sites on Porcine Hepatocyte Plasma Membranes: Contribution of Scavenger Receptor Class B Type I (SR-BI) to the Low-Affinity Component, *Biochemistry*, 39 (2000) 1076–1082.
- [17] M.J. van Raaij, G.L. Orriss, M.G. Montgomery, M.J. Runswick, I.M. Fearnley, J.M. Skehel, J.E. Walker, The ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria: the minimal inhibitory sequence, *Biochemistry*, 35 (1996) 15618–25.
- [18] A.C. Fabre, P. Vantourout, E. Champagne, F. Terce, C. Rolland, B. Perret, X. Collet, R. Barbaras, L.O. Martinez, Cell surface adenylate kinase activity regulates the F(1)-ATPase/P2Y (13)-mediated HDL endocytosis pathway on human hepatocytes, *Cell Mol Life Sci*, 63 (2006) 2829–2837.
- [19] J.P. Abrahams, A.G. Leslie, R. Lutter, J.E. Walker, Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria, *Nature*, 370 (1994) 621–628.
- [20] V. Pons, N. Serhan, S. Gayral, C. Malaval, M. Nauze, N. Malet, M. Laffargue, C. Galés, L.O. Martinez, Role of the ubiquitin-proteasome system in the regulation of P2Y₁₃ receptor expression: impact on hepatic HDL uptake, *Cell. Mol. Life Sci.*, 71 (2014) 1775–88.
- [21] E.R.S. Kunji, A. Aleksandrova, M.S. King, H. Majd, V.L. Ashton, E. Cerson, R. Springett, M. Kibalchenko, S. Tavoulari, P.G. Crichton, J.J. Ruprecht, The transport mechanism of the mitochondrial ADP/ATP carrier, *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, 1863 (2016) 2379–2393.
- [22] M. Yang, L. Yu, R. Gupta, Analysis of changes in energy and redox states in HepG2 hepatoma and C6 glioma cells upon exposure to cadmium, *Toxicology*, 201 (2004) 105–113.
- [23] T.J. Bae, M.S. Kim, J.W. Kim, B.W. Kim, H.J. Choo, J.W. Lee, K.B. Kim, C.S. Lee, J.H. Kim, S.Y. Chang, C.Y. Kang, S.W. Lee, Y.G. Ko, Lipid raft proteome reveals ATP synthase complex in the cell surface, *Proteomics*, 4 (2004) 3536–3548.
- [24] B.W. Kim, H.J. Choo, J.W. Lee, J.H. Kim, Y.G. Ko, Extracellular ATP is generated by ATP synthase complex in adipocyte lipid rafts, *Exp Mol Med*, 36 (2004) 476–485.
- [25] P. Vantourout, L.O. Martinez, A. Fabre, X. Collet, E. Champagne, Ecto-F₁-ATPase and MHC-class I close association on cell membranes, *Mol Immunol*, 45 (2008) 485–492.
- [26] R. Mangiullo, A. Gnoni, A. Leone, G. V Gnoni, S. Papa, F. Zanotti, Structural and functional characterization of F(o)F(1)-ATP synthase on the extracellular surface of rat hepatocytes, *Biochim Biophys Acta*, 1777 (2008) 1326–1335.

[27] S. Jacquet, C. Malaval, L.O. Martinez, K. Sak, C. Rolland, C. Perez, M. Nauze, E. Champagne, F. Terce, C. Gachet, B. Perret, X. Collet, J.M. Boeynaems, R. Barbaras, The nucleotide receptor P2Y13 is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis, *Cell Mol Life Sci*, 62 (2005) 2508–2515.

[28] C. Malaval, M. Laffargue, R. Barbaras, C. Rolland, C. Peres, E. Champagne, B. Perret, F. Tercé, X. Collet, L.O. Martinez, RhoA/ROCK I signalling downstream of the P2Y13 ADP-receptor controls HDL endocytosis in human hepatocytes, *Cell Signal*, 21 (2009) 120–127.

[29] A.C.C. Fabre, C. Malaval, A. Ben Addi, C. Verdier, V. Pons, N. Serhan, L. Lichtenstein, G. Combes, T. Huby, F. Briand, X. Collet, N. Nijstad, U.J.F.J. Tietge, B. Robaye, B. Perret, J.-M.M. Boeynaems, L.O. Martinez, P2Y13 receptor is critical for reverse cholesterol transport, *Hepatology*, 52 (2010) 1477–1483.

[30] A. Sugiura, G.-L. McLelland, E.A. Fon, H.M. McBride, A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles, *EMBO J.*, 33 (2014) 2142–2156.

[31] E.R. Lazarowski, R.C. Boucher, T.K. Harden, Mechanisms of release of nucleotides and integration of their action as P2X- and P2Y-receptor activating molecules, *Mol Pharmacol*, 64 (2003) 785–795.

[32] E.R. Lazarowski, R.C. Boucher, T.K. Harden, Constitutive release of ATP and evidence for major contribution of ecto-nucleotide pyrophosphatase and nucleoside diphosphokinase to extracellular nucleotide concentrations, *J Biol Chem*, 275 (2000) 31061–31068.

[33] G.G. Yegutkin, T. Henttinen, S.S. Samburski, J. Spsychala, S. Jalkanen, The evidence for two opposite, ATP-generating and ATP-consuming, extracellular pathways on endothelial and lymphoid cells, *Biochem J*, 367 (2002) 121–128.

[34] E.E. Quillen, G.C. Haslam, H.S. Samra, D. Amani-Taleshi, J.A. Knight, D.E. Wyatt, S.C. Bishop, K.K. Colvert, M.L. Richter, P.A. Kitos, Ectoadenylate kinase and plasma membrane ATP synthase activities of human vascular endothelial cells, *J Biol Chem*, 281 (2006) 20728–20737.

[35] H.E. Burrell, B. Wlodarski, B.J. Foster, K.A. Buckley, G.R. Sharpe, J.M. Quayle, A.W. Simpson, J.A. Gallagher, Human keratinocytes release ATP and utilize three mechanisms for nucleotide interconversion at the cell surface, *J Biol Chem*, 280 (2005) 29667–29676.

[36] G.G. Yegutkin, Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade, *Biochim Biophys Acta*, (2008).

[37] R.M. Roman, Y. Wang, S.D. Lidofsky, A.P. Feranchak, N. Lomri, B.F. Scharschmidt, J.G. Fitz, Hepatocellular ATP-binding cassette protein expression enhances ATP release and autocrine regulation of cell volume, *J Biol Chem*, 272 (1997) 21970–21976.

[38] S.F. Okada, W.K. O'Neal, P. Huang, R.A. Nicholas, L.E. Ostrowski, W.J. Craigen, E.R. Lazarowski, R.C. Boucher, Voltage-dependent anion channel-1 (VDAC-1) contributes to ATP release and cell volume regulation in murine cells, *J Gen Physiol*, 124 (2004) 513–526.

[39] E. Pfaff, M. Klingenberg, Adenine Nucleotide Translocation of Mitochondria 1 Specificity and Control, *Eur. J. Biochem.*, 6 (1968) 66–79.

[40] M. Klingenberg, H. Rottenberg, Relation between the gradient of the ATP/ADP ratio and the membrane potential across the mitochondrial membrane, *Eur. J. Biochem.*, 73 (1977) 125–30.

[41] D.K. Obatomi, P.H. Bach, Biochemistry and toxicology of the diterpenoid glycoside atractyloside, *Food Chem. Toxicol.*, 36 (1998) 335–346.

3. Perspectives-Conclusions

3.1 Caractérisation fonctionnelle de l'ANT de surface

Dans cette étude, nous avons identifié la présence de l'ANT à la surface des cellules HepG₂ et caractérisé son activité. Cette translocase a également été identifiée à la membrane plasmique de divers types cellulaires notamment les cellules cancéreuses MCF-7 et HT-1080 (Radichev et al. 2009), ou les neurones primaires (Loers et al. 2012). Ces résultats semblent indiquer que cette expression ectopique pourrait être ubiquitaire. Dans ce contexte, nous avons évalué l'expression de surface de l'ANT sur un autre type cellulaire, les cellules HeLa, et observé que l'ANT était également présente à la surface de ces cellules (**Figure S1**).

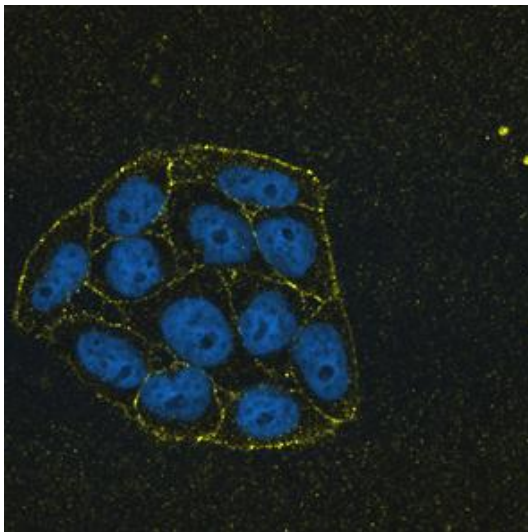


Figure Supplémentaire 1 : Expression de l'ANT à la surface des cellules HeLa. Cellules HeLa non perméabilisées marquées avec un anticorps anti-ANT (jaune). L'expression de surface de l'ANT a été analysée par microscopie confocale.

L'activité nucléotide translocase de l'ecto-ANT est dépendante de la concentration extracellulaire en ADP et ATP (eADP et eATP). En conditions basales, dans un milieu supplémenté avec 10% de sérum (ratio eADP/eATP ~ 1), l'ecto-ANT tend à faire sortir de l'ADP dans le milieu extracellulaire (**Figure 2**). De façon intéressante, nous avons observé que l'incubation des cellules HepG₂ dans un milieu sans sérum pendant 1h induit une augmentation de la concentration d'ADP extracellulaire, qui devient alors supérieure à celle de l'ATP (ratio eADP/eATP > 1, **Figure S2A**). Ce phénomène a déjà été caractérisé sur les hépatocytes mais son mécanisme est inconnu (Chatterjee & Sparks 2014). Dans

cette condition, pour laquelle le ratio eADP/eATP > 1, l'inhibition de l'activité de l'ANT se traduit par une augmentation de la concentration en ADP extracellulaire (**Figure S2A**), suggérant que l'ANT agirait en faisant entrer de l'ADP extracellulaire dans la cellule. Ce fonctionnement de l'ANT, dépendant des taux extracellulaires d'ADP et d'ATP a été confirmé en ajoutant en excès (1µM) de l'ADP ou de l'ATP dans le milieu extracellulaire (**Figure 3**). Des résultats similaires à ceux obtenus avec l'ajout de 1 µM d'ADP ont par ailleurs été observés en ajoutant 10µM d'ADP dans le milieu extracellulaire (**Figure S2B**).

L'ensemble de ces résultats indique donc que l'ANT de surface est capable de transporter de l'ADP dans les deux sens (import ou export), de façon dépendante du gradient de concentration en ATP et ADP extracellulaires.

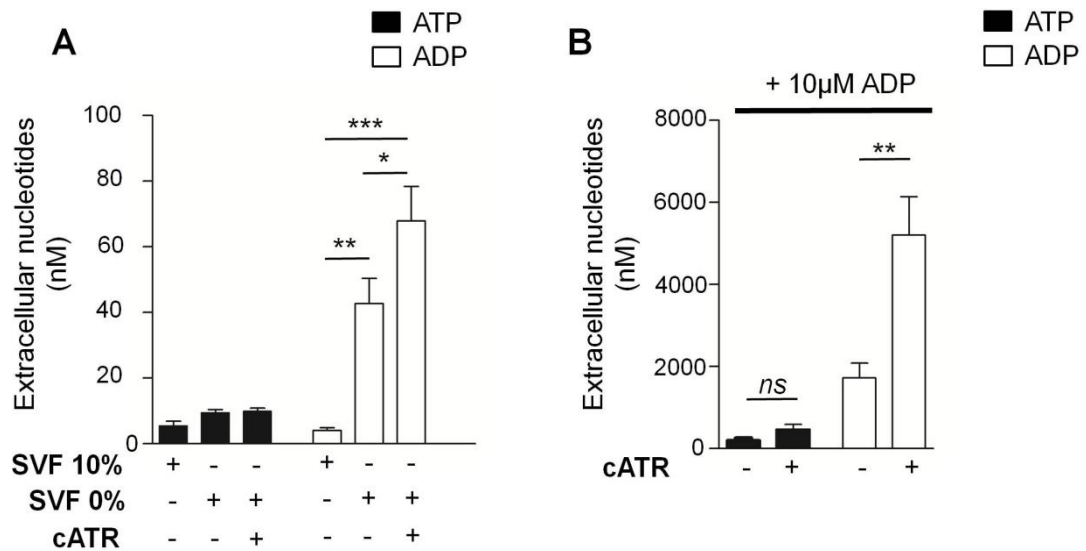


Figure Supplémentaire 2 : L'ecto-ANT régule les taux d'ADP extracellulaire de façon dépendante de la concentration en nucléotides extracellulaires. (A) Les cellules HepG₂ ont été incubées dans un milieu de croissance supplémenté avec 10% de sérum ou dans un milieu sans sérum pendant 1h. Le cATR (5µM) a été ajouté pendant les 20 dernières minutes. **(B)** Les cellules HepG₂ ont été préincubées 10 minutes avec ou sans cATR puis 10µM d'ADP ont été ajoutés pendant 20 minutes. Les concentrations en ATP et ADP ont été mesurées comme décrit dans la partie « matériels et méthodes ». Les quantifications indiquées représentent la moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes.*p ≤ 0,05 ; ** p ≤ 0,005, *** p ≤ 0,001.

Cependant, à la membrane interne mitochondriale, le fonctionnement de l'ANT est décrit comme étant dépendant du potentiel membranaire de la membrane interne de la mitochondrie ($\Delta\psi_m$) (KLINGENBERG & ROTTENBERG 1977; Kunji et al. 2016). Dans ce contexte, des expériences complémentaires sont nécessaires afin de poursuivre l'étude du mécanisme de fonctionnement de l'ANT à la surface des cellules. Afin d'évaluer la part d'implication du potentiel membranaire de la membrane plasmique sur le fonctionnement de cette ecto-translocase, des mesures des taux de nucléotides extracellulaires, en présence ou non de cATR, pourraient être effectuées sur des cellules préalablement incubées dans un milieu acide, neutre ou basique (Mangiullo et al. 2008).

L'ajout d'un excès d'ADP ou d'ATP ou encore le traitement des cellules à l'apoA-I dans ces différentes conditions pourraient ainsi fournir des informations sur les contributions respectives des concentrations en nucléotides extracellulaires (eADP et eATP) et du potentiel membranaire de la membrane plasmique, dans le mécanisme de fonctionnement de l'ecto-ANT.

Finalement, nous avons démontré que l'ANT et la F_1 -ATPase sont étroitement localisées à la membrane plasmique des cellules HepG₂. A la surface cellulaire, l'ecto-ANT importe l'ADP généré par l'ecto- F_1 -ATPase, régulant ainsi négativement l'endocytose des HDL. Ces deux protéines sont également étroitement localisées au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (Chevrollier et al. 2011; Chen et al. 2004; Ko et al. 2003). Enfin, l'ANT peut interagir avec divers partenaires à la surface des cellules notamment les métalloprotéases (Radichev et al. 2009; Loers et al. 2012). Ces données suggèrent que la régulation de la voie ecto- F_1 -ATPase par l'activité de l'ecto-ANT pourrait être dépendante des interactions entre l'ecto-ANT et l'ecto- F_1 -ATPase. Cette hypothèse pourrait être étudiée par des méthodes biochimiques (Radichev et al. 2009) notamment des expériences de biotinylation des protéines de surface couplées à une technique d'immunoprécipitation.

3.2 Isoformes de l'ANT présentes à la membrane plasmique

Il existe quatre isoformes de l'ANT chez l'homme. Il est décrit que l'isoforme 1 est majoritairement exprimée dans les tissus ayant une activité oxydative tels que le muscle et le cœur alors l'ANT2 est exprimée dans les tissus possédant une activité régénérative tels que le foie. Enfin, l'ANT3 est exprimée de manière ubiquitaire et l'ANT4 est essentiellement présente au niveau des testicules. L'expression de ces isoformes semble être régulée en fonction de l'état prolifératif et du statut métabolique des cellules. D'autre part, l'ANT2 a été proposée comme pouvant avoir une activité d'échange ATP/ADP inverse à celui de l'ANT1, en participant à l'entrée d'ATP dans la mitochondrie, couplée à une sortie d'ADP (Brenner et al. 2011; Chevrollier et al. 2011). Ce processus favoriserait la survie cellulaire. Dans ce contexte, nous avons évalué le profil d'expression des différentes isoformes de l'ANT dans les cellules HepG₂ par RT-PCR. Les isoformes 2 et 3 de l'ANT sont majoritairement exprimées par les cellules HepG₂, mais l'ANT1 est également présente (**Figure S3**). Ces résultats préliminaires confirment le profil d'expression de l'ANT déjà mis en évidence dans les cellules HepG₂ en prolifération (Gavaldà-Navarro et al. 2016).



Figure supplémentaire 3 : RT-PCR effectuée sur des cellules HepG₂ et montrant l'expression des différentes isoformes de l'ANT.

Nous pourrions maintenant envisager d'évaluer les isoformes présentes à la surface des hépatocytes par des expériences de biotinylation de surface ou par des techniques de microscopie, à l'aide d'anticorps sélectifs. La présence à la surface de différentes isoformes de l'ANT pourrait ainsi expliquer l'activité d'import ou d'export d'ADP de l'ecto-ANT (**Figure 3**).

3.3 Mécanisme d'adressage de l'ANT à la membrane plasmique

L'ANT et la F_0F_1 -ATP-synthase sont étroitement localisées au niveau de la membrane interne de la mitochondrie (Ko et al. 2003; Chen et al. 2004). Nos données indiquent que cela semble être aussi le cas à la surface cellulaire, où leur fonctionnement est par ailleurs interdépendant. Cependant, le mécanisme d'adressage à la membrane plasmique de ces deux acteurs n'est, à ce jour, pas caractérisé.

Le processus d'adressage de l'ecto- F_1 -ATPase à la membrane plasmique impliquerait l'assemblage dans la mitochondrie des différentes sous-unités qui la constitue, puis un adressage à la membrane plasmique *via* un mécanisme dépendant de l'autophagie (**étude n°2**). De ce fait, l'expression de l'ANT à la membrane plasmique pourrait également être évaluée après induction de l'autophagie par carence nutritionnelle ou par traitement à la rapamycine. Dans le cas où l'expression de l'ecto-ANT se retrouverait augmentée après induction de l'autophagie, nous pourrions proposer un modèle dans lequel l'ecto- F_1 -ATPase et sa protéine régulatrice, l'ecto-ANT, seraient adressées ensemble et selon un mécanisme similaire, de la mitochondrie à la membrane plasmique.

Une hypothèse alternative serait que l'ANT soit adressée à la membrane plasmique par des mécanismes différents de ceux impliqués dans l'adressage de l'ecto- F_1 -ATPase. En accord avec cette hypothèse, le transporteur de la membrane interne mitochondriale ABC-me (*ATP binding cassette mitochondrial erythroid*) a été décrit comme étant soit directement adressé à la mitochondrie, ou comme pouvant être transloquer au niveau du réticulum endoplasmique (Miyazaki et al. 2005). L'adressage direct de ce transporteur au niveau mitochondrial nécessiterait la présence d'un motif de 135 acides aminés hydrophiles sur la partie N-terminal de la protéine. Ce dernier motif empêcherait la translocation dans le RE du transporteur ABC-me lors de sa traduction, et favoriserait donc l'adressage au niveau mitochondrial.

Un mécanisme similaire pourrait contribuer à l'adressage de l'ANT soit à la mitochondrie soit à la surface des cellules *via* un passage par le réticulum endoplasmique. Afin d'étudier l'implication potentielle de cette voie dans l'adressage de l'ANT à la membrane plasmique, l'expression de surface de cette

dernière pourrait être évaluée après le traitement des cellules avec la Brefeldine A, un inhibiteur de la voie canonique d'adressage RE-Golgi. Des protéines mutées comme la forme dominante négative de Sar1, une protéine impliquée dans le transport vésiculaire entre le RE et l'appareil de Golgi, pourraient également être utilisées afin de bloquer la voie d'adressage canonique.

3.4 Interdépendance des différents acteurs impliqués dans l'endocytose des HDL dépendante de la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃

Une étude de protéomique récente a identifié l'ANT dans des préparations de membrane plasmique de foies de rats (Rai et al. 2013). Il serait intéressant de confirmer la présence de cette ecto-ANT à la surface d'hépatocytes primaires humains puis de confirmer son mode de fonctionnement et son rôle dans le contrôle de l'endocytose des HDL. Outre l'ANT, l'adénylate kinase est également présente à la surface des cellules HepG₂ et des hépatocytes primaires humains. Cette enzyme régule négativement l'endocytose des HDL en consommant l'ADP produit par l'ecto-F₁-ATPase ($2\text{ADP} \leftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$) (Fabre et al. 2006). Dans ce contexte, il semble intéressant d'étudier la relation entre ces différents acteurs, et leur contribution respective dans l'endocytose des HDL dépendante de la voie ecto-F₁-ATPase. Pour cela, des cellules HepG₂ ou des hépatocytes primaires pourraient être traités avec l'ap5A (Diadénosine pentophosphate, inhibiteur de l'adénylate kinase), du cATR ou avec la combinaison des deux inhibiteurs. Les taux nucléotidiques extracellulaires ainsi que l'endocytose des HDL pourraient ensuite être évalués en condition contrôle ou en condition de stimulation par l'apoA-I. En tenant compte des résultats obtenus dans cette étude, et des résultats obtenus dans l'étude sur l'ecto-adénylate kinase (Fabre et al. 2006), il apparaît envisageable que l'inhibition simultanée de l'ecto-adénylate kinase et de l'ecto-ANT puisse stimuler l'endocytose des HDL de façon plus importante que lors de l'inhibition d'un seul partenaire. Ce type d'étude permettra de mieux identifier le rôle des régulateurs du métabolisme nucléotidique extracellulaire et de connaître la contribution de chacun dans le contrôle de l'endocytose des HDL dépendante de la voie ecto-F₁-ATPase.

3.5 Relevance physiologique de l'activité de l'ecto-ANT

La contribution de l'ecto-ANT dans l'endocytose hépatique des HDL pourrait être confirmée sur un modèle *ex vivo*. Pour cela, des foies isolés de souris sauvage C57BL/6 pourraient être perfusés avec une solution contenant des HDL marquées à l'iode 125 (^{125}I -HDL). Au terme de cette étape de perfusion, les HDL endocytées par le foie sont évaluées par comptage de la radioactivité (Martinez et al. 2003; Fabre et al. 2010). Cependant, le carboxyatractiloside, un composé naturel présent dans l'espèce végétale *Xanthium strumarium* est hautement toxique pour les animaux et l'homme, entraînant des lésions hépatiques et rénales (Botha et al. 2014; Obatomi & Bach 1998). De ce fait, une approche d'inhibition de l'ecto-ANT par injection d'anticorps dirigés contre l'ANT et bloquant son activité devrait être envisagée (Loers et al. 2012). Des approches *in vivo* pourraient également être entreprises. Notamment, il serait intéressant d'évaluer sur des souris sauvages (C57BL/6) l'effet d'une inhibition de l'ANT, par traitement avec des anticorps anti-ANT, sur les concentrations en cholestérol et triglycérides plasmatiques et hépatiques et les sécrétions de lipides biliaires (cholestérol, acides biliaires, phospholipides).

4. Conclusion

En conclusion, ce travail a permis d'identifier la présence de l'adénine nucléotide translocase à la membrane plasmique (ecto-ANT) de la lignée d'hépatome humain HepG₂, et de caractériser pour la première fois son rôle à la surface de ces cellules.

D'une part, nous avons montré que l'ecto-ANT est impliquée dans la régulation des taux de nucléotides adényliques ADP et ATP extracellulaires. D'autre part, son fonctionnement est dépendant de ces taux en nucléotides dans le milieu extracellulaire (**Figure 7A, 7B**).

Nous avons également démontré que l'ecto-ANT est impliquée dans la régulation de l'ADP généré suite à l'activation de l'ecto-F₁-ATPase par l'apoA-I, régulant ainsi négativement l'endocytose dépendante de la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃ (**Figure 7C**). Ce travail permet une meilleure compréhension du métabolisme nucléotidique extracellulaire, et souligne le rôle de l'ecto-ANT dans l'endocytose des HDL dépendante de la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃.

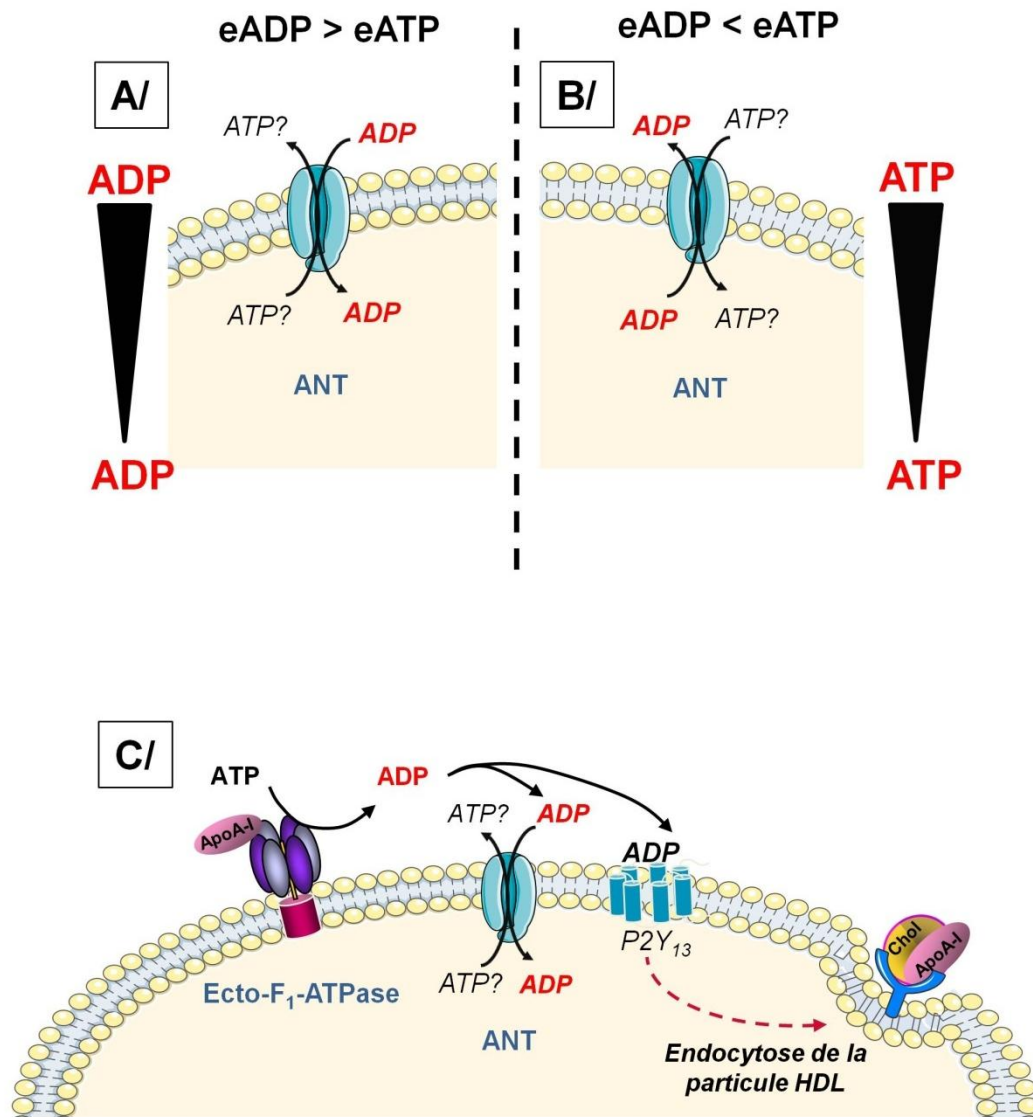


Figure 8. Ecto-ANT : Mécanisme d'action proposé et implication dans l'endocytose des HDL dépendante de la voie ecto-F₁-ATPase / P2Y₁₃. (A) Lorsque le taux d'ADP est supérieur au taux d'ATP extracellulaire (ratio eADP/eATP > 1), l'ecto-ANT importe de l'ADP extracellulaire dans la cellule. (B) Lorsque le ratio eADP /eATP <1, l'ecto-ANT exporte de l'ADP dans le milieu extracellulaire (C) L'ecto-ANT et l'ecto-F₁-ATPase sont étroitement localisées à la membrane plasmique des cellules HepG₂. Une partie de l'ADP extracellulaire produit en réponse à la stimulation de l'ecto-F₁-ATPase par l'apoA-I est importée dans la cellule par l'ecto-ANT, ce qui régule négativement l'endocytose des HDL dépendante de la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃

5. Matériels et méthodes supplémentaires

5.1 Culture cellulaire

La lignée cellulaire humaine HeLa (#CCL₂[™]) dérivée d'un cancer du col de l'utérus, provient de l'*American Type Culture Collection*.

5.2 Polymerase chain reaction (PCR)

L'ARN total des cellules HepG₂ a été extrait en Trizol (Invitrogen) après 2 lavages des cellules en PBS froid. Une séparation de phase en chloroforme suivie de la précipitation des ARN en isopropanol ont ensuite été effectuées. La concentration en ARN total est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre et 1µg d'ARN total a été utilisé pour effectuer la transcription reverse en ADN complémentaire (ADNc) avec des hexamères aléatoires. Les amorces utilisées pour la RT-PCR, sont indiquées dans le tableau suivant :

Primer	séquence sens	séquence antisens
ANT1	CCTGCCTCCCCAGCTAAAAA	CCATCAAAGCACTTGCCCAC
ANT2	ATGCCAGCAAGCAGATCACT	GGCCTCGGAATTCCCTTTCA
ANT3	GGGCATCATCATCTACCGGG	CGACTTGGCTCCTACAAGCA

Tableau I : Amorces utilisées

L'amplification par PCR a été réalisée sur des quantités égales d'ADNc pour 35 cycles, en utilisant les paramètres suivants : étape de dénaturation initiale, 2min à 95°C; étapes d'amplification, de 30s à 58°C et 30s à 72°C, et l'étape finale d'élongation, 30min à 72°C. Les produits d'amplification ont été séparés sur gel d'agarose à 2% et colorés au Midori green (Dutscher 523268), les tailles des fragments ont été déterminées par comparaison avec des étalons d'ADN connus.

Etude II :
Implication de l'autophagie dans le
mécanisme d'adressage de la F₁-ATPase à la
membrane plasmique

1. Contexte

Les études épidémiologiques ont démontré qu'un taux élevé de HDL-C est un facteur protecteur dans les pathologies cardiovasculaires (Mozaffarian et al. 2016). L'effet protecteur des HDL est principalement attribué à leur rôle central dans le "Transport Retour du Cholestérol" (TRC), des cellules périphériques vers le foie, où il est éliminé au niveau des voies biliaires (Schwartz et al. 2009). Cependant, des essais cliniques évaluant des molécules permettant une élévation importante du cholestérol contenu dans les particules HDL (HDL-C), n'ont à ce jour pas montré d'efficacité sur l'incidence des événements cardio-vasculaires (Schwartz et al. 2009; Group 2014). De plus, des études de randomisation mendélienne de variantes génétiques de HDL-C n'établissent pas de lien causal entre une concentration abaissée de HDL-C et le risque cardio-vasculaire (Voight et al. 2012; Strong & Rader 2010). Ces résultats soulignent le fait qu'il est maintenant nécessaire de mieux connaître les mécanismes moléculaires qui régulent la fonctionnalité des particules de HDL, afin de proposer des approches thérapeutiques qui amélioreraient leurs propriétés protectrices, plutôt que de simplement agir sur le taux circulant de HDL-C.

Dans ce contexte, notre équipe a identifié en surface des cellules hépatiques la présence d'un complexe enzymatique, très proche de l'ATP synthase mitochondriale, comme étant un récepteur de haute affinité pour l'apoA-I (protéine majoritaire des HDL) (Martinez et al. 2003). Cette ATP synthase de surface, également appelée ecto-F₁-ATPase, joue un rôle clé dans les effets cardioprotecteurs des HDL (Martinez et al. 2015). Au niveau hépatique, la liaison de l'apoA-I stimule l'activité ATPasique de l'enzyme, entraînant la production d'ADP extracellulaire puis l'activation spécifique du récepteur nucléotidique P2Y₁₃, aboutissant *in fine* à l'endocytose des HDL (Malaval et al. 2009; Fabre et al. 2010).

L'ecto-F₁-ATPase a été également identifiée à la surface de divers types cellulaires où elle est impliquée dans une variété de processus physiologiques et physiopathologiques. Ainsi, à la surface des cellules endothéliales, elle est impliquée dans la survie cellulaire médiée par l'apoA-I. Sur les adipocytes, cette expression ectopique est associée à la captation et au recyclage de l'apoA-I alors que sur les cellules tumorales, l'ecto-F₁-ATPase permet la présentation des

phosphoantigènes pour la reconnaissance des cellules par les lymphocytes T $\delta\gamma$ (Martinez et al. 2003; Howard et al. 2010; Vantourout et al. 2008; Radojkovic et al. 2009). Malgré des études de plus en plus nombreuses identifiant cette présence ectopique de la F_1 -ATPase et les divers rôles qui lui sont attribués, à l'heure actuelle, on ignore encore le mécanisme d'adressage de ce complexe à la membrane plasmique.

L'hypothèse d'un adressage canonique impliquant le réticulum endoplasmique et l'appareil de golgi semble peu probable compte tenu de la présence de l'ensemble des sous-unités de la F_0F_1 -ATP-synthase au niveau de la membrane plasmique d'extrait de foies de rats (Rai et al. 2013). Or, certaines sous-unités sont codées par le génome nucléaire, et d'autres par le génome mitochondrial, suggérant un mécanisme de pré-assemblage de la F_0F_1 -ATP-synthase au niveau de la mitochondrie puis une translocation du complexe en entier à la membrane plasmique.

Notre hypothèse est l'implication de l'autophagie dans la régulation de l'expression membranaire de l'ecto- F_1 -ATPase.

L'autophagie est un processus catabolique par lequel la cellule répond à un stress notamment un stress énergétique ou nutritionnel, en adressant des composants et des organelles cytoplasmiques au lysosome pour dégradation et recyclage. De façon intrigante, outre son rôle de dégradation, l'autophagie est impliquée dans la régulation de la sécrétion et de l'expression membranaire de protéines solubles et transmembranaires ne pouvant pas emprunter la voie de sécrétion canonique (Ponpuak et al. 2015). Ce mécanisme de transport non conventionnel a été validé pour des protéines telles que la cytokine pro-inflammatoire IL-1 β (Dupont et al. 2011), et la protéine CFTR (pour *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) (Gee et al. 2011). Dans cette partie de mes travaux de thèse, je me suis intéressé à l'étude du rôle de l'autophagie dans la régulation de l'expression de la F_1 -ATPase à la surface cellulaire et par conséquent dans l'internalisation hépatique des HDL dépendante de la voie ecto- F_1 -ATPase.

2. Matériels et méthodes

2.1 Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires humaines HeLa (#CCL₂TM) dérivées d'un cancer du col de l'utérus, et HepG₂ (#HB-8065TM) dérivées d'un hépatoblastome proviennent de l'*American Type Culture Collection*. Elles ont été cultivées en boîtes ou flasques dans du milieu complet composé de DMEM contenant 4,5g/l de glucose, L-alanine, L-glutamine, sodium pyruvate, et sodium bicarbonate (D0822, sigma), supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (10270-098, Life technologies) et 1% pénicilline-streptomycine (P0781, Sigma) (milieu complet). Les cellules sont maintenues sous atmosphère humide à 5% de CO₂ et à 37°C.

Les cellules HepG₂ ont été cultivées dans des boîtes ou des plaques multi-puits préalablement traitées avec du collagène de type I (Corning, 354236).

2.2 Traitements pharmacologiques

L'autophagie a été induite par incubation des cellules dans un milieu de privation en nutriments (milieu EBSS, life technologies, 14155048) ou par traitement à la rapamycine (inhibiteur de mTOR) (sigma R0395, 250nM, 6 heures). Afin d'inhiber l'autophagie, les cellules ont été prétraitées pendant 2h avec du 3-Methyladenine, 3-MA (5mM, Sigma M-9281), ou 20 minutes avec de la chloroquine (Sigma, C6628, 20µM), puis incubées ou non dans de l'EBSS durant 4 heures supplémentaires.

Lorsque cela est indiqué, les cellules ont été traitées avec la forme active de l'inhibiteur de la F₁-ATPase, IF1H49K, (10 µM, protéine recombinante produite au laboratoire) pendant 20 minutes avant la mesure du ratio ADP/ATP extracellulaire ou avant incubation des cellules avec des HDL conjuguées au fluorochrome Alexa Fluor⁵⁶⁸ (HDL-A⁵⁶⁸) pour l'analyse de l'endocytose des HDL.

Afin d'inhiber spécifiquement le récepteur SR-BI, les cellules ont été traitées avec le BLT₁ pendant 20 minutes (10µM, sigma SLM0059), avant incubation avec les HDL-A⁵⁶⁸.

2.3 Transfection de si-RNA

Les cellules HeLa ou HepG₂ ont étéensemencées dans des boites de 100 mm de diamètre (1 200 000 cellules/boites) dans du milieu complet. 24 heures après, les cellules ont été transfectées avec 50nM de si-RNA contrôle ou de si-RNA dirigés contre nos protéines d'intérêt (**Tableau I**), à l'aide de l'agent de transfection Dharmafect (Dharmacon, Dharmafect1 transfection reagent T₂001-02), dans du milieu complet sans antibiotiques. 6h après transfection, le milieu des cellules est remplacé par du milieu complet en présence d'antibiotiques. Les expériences de biotinylation de protéines de surface sont réalisées 48h après transfection.

si-RNA	Référence (Dharmacon, Smart pool : ON target plus)
Contrôle	D-001810-01-05
Beclin1	L-010552-00-0005
Lamp1	L-013481-02-0005
Lamp2	L-011715-00-0005

Tableau I : Références du fournisseur des si-RNA utilisés

2.4 Biotinylation des protéines de surface

Les cellules HeLa ou les cellules HepG₂ ont été lavées 3 fois avec une solution de PBS froid (sigma, D1408) supplémenté avec 2mM de Chlorure de calcium (CaCl₂) et 2 mM de Chlorure de magnésium (MgCl₂) (PBS^{+/+}). Elles ont été ensuite incubées 30 minutes à 4°C dans une solution de PBS^{+/+} contenant 0.5 mg/ml de biotine (Pierce, #21331). Après 3 nouveaux lavages, la biotine non fixée a été désactivée en incubant les cellules 20 minutes dans une solution contenant 20 mM de NH₄Cl, puis ces dernières ont été ensuite lysées pendant 45 minutes dans du tampon TNE : Tris 20 mM pH7.4, NaCl 150 mM, EDTA 1mM supplémenté avec 1% de NP-40 et 1% d'inhibiteurs de protéase (P8340, Sigma). Le dosage des protéines a été effectué par la méthode colorimétrique de Bradford (*Bio-rad protein assay 500-0006*). Pour chaque expérience, 100 µg de protéines ont été prélevés de chaque échantillon (lysats totaux), et dénaturés par incubation

dans un bain sec à 95°C, dans le tampon de Laemlli 5 X (1.5 M de Tris-HCl pH 6.8, 10% de SDS, 50% de Glycerol, 25 % de β -mercaptoethanol, 0.01% de bleue de bromophénol) pendant 10 minutes.

D'autre part, 400 à 500 μ g de protéines ont été incubées une nuit à 4°C sous agitation avec de la streptavidine préalablement immobilisée sur une résine d'agarose (Pierce, #20353). Les échantillons ont été ensuite centrifugés et la résine streptavidine-protéines biotinylées a été lavée 3 fois dans une solution de TNE contenant 0.1% de NP-40. Les protéines associées à cette résine (protéines de surface) ont été éluées et dénaturées par incubation dans un bain sec à 95°C dans le tampon de Laemlli 2.5 X pendant 15 minutes (protéines de surface).

2.5 Western blot

Les lysats totaux ou les protéines de surface ont été séparés par électrophorèse en gel SDS-PAGE 10% ou 15% de polyacrylamide, puis transférés sur une membrane de nitrocellulose (GE Healthcare 10600002). Les membranes ont été saturées dans une solution de TBS-tween contenant 5% de BSA ou dans du PBS-tween contenant 5% de lait, selon les recommandations du fournisseur des anticorps utilisés. Les membranes ont ensuite été incubées une nuit à 4°C, sous agitation avec les anticorps primaires cités ci-dessous (**tableau II**) :

Protéine ciblée	Espèce	Dilution
β -F ₁	souris (<i>Pierce, 4.3E8.D10</i>)	1/1000
Aldolase	Lapin (<i>proteintech, 22542₁-AP</i>)	1/1000
eGFR	lapin (<i>genetex, GTX101408</i>)	1/1000
p62	Lapin (<i>proteintech, 18420₁-AP</i>)	1/1000
LC3	Lapin (<i>cell signalling, 2775</i>)	1/1000
Actine	Souris (<i>Sigma, A2228</i>)	1/1000
Beclin1	Lapin (<i>Bethyl laboratories, A-302-566-A</i>)	1/1000
Lamp1	Lapin (<i>genetex GTX62464</i>)	1/500
Lamp2	Lapin (<i>genetex GTX111812</i>)	1/500
SR-BI	Lapin (<i>abcam, ab52629</i>)	1/1000

Tableau II : Liste des anticorps utilisés pour les expériences de western blot

Après 3 lavages, les membranes ont été incubées une heure à température ambiante avec les anticorps secondaires anti-IgG de lapin couplés à la HRP (*Horseradish peroxydase*) (Promega, W4018), ou anti-IgG de souris couplés à la HRP (Promega, W4028), selon l'espèce où l'anticorps primaire a été produit. La révélation a été effectuée avec le réactif chimio-luminescent ECL (un substrat qui réagit avec la HRP et produit un signal visible) (sigma, 170-5060). Le signal de western blot a été détecté à l'aide du chemidoc MP (Bio-RAD©) et la quantification a été réalisée avec le logiciel image J.

2.6 Mesure du ratio ADP/ATP extracellulaire

Les cellules HepG₂ ont étéensemencées dans des plaques 24 puits (75 000 cellules/puits) pendant 48 h, puis lavées avec du PBS et incubées en milieu sans rouge phénol supplémenté avec 10% de sérum (Sigma, #D1145) ou en milieu EBSS durant 4 heures, avec ou sans IF1 (10µM). Le surnageant a été prélevé et centrifugé à 10 000 g pendant 5 minutes à 4°C avant la mesure du ratio ADP/ATP selon les instructions du kit abcam (ab65313).

Brièvement, 50µl de surnageant cellulaire a été ajouté à la solution contenant l'enzyme de mesure d'ATP (*ATP monitoring enzyme*) dans une plaque 96 puits. Ce mélange contient la luciférase, une enzyme qui catalyse la réaction suivante : ATP+ D-Luciférin+O₂ → Oxyluciferin+AMP+PP_i+CO₂+**signal lumineux**. Le signal de luminescence correspondant à l'ATP a été mesuré à l'aide du lecteur de microplaque Tecan (F500) (**mesure A**). Après stabilisation du signal (10 minutes), une seconde mesure a été effectuée (**mesure B**), puis la solution contenant l'enzyme de conversion d'ADP en ATP (*ADP converting enzyme*) a été ajoutée. Deux minutes après, une troisième lecture de la concentration totale en ATP (ADP+ATP) a été réalisée (**mesure C**). Ainsi le ratio ADP/ATP est calculé selon la formule suivante :

$$\frac{ADP}{ATP} = \frac{(C - B)}{A}$$

2.7 Endocytose des HDL

Des HDL-3 purifiées dans notre laboratoire ont été marquées sur la partie protéique (apoA-I) selon les instructions du kit utilisé (Thermo Fisher scientific A20184). Brièvement, la solution de HDL-3 a été incubée avec le fluorochrome alexa-fluor⁵⁶⁸ pendant une heure, à température ambiante à l'abri de la lumière et sous agitation.

Les cellules HepG₂ ont étéensemencées dans des plaques de 12 puits (150 000 cellules/puits), pendant 48 h. Les cellules ont été ensuite incubées ou non dans de l'EBSS en présence ou en absence des inhibiteurs indiqués dans les figures 5A, 5B et 5D. Les HDL marquées à l'alexa-fluor⁵⁶⁸ (HDL⁵⁶⁸) ont été

ajoutées au milieu de culture pendant 20 minutes (100 µg/ml). Pour chaque condition étudiée, une expérience similaire a été réalisée avec un excès d'HDL non marquées (HDL^{NM}, 2,5 mg/ml) afin de déterminer le signal de fluorescence non spécifique. Les cellules ont ensuite été lavées trois fois puis incubées pendant 90 minutes dans du milieu DMEM sans sérum et sans antibiotiques à 4°C afin d'éliminer l'excès d'HDL marquées liées à la membrane plasmique.

A la fin de l'incubation, les cellules ont été fixées dans une solution de PBS contenant 4% de paraformaldéhyde pendant 15 minutes, et les noyaux ont été marqués au DAPI (0,5 µg/ml).

Des images du signal fluorescent des HDL ont été capturées par microscopie confocale (Carl Zeiss LSM 780). La quantification a été effectuée pour 5 champs différents dans chacune des conditions étudiées, avec le logiciel ImageJ. L'intensité du signal de fluorescence a été normalisée par rapport au nombre de cellules par champs et le signal de fluorescence non spécifique a par ailleurs été soustrait :

$$\text{Endocytose} = \frac{\text{Signal de fluorescence cellules avec HDL}^{568}}{\text{Nombre de cellule HDL}^{568}} - \frac{\text{Signal de fluorescence cellules avec HDL}^{NM}}{\text{Nombre de cellule HDL}^{NM}}$$

En moyenne, 250 cellules ont été analysées par condition et par expérience.

2.8 Analyses statistiques

Les données expérimentales sont représentatives de 3 à 5 expériences indépendantes.

Les comparaisons entre les différentes conditions ont été effectuées avec un test de Student (*student t-test*). Les résultats sont exprimés sous forme de moyenne ± écart-type (SEM) et les différences ont été considérées significatives à $p \leq 0,05$.

Les analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel graphpad prism 5.0.

3. Résultats expérimentaux

3.1 Augmentation de l'expression membranaire de l'ecto-F₁-ATPase après induction de l'autophagie

L'autophagie peut être stimulée en cas de stress cellulaire comme lors d'une carence en nutriments, ou encore lors de période d'hypoxie. Le complexe protéique mTORC1 joue un rôle central dans la régulation de ce processus physiologique puisque lorsqu'il est activé, il inhibe l'induction de l'autophagie (Sarkar 2013).

Afin d'étudier l'implication de ce processus dans l'adressage de l'ecto-F₁-ATPase à la surface des cellules, nous avons utilisé deux lignées cellulaires connues pour exprimer un taux élevé de l'enzyme à la membrane plasmique : La lignée HepG₂ (cellules d'hépatocarcinome humain) et HeLa (cellules cancéreuses du col de l'utérus) (Ma et al. 2010; Vantourout et al. 2008). Nous avons incubé les cellules dans un milieu EBSS (milieu carencé en nutriments), ou nous les avons traitées à la rapamycine (inhibiteur de mTOR), afin de stimuler l'autophagie. L'expression membranaire de la F₁-ATPase a ensuite été évaluée par biotinylation des protéines de surface et immunoblot.

Pour chacune des expériences effectuées, le récepteur de l'EGF est retrouvé dans les lysats biotinylés (membrane plasmique) contrairement à l'aldolase, une protéine classiquement localisée au niveau cytoplasmique et que nous retrouvons uniquement dans les lysats totaux. Ces résultats indiquent qu'il n'y a pas de contaminants cytosoliques dans les lysats biotinylés. Nous avons pu observer que le traitement des cellules à l'EBSS ou à la rapamycine induit une augmentation du rapport LC3II/LC3I mais également une diminution de l'expression du récepteur autophagique p62. Ces deux processus déjà décrits, indiquent que l'autophagie a bien été induite par les traitements. Ces contrôles ont également été effectués pour les expériences décrites ci-après.

De plus, l'incubation des cellules dans un milieu carencé en nutriments augmente l'expression membranaire de la F₁-ATPase de façon dépendante du temps. L'enzyme atteint son niveau maximum d'expression à la surface après 2h de privation pour les cellules HeLa (**Figure 1A**, 1.7 ± 0.1 $p \leq 0,4$) mais aussi HepG₂ (**Figure 1C**, 4.0 ± 0.6 $p \leq 0,05$). La stimulation de l'autophagie par inhibition du

complexe mTORC1 augmente également l'expression de la F₁-ATPase de surface dans chacune des deux lignées. (**Figure 1B et 1D** ; 2.0 ± 0.2 $p \leq 0,05$ pour les cellules HeLa ; 4.0 ± 0.8 $p \leq 0,05$ pour les cellules HepG₂).

En revanche, ces deux inducteurs du processus d'autophagie n'ont pas d'effet sur l'expression totale de la F₁-ATP synthase.

Ces résultats démontrent donc que la stimulation de l'autophagie conduit à une augmentation de l'expression de la F₁-ATPase à la membrane plasmique des cellules.

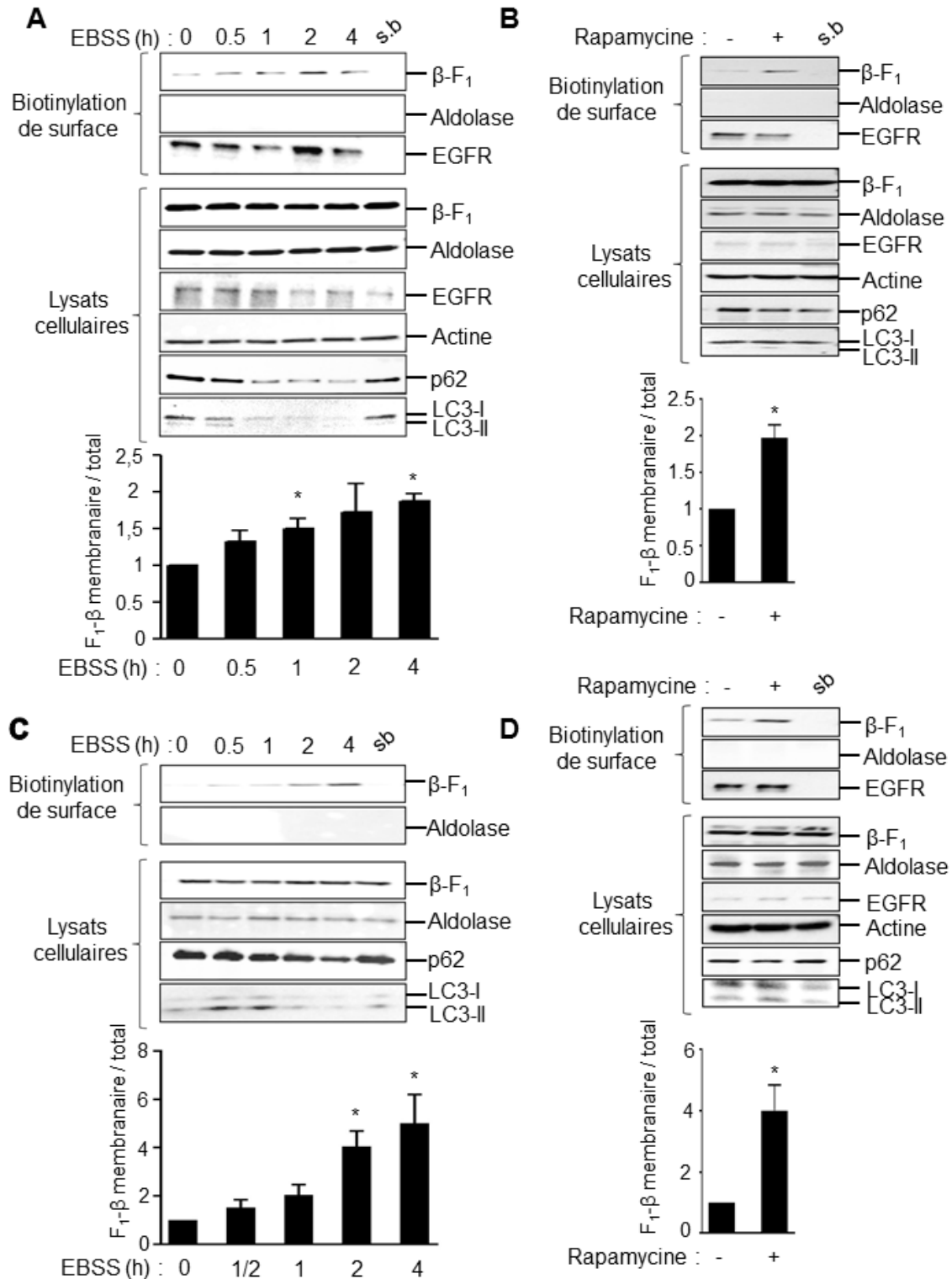


Figure 1 : La stimulation de l'autophagie augmente l'expression de la F₁-ATPase à la membrane plasmique. Les cellules HeLa (**A, B**) ou HepG₂ (**C, D**) ont été incubées dans un milieu carencé en nutriments (EBSS) pendant les temps indiqués (**A, C**) ou traitées à la rapamycine (250nM) pendant 6h (**B, D**). L'expression membranaire de la F₁-ATPase a été détectée après biotinylation de surface puis western blot avec des anticorps dirigés contre la sous-unité β. La présence du récepteur à l'EGF dans les lysats biotinylés, l'absence de l'aldolase ainsi que l'absence de détection de protéines dans la fraction non

biotinylée ont été utilisées comme contrôle de la spécificité du signal observé. La diminution d'expression de la protéine p62 ainsi que la variation du ratio LC3II/LC3I ont été vérifiées par immunoblots à l'aide d'anticorps spécifiques et sont utilisées comme contrôles positifs de l'induction du processus d'autophagie. Les immunoblots montrés sont représentatifs de cinq expériences indépendantes. Les quantifications indiquées représentent la moyenne \pm l'écart-type (SEM) de ces expériences. * $p \leq 0,05$. s.b : Sans biotine

3.2 L'adressage de l'ecto- F_1 -ATPase est dépendant de la formation de l'autophagosome

Les premières grandes étapes du processus d'autophagie se caractérisent par la nucléation et l'élongation de vésicules intracellulaires appelées autophagosomes. Ce mécanisme nécessite l'intervention de protéines spécifiques dont le complexe Beclin1-VPS34-VPS15, les protéines Atg (*autophagy related genes*), et LC3 (*Microtubule - associated protein light chain 3*) (Lamb et al. 2013; Rogov et al. 2014).

Différentes études récentes ont démontré que la machinerie impliquée dans la formation de l'autophagosome est indispensable au processus d'autophagie dit « sécrétoire » (Ponpuak et al. 2015). Nous avons donc évalué le rôle de ces étapes précoces de l'autophagie dans l'adressage de la F_1 -ATPase à la membrane plasmique. Pour cela, nous avons inhibé la formation de l'autophagosome en invalidant l'expression de la protéine d'initiation Beclin1 (BECN1), par transfection de si-RNA dans les cellules HeLa, ou en traitant les cellules HepG₂ avec le 3-MA, un inhibiteur de la PI3-kinase de classe III, VPS34.

Les résultats indiquent que l'extinction de la protéine Beclin1 induit une diminution significative d'environ 75% de l'expression de l'ecto- F_1 -ATPase en condition basale (0.24 ± 0.1 $p \leq 0,05$, **Figure 2A**). De plus, l'absence de BECN1, abolit complètement l'augmentation de l'expression de la F_1 -ATPase à la membrane plasmique induite suite à la stimulation de l'autophagie par carence nutritive (EBSS) ($4,0 \pm 0,5$ vs 0.68 ± 0.1 $p \leq 0,05$ **Figure 2A**).

Nous avons également démontré que le prétraitement des cellules HepG₂ avec le 3-MA empêche l'augmentation d'expression de surface de la F_1 -ATPase observée après induction de l'autophagie (3.1 ± 0.5 vs 1.6 ± 0.1 , **Figure 2B**).

L'ensemble de ces résultats indique que le complexe de l'initiation de la formation de l'autophagosome est impliqué dans l'adressage de l'ecto-F₁-ATPase à la surface des cellules.

Il est important de noter que le traitement des cellules au 3-MA en conditions basales (dans un milieu supplémenté avec 10% de sérum) induit en revanche une augmentation de l'expression de l'ecto-F₁-ATPase ($4,1 \pm 1.4$ **Figure 2B**). Cette donnée est en accord avec une étude démontrant qu'en présence de nutriments, le traitement prolongé des cellules au 3-MA (6 à 9h) tend à stimuler l'autophagie. En effet, dans ces conditions, le 3-MA n'exerce plus sa fonction inhibitrice de la PI3-kinase de classe III VPS34. En revanche, l'inhibition par le 3-MA des PI3-Kinase de classe I est maintenue induisant alors l'autophagie (Wu et al. 2010). Ce mécanisme pourrait ainsi expliquer l'augmentation de l'expression à la membrane plasmique de la F₁-ATPase observée dans cette condition.

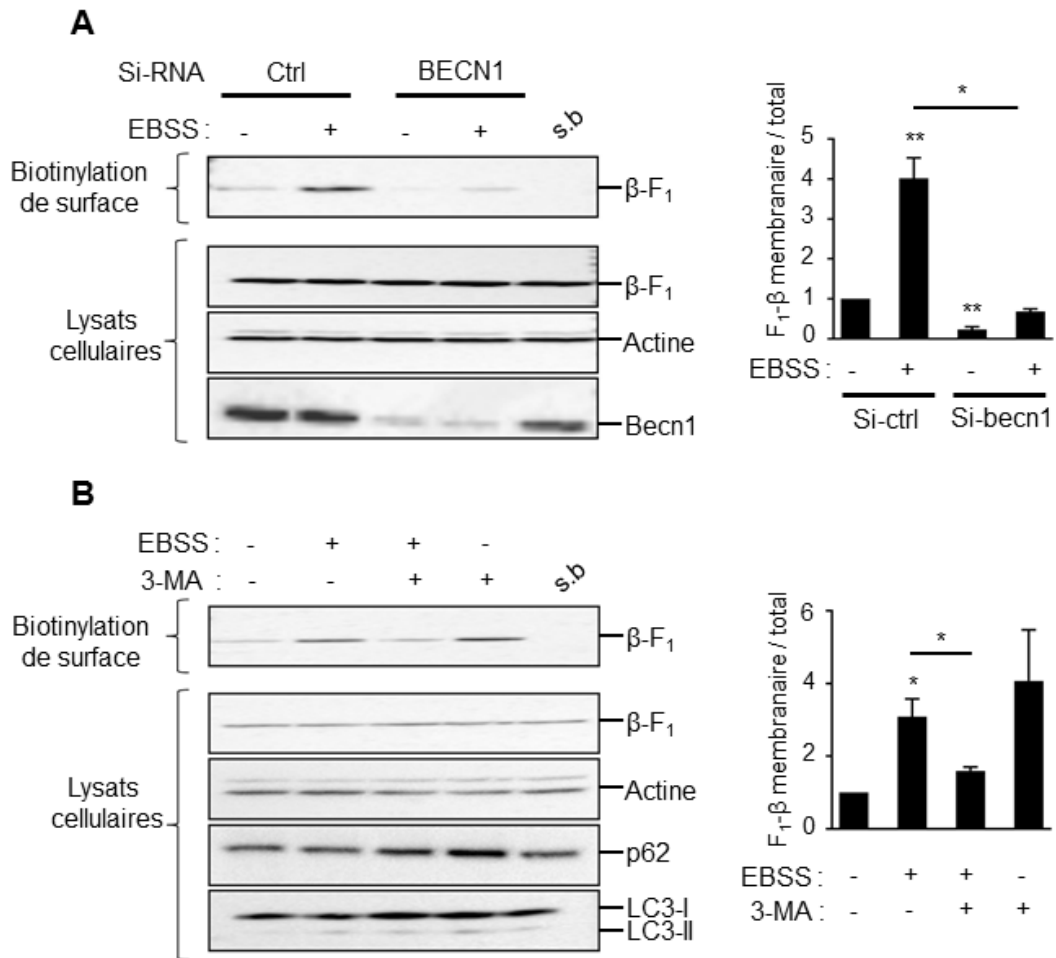


Figure 2 : L'inhibition de la formation de l'autophagosome abolit l'adressage de l'ecto-F₁-ATPase à la membrane plasmique. (A) Des cellules HeLa ont été transfectées avec des si-RNA contrôle, ou des si-RNA dirigés contre la protéine BECN1. 48h après, les cellules ont été incubées ou non, dans un milieu EBSS pendant 4h. L'efficacité de transfection a été vérifiée par western blot en utilisant des anticorps spécifiques de la protéine Beclin1. **(B)** Des cellules HepG₂ ont été traitées avec du 3-MA (5mM) pendant 2h puis incubées ou non dans un milieu EBSS durant 4h supplémentaires. L'expression membranaire de la F₁-ATPase a été évaluée par biotinylation de surface puis western blot avec des anticorps dirigés contre la sous-unité β . L'induction de l'autophagie a été vérifiée par western blot avec des anticorps dirigés contre les protéines LC3-I/LC3-II et p62. Les immunoblots montrés sont représentatifs de trois expériences indépendantes. Les quantifications indiquées représentent la moyenne \pm SEM de ces expériences. *p \leq 0,05 ; ** p \leq 0,005. s.b : Sans biotine

3.3 L'inhibition du flux autophagique ne modifie pas l'expression de l'ecto-F₁-ATPase.

L'étape de maturation des autophagosomes se caractérise par la fermeture des membranes de l'autophagosome et la fusion de ce dernier avec les lysosomes formant des structures appelées autolysosomes. C'est au sein des autolysosomes que les éléments cytosoliques pourront être dégradés et recyclés. Ce mécanisme de fusion nécessite l'intervention de protéines spécifiques dont les protéines Lamp1/Lamp2, ou certaines protéines SNAREs telle que Rab7 (Rogov et al. 2014; Lamb et al. 2013). Divers résultats ont été démontrés quant au rôle de cette étape tardive dans le processus d'autophagie « sécrétoire ». En effet, ces événements de fusion ne semblent pas être indispensables à l'adressage de toutes les protéines transitant par cette voie de sécrétion (Ponpuak et al. 2015).

Nous avons souhaité déterminer si cette étape de maturation est nécessaire à l'adressage de la F₁-ATPase à la membrane plasmique. Pour cela, nous avons empêché la fusion de l'autophagosome avec le lysosome par invalidation des protéines Lamp1 et Lamp2 avec des si-RNA, ou de façon pharmacologique par traitement des cellules à la chloroquine, un inhibiteur de l'acidification lysosomale.

L'inhibition de cette étape tardive de l'autophagie conduit à une accumulation de la protéine LC3II dans les cellules HeLa ou HepG₂, en condition basale ou lors de l'induction de l'autophagie par traitement à l'EBSS (**Figure 3A, 3C, 3D**). Ces résultats indiquent que l'étape de maturation de l'autophagie est inhibée par ces différents traitements.

Cependant, l'inhibition de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome n'empêche pas la dégradation de la protéine p62 induite par le traitement à l'EBSS (**Figure 3A, 3B**). De plus, le traitement à la chloroquine résulte en une accumulation de la protéine LC3II de façon comparable en condition basale et en condition d'autophagie (**Figure 3A, 3C**). Ces résultats indiquent donc que le traitement à la chloroquine n'inhiberait pas complètement cette étape de maturation. Ces données sont en accord avec une étude récente démontrant que la chloroquine exerce un effet inhibiteur moins important sur la dégradation lysosomale que d'autres composés pharmacologiques telle que la bafilomycine. Ceci se traduit par une inefficacité de la chloroquine à restaurer complètement

l'expression de certaines protéines telle que p62 au cours de l'autophagie (Sahani et al. 2014).

Dans les cellules HeLa, l'inhibition de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome par traitement à la chloroquine n'a pas d'effet significatif sur l'expression membranaire de la F₁-ATPase, ni en condition basale, ni après induction de l'autophagie (**Figure 3A**). De la même manière, l'extinction des protéines lysosomales Lamp1 et Lamp2 ne modifie pas non plus l'expression membranaire de l'ecto-F₁-ATPase basale ou induite par l'autophagie (**Figure 3B**).

Des résultats similaires ont été obtenus sur la lignée cellulaire HepG₂ (**Figure 3C, 3D**) où il est cependant important de noter que l'extinction de la protéine Lamp2 tend à augmenter l'expression de surface de l'ecto-F₁-ATPase en condition basale (1.0 vs 1.7 ± 0.2 p ≤ 0,05, **Figure 3D**), suggérant le rôle d'une dégradation lysosomale de la F₁-ATPase.

L'ensemble de ces résultats démontre donc que l'adressage de l'ecto-F₁-ATPase par le processus d'autophagie est indépendant de la fusion de l'autophagosome avec le lysosome et donc du flux autophagique.

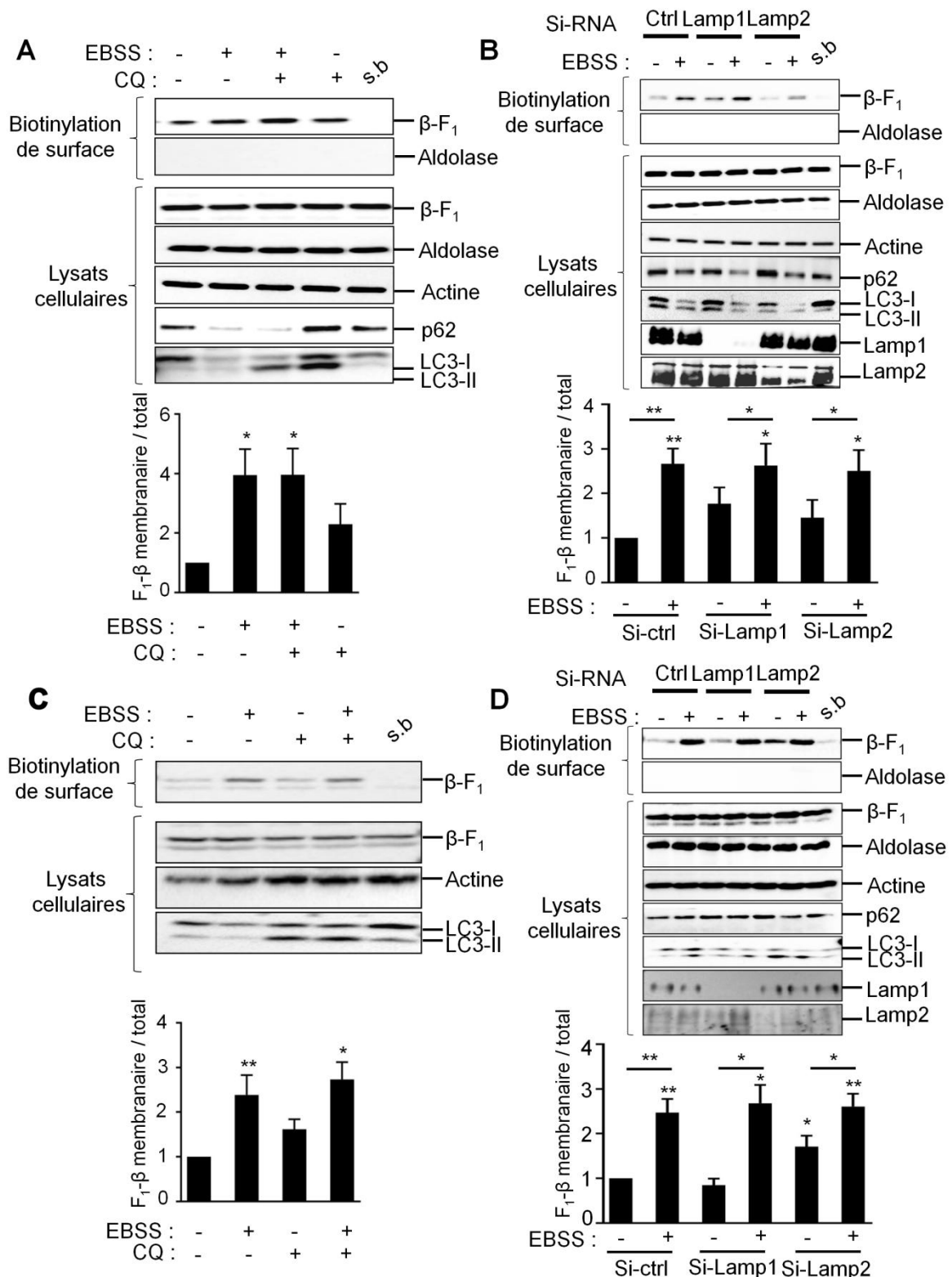


Figure 3 : L'inhibition de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome n'a pas d'effet sur l'expression membranaire de la F₁-ATPase. Des cellules HeLa (**A**), et HepG₂ (**C**) ont été traitées avec de la chloroquine pendant 30 minutes puis incubées ou non dans du milieu EBSS durant 4h supplémentaires. Les cellules HeLa (**B**) ou HepG₂ (**D**) ont été transfectées avec des si-RNA contrôle ou dirigés contre les protéines Lamp1 et

Lamp2, 48h après, elles ont été incubées ou non dans un milieu EBSS pendant 4h. L'efficacité de transfection a été vérifiée par western blot en utilisant des anticorps spécifiques des protéines Lamp1 et Lamp2. L'expression membranaire de la F₁-ATPase et l'induction de l'autophagie ont été évaluées comme précédemment. La spécificité du signal biotinylé observé a été vérifiée par l'absence du signal dans le lysat non incubé avec la biotine (s.b) et par l'absence de l'aldolase dans les lysats biotinylés. Les immunoblots montrés sont représentatifs de cinq expériences indépendantes. Les quantifications indiquées représentent la moyenne \pm SEM de ces expériences. *p \leq 0,05 ; ** p \leq 0,005. s.b : Sans biotine

3.4 Etude de la fonctionnalité de l'ecto-F₁ATPase adressée à la membrane plasmique par autophagie

L'endocytose des HDL dépendante de la voie ecto-F₁-ATPase est liée à la génération d'ADP à partir d'ATP par cette dernière. L'ADP formé active le récepteur purinergique P2Y₁₃, ce qui conduit *in fine* à l'endocytose de la particule entière de HDL par un récepteur de basse affinité encore non identifié (Martinez et al. 2003; Fabre et al. 2010; Malaval et al. 2009).

Afin de déterminer si l'ecto-F₁-ATPase adressée à la membrane plasmique par le processus d'autophagie est fonctionnelle, nous avons utilisé une première approche de mesure du ratio ADP/ATP extracellulaire sur les cellules HepG₂.

Comme cela a été décrit dans la littérature (Yang et al. 2004), le ratio basal ADP/ATP extracellulaire est de ~ 1 (1.07 ± 0.18 , **Figure 4**). De plus, nos résultats montrent que l'activité de l'ecto-F₁-ATPase contribue au maintien de ce ratio basal. En effet, l'incubation des cellules avec l'inhibiteur spécifique de la F₀F₁-ATPase, IF1, tend à diminuer ce ratio (1.07 ± 0.18 vs 0.54 ± 0.16 , **Figure 4**).

D'autre part, la stimulation de l'autophagie par carence nutritionnelle conduit à une augmentation d'environ 3 fois de ce ratio extracellulaire (1.01 ± 0.16 vs 3.02 ± 0.37 , p \leq 0,05 **Figure 4**). Cette augmentation est complètement abolie lorsque les cellules sont incubées avec l'IF1 (3.02 ± 0.37 vs 1.24 ± 0.10 , **Figure 4**), suggérant que cette augmentation est dépendante de l'activité de l'ecto-F₁-ATPase.

Ces résultats démontrent d'une part que la F₁-ATPase de surface contribue au maintien du ratio ADP/ATP en condition basale et d'autre part que l'induction de l'autophagie induit la translocation d'une enzyme fonctionnelle à la membrane plasmique capable de moduler le ratio ADP/ATP extracellulaire.

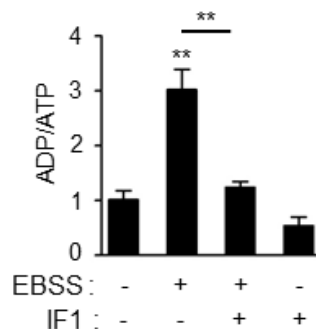


Figure 4 : L'autophagie adresse une ecto-F₁-ATPase fonctionnelle à la membrane plasmique : Les cellules HepG₂ ont été incubées ou non dans du milieu EBSS pendant 4 h en présence ou en absence d'IF1 (10µM) avant prélèvement du milieu de culture. Le ratio ADP/ATP a été déterminé comme décrit dans la partie « matériels et méthodes ». Les quantifications montrées représentent la moyenne ± SEM de trois expériences indépendantes. ** p ≤ 0,005.

Après avoir démontré que l'induction de l'autophagie induit l'adressage d'une ecto-F₁-ATPase fonctionnelle, capable d'augmenter le ratio ADP/ATP extracellulaire, nous avons recherché à déterminer si ce mécanisme avait un impact sur l'internalisation des HDL. Pour cela, nous avons utilisé une approche de mesure de l'endocytose de HDL fluorescentes *in vitro*, par les cellules HepG₂.

Tout d'abord, en condition basale, l'incubation des cellules avec IF1 induit une diminution significative de ~ 40% de l'endocytose des HDL (1.0 vs 0.63 ± 0.8, p ≤ 0,05 **Figure 5A**). Ces résultats sont en accord avec les études précédentes du laboratoire démontrant que l'ecto-F₁-ATPase est fonctionnelle et capable de moduler l'endocytose des HDL en condition basale (Martinez et al. 2003; Fabre et al. 2010). De plus, l'induction de l'autophagie par carence nutritionnelle induit une augmentation significative de la captation des HDL (1.0 vs 1.78 ± 0.22 **Figure 5B**, p ≤ 0.05). Cette augmentation est strictement dépendante de la voie ecto-F₁-ATPase puisqu'elle est complètement abolie en présence de l'IF1 (1.78 ± 0.22 vs 0.79 ± 0.06, **Figure 5B**, p ≤ 0.05).

Afin de vérifier que l'effet observé de l'autophagie sur l'endocytose des HDL est spécifique à l'ecto-F₁-ATPase, nous avons évalué le rôle du récepteur SR-BI (*scavenger receptor class B member 1*), également impliqué dans l'endocytose sélective du cholestérol ester contenu dans les HDL. Nous avons montré que l'augmentation de la captation des HDL induite par carence nutritive est

indépendante du récepteur SR-BI puisque son inhibiteur spécifique, le BLT1 (*Blocker of lipid transport*), n'a pas d'effet sur la quantité de HDL internalisées par les cellules HepG₂ (1.78 ± 0.22 vs 1.70 ± 0.33 **Figure 5B**). Ces résultats semblent en accord avec les données présentées dans la **Figure 5C** qui démontrent que la stimulation de l'autophagie par traitement des cellules à l'EBSS n'a pas d'effet sur l'expression membranaire du récepteur SR-BI.

Enfin, comme nous avons précédemment démontré que la machinerie impliquée dans la formation de l'autophagosome est nécessaire au processus d'adressage de l'ecto-F₁-ATPase à la surface cellulaire (**Figure 2**), nous avons étudié l'implication de ce processus dans l'endocytose des HDL par les cellules HepG₂. Nous montrons que lorsque les cellules sont pré-incubées avec du 3-MA, l'augmentation de l'endocytose de HDL observée après la stimulation de l'autophagie est complètement abolie (1.78 ± 2.7 vs 0.66 ± 0.07 , **Figure 5D**, $p \leq 0.05$).

Ces résultats montrent donc que l'internalisation des HDL induite par l'autophagie est spécifique à l'ecto-F₁-ATPase. De plus, ce processus dépend des mécanismes moléculaires impliqués dans la formation des autophagosomes.

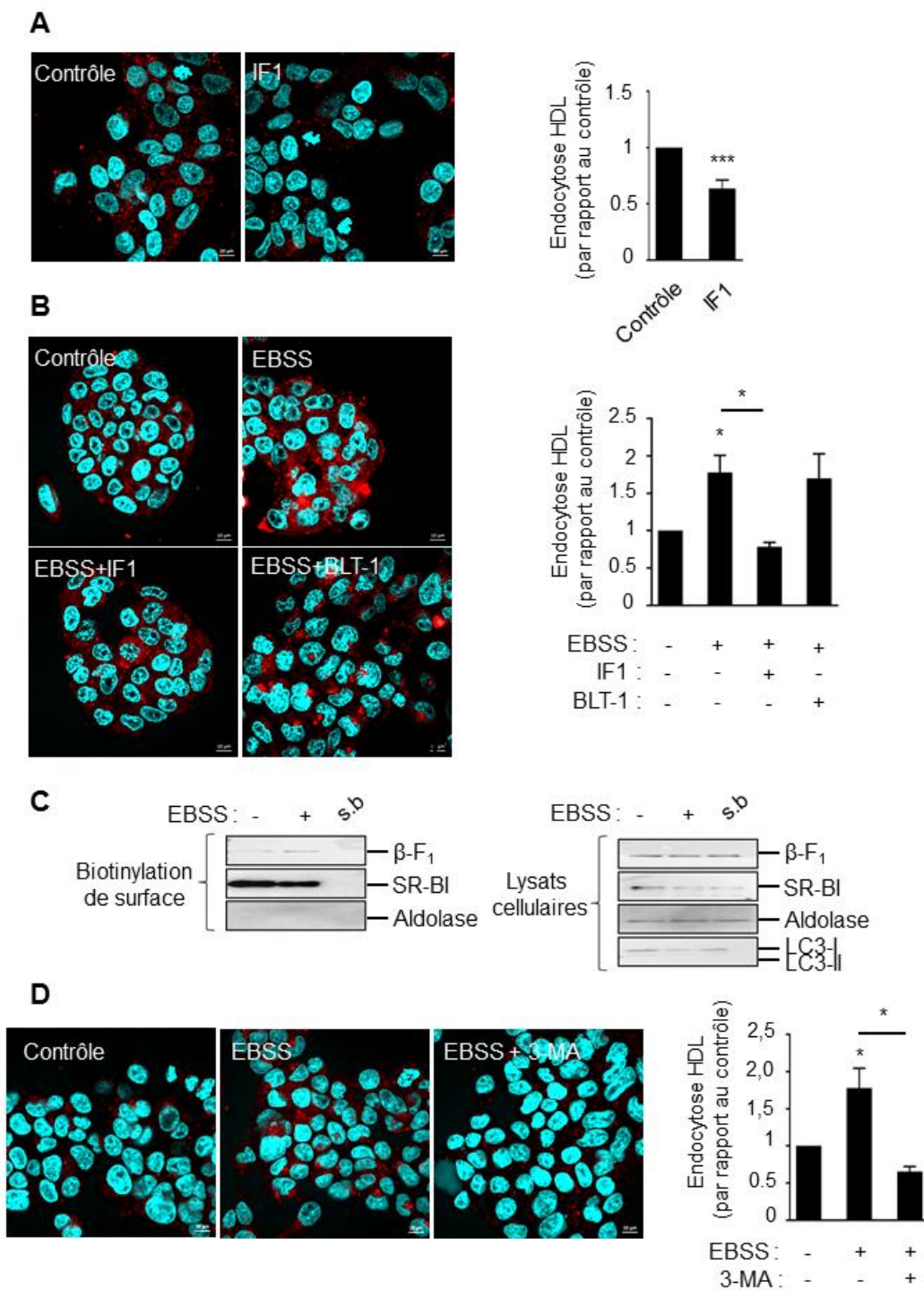


Figure 5 : L'autophagie induit l'internalisation des HDL de manière spécifique et dépendante de l'ecto-F₁-ATPase. (A) Les cellules HepG₂ ont été traitées avec de l'IF1 puis incubées avec des HDL marquées à l'alexa-fluor⁵⁶⁸. **(B)** Les cellules HepG₂ ont été incubées ou non dans du milieu EBSS en présence ou en absence d'IF1 (10µM) ou du BLT₁ (10µM) avant incubation des cellules avec des HDL marquées. L'endocytose des HDL marquées a été évaluée comme décrit dans la partie « matériels et méthodes ». **(C)** Les cellules HepG₂ ont été incubées dans un milieu carencé en nutriments (EBSS). L'expression membranaire de la F₁-ATPase et du récepteur SR-BI a été évaluée par biotinylation de surface puis western blot avec des anticorps spécifiques. L'induction de

l'autophagie a été vérifiée par western blot avec des anticorps dirigés contre les protéines LC3-I/LC3-II. **(D)** Des cellules HepG₂ ont été traitées avec du 3-MA (5mM) pendant 2h puis incubées ou non dans un milieu EBSS 4h supplémentaires avant incubation avec des HDL marquées. L'endocytose des HDL marquées a été évaluée comme décrit dans la partie « matériels et méthodes ». Les quantifications montrées représentent la moyenne \pm SEM de trois expériences indépendantes. Pour chaque expérience d'endocytose, \sim 250 cellules ont été analysées par condition et par expérience. * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,005$, *** $p \leq 0,001$.

4. Discussion

La F₀F₁-ATP-synthase est un complexe supramoléculaire en charge de la synthèse d'ATP au niveau de la mitochondrie. L'expression ectopique de cette enzyme à la membrane plasmique a été mise en évidence sur de nombreux types cellulaires où diverses fonctions physiologiques lui ont été attribuées (Martinez et al. 2015). Ainsi, il a été mis en évidence le rôle de l'ecto-F₁-ATPase dans l'endocytose des HDL par les hépatocytes, dans la prolifération des cellules endothéliales ou encore dans la reconnaissance tumorale par les lymphocytes T Y δ . Cependant, aucune étude publiée à ce jour ne s'est intéressée à son mécanisme d'adressage.

La F₀F₁-ATP-synthase se compose d'un grand nombre de sous-unités, dont certaines sont codées par le génome nucléaire, d'autres par le génome mitochondrial. La quasi-totalité des sous-unités de ce complexe a été identifiée au niveau de la membrane plasmique d'extrait de foies de rats (Rai et al. 2013). Ces résultats sont en faveur de l'hypothèse d'un pré-assemblage de toutes les sous-unités de la F₁-ATPase au niveau mitochondrial, suivi d'un transport au niveau de la membrane plasmique.

Dans ce contexte, 2 hypothèses peuvent être avancées. La première est l'implication des MDVs « *mitochondrial-derived vesicle* » dans le transport de la F₁-ATPase à la membrane plasmique. En effet, des vésicules bourgeonnant de la mitochondrie ont été caractérisées pour transporter sélectivement des protéines mitochondriales à destination de différentes organelles cellulaires. Ainsi, la protéine MAPL (*Mitochondria-Anchored Protein Ligase*) est sélectivement incorporée dans des MDV allant vers le peroxysome (Neuspiel et al. 2008) et la protéine TOM20 est incorporée dans des MDV adressées aux endosomes

tardifs/lysosomes (Soubannier et al. 2012). Ces vésicules ont été identifiées dans différentes lignées cellulaires notamment les cellules HeLa ou COS7 (Cellules rénales de singe) à l'état basal, mais leur formation est plus importante lors d'un stress oxydatif. D'autre part, les éléments transportés dépendent de la nature de ce stress oxydatif. Pour exemple, la génération de ROS (dérivés réactifs de l'oxygène) par traitement des cellules à la Xanthine Oxydase, génère des MDVs qui transportent la protéine de la membrane interne VDAC. A l'inverse la génération de ROS intramitochondriaux par traitement des cellules à l'antimycine A (un inhibiteur du complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale) génère des MDV qui transportent la protéine de la membrane externe TOM20 (Soubannier et al. 2012; Sugiura et al. 2014). Ce type de transport est majoritairement impliqué dans la dégradation des protéines mitochondriales endommagées (Sugiura et al. 2014).

Bien qu'aucune MDV à destination de la membrane plasmique n'ait été identifiée à l'heure actuelle, des vésicules sélectives partant de la mitochondrie pourraient être impliquées dans l'adressage de la F₁-ATPase à la surface. Ce mécanisme pourrait être dépendant de la fusion directe des MDVs avec la membrane plasmique, ou indirecte *via* un processus de fusion intermédiaire avec les endosomes (Fader & Colombo 2009).

Outre les MDVs, le concept d'autophagie « sécrétoire » tend à émerger ces dernières années (Ponpuak et al. 2015). Celle-ci permet l'adressage à la membrane plasmique de protéines qui ne peuvent pas transiter par la voie canonique RE-Golgi. Nous nous sommes particulièrement intéressés à ce mode de transport non conventionnel puisqu'il est impliqué dans l'adressage à la surface cellulaire de certaines protéines solubles et transmembranaires (Gee et al. 2011; Cleyrat et al. 2014).

Afin de tester l'implication potentielle de l'autophagie dans l'adressage à la membrane plasmique de la F₁-ATPase, nous avons induit ce processus par privation en nutriments, ou par traitement à la rapamycine (**Figure 1**). Ces deux stimuli ont déjà été utilisés afin d'induire l'adressage dépendant de l'autophagie. En effet, la privation en nutriments stimule la sécrétion de l'interleukine-1 β , par les macrophages (Dupont et al. 2011) et le traitement de la lignée cellulaire HEL (*human erythroleukemia cells*) à la rapamycine induit l'adressage à la membrane

plasmique de la forme immature de la protéine Mpl1 (*myeloproliferative leukemia virus oncogene*), le récepteur membranaire de la thrombopoïétine (Cleyrat et al. 2014).

L'induction de l'autophagie par les différents traitements a été contrôlée par l'étude en western blot des protéines LC3-I et LC3-II. Comme décrit dans la littérature, nous avons pu observer une augmentation du rapport LC3II/LC3I lors du traitement des cellules à la rapamycine (Huang et al. 2014), ou lors des temps courts de privation en nutriments (1 à 2 heures). L'augmentation de ce rapport reflète la conversion du LC3-I en LC3-II (Mizushima et al. 2010). En revanche, lorsque la période de privation en nutriments est longue (4h), l'expression de la protéine LC3II tend à diminuer, reflétant sa dégradation par l'autolysosome, comme cela a été rapporté par Mizushima et al. en 2010.

L'expression du récepteur autophagique p62 a également été analysée par western blot. P62 est un récepteur impliqué dans la prise en charge des composants destinés à être séquestrés et dégradés au sein de l'autophagosome. La dégradation du récepteur p62 lors du traitement des cellules à la rapamycine, ou lors de la privation en nutriments témoigne donc également de l'induction de l'autophagie par ces traitements.

De plus, lors de la carence nutritionnelle, nous avons pu observer une dégradation de la protéine p62 moins prononcée dans la lignée cellulaire HepG₂ (**Figure 1 à 3**) que dans la lignée cellulaire HeLa. Ces résultats semblent en accord avec une étude récente (Sahani et al. 2014) mettant également en évidence cette différence entre ces deux types cellulaires. En effet, lors de périodes de privation en nutriments prolongées, contrairement aux cellules HeLa ou HEK (*Human embryonic kidney cell*), l'activité transcriptionnelle de p62 est augmentée dans les lignées cellulaires HepG₂ ou MEF (*mouse embryonic fibroblastes*).

Suite à l'induction du processus d'autophagie, nous avons évalué l'expression à la membrane plasmique de la F₁-ATPase par biotinylation des protéines de surface et immunoblot.

La stimulation du processus d'autophagie est associée à une augmentation de l'expression de la F₁-ATPase à la surface des lignées cellulaires HeLa et HepG₂.

Une étude a par ailleurs démontré que l'expression totale de la F_0F_1 -ATP-synthase est augmentée lors de période de privation en nutriments dans les cellules MEF (Gomes et al. 2011). Ce phénotype n'a pas été observé dans les lignées cellulaires étudiées lors de ces travaux (**Figure 1 à 3**). La différence observée pourrait être due au modèle utilisé. D'autre part, l'augmentation de l'expression de la F_1 -ATP-synthase observée dans les MEF est maximale après 5 heures de privation en nutriments or nos expériences ont toutes été réalisées après maximum 4h de carence nutritionnelle. De ce fait, il semble également possible que l'augmentation d'expression de la F_0F_1 -ATP-synthase totale soit visible si l'on augmente le temps de privation en nutriments pour les cellules HeLa ou HepG₂.

Différentes études ont mis en évidence l'expression à la surface d'autres protéines mitochondriales (Rai et al. 2013), notamment certains autres complexes de la chaîne respiratoire (Yonally & Capaldi 2006). Nous avons donc évalué lors de cette étude, l'expression de ces dernières (**Figure S1**) en condition contrôle mais également en condition d'autophagie.

Résultats préliminaires :

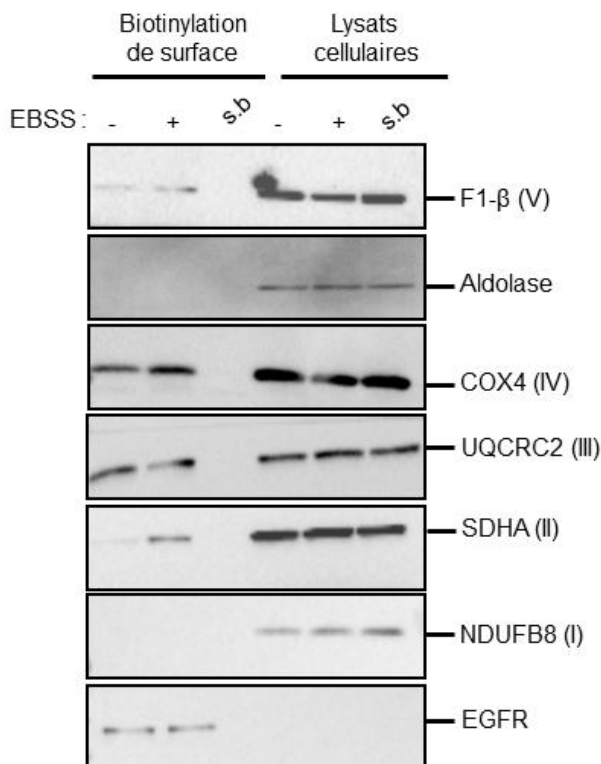


Figure Supplémentaire 1 : La stimulation de l'autophagie régule de manière différente l'expression des complexes respiratoires mitochondriaux à la membrane plasmique. Les cellules HepG₂ ont été incubées dans un milieu carencé en nutriments (EBSS) pendant 4 heures. L'expression membranaire des complexes respiratoires mitochondriaux a été évaluée par biotinylation de surface puis western blot avec des anticorps dirigés contre les complexes I à V. La spécificité du signal de biotinylation observé a été évaluée comme précédemment ($n=1$).

Comme illustré dans la **Figure S1**, nos résultats préliminaires indiquent la présence des complexes II (SDHA, *succinate déshydrogénase subunit A*), III (UQCR2, *Ubiquinol-cytochrome-c reductase complex core protein 2*), et IV (COX4, *Cytochrome c oxidase subunit 4*) à la membrane plasmique des cellules HepG₂. Cependant, on ne détecte pas le complexe I (NDUFB8, *NADH:Ubiquinone Oxidoreductase Subunit B8*). Ceci peut être dû à la sensibilité de l'anticorps utilisé étant donné que par immunofluorescence, ce complexe a été retrouvé localisé à la membrane plasmique des cellules 143B (lignée cellulaire d'ostéosarcome). De manière intéressante, en plus de l'augmentation de l'expression de l'ecto-F₁-ATPase, seule l'expression membranaire des complexes II et IV semble être régulée par le processus d'autophagie (**Figure S1**).

Cette observation pourrait suggérer que l'autophagie régule de manière sélective le transport de protéines mitochondriales à destination de la membrane plasmique. D'autres études sont nécessaires pour déterminer le rôle joué par ces différentes protéines au niveau de la membrane plasmique, et l'implication de l'autophagie dans la régulation de leur expression de surface.

Nous nous sommes ensuite intéressés à l'identification des étapes de l'autophagie impliquées dans l'adressage de la F₁-ATPase à la surface. Nous avons démontré que la machinerie précoce de l'autophagie est nécessaire à l'adressage à la membrane plasmique des cellules HeLa, de l'enzyme en condition basale, ou après induction de l'autophagie (**Figure 2A**). Ces résultats sont en accord avec différentes études portant sur l'adressage à la surface cellulaire de protéines solubles et transmembranaires par le processus d'autophagie. En effet, l'extinction de certains facteurs *atg* impliqués dans la formation de l'autophagosome tels que *atg5*, ou *atg8*, ou encore le traitement des cellules au 3-MA, inhibe l'adressage à la membrane plasmique de la forme immature de Mpl1 ou du CFTR (Cleyrat et al. 2014; Gee et al. 2011). De plus, la sécrétion d'IL- β induite par stimulation de l'autophagie est abolie dans une lignée de macrophage qui n'exprime plus la protéine *atg5* (*atg5*^{-/-}) (Dupont et al. 2011). Nos résultats ont été confirmés sur la lignée cellulaire HepG₂. Le traitement de ces cellules au 3-MA, un inhibiteur de VPS34, abolit l'augmentation d'expression de l'ecto-F₁-ATPase induite par la carence nutritionnelle.

Lors de cette expérience, nous avons observé une augmentation de l'expression à la membrane plasmique de la F₁-ATPase lors du traitement des cellules au 3-MA en condition basale (milieu supplémenté avec 10% de sérum). Le 3-MA est un inhibiteur de la protéine PI3-kinase de classe III VPS34, mais également des protéines PI3-kinases de classe I. Lors de traitements prolongés (6 à 9h) au 3-MA, en présence de sérum, Wu et al ont démontré que cet inhibiteur n'a plus d'effet sur VPS34. L'inhibition des kinases de classe I est quant à elle permanente (Wu et al. 2010). Cet inhibiteur semble donc agir comme la rapamycine en inhibant le complexe mTORC1 et donc par conséquent, active l'autophagie. Ce mécanisme pourrait ainsi expliquer l'augmentation de l'expression de l'ecto-F₁-ATPase à la surface observée dans ces conditions.

L'ensemble de ces résultats démontre donc que la machinerie impliquée dans la formation de l'autophagosome est nécessaire à l'adressage de l'ecto-F₁-ATPase à la membrane plasmique. Ceci pourrait suggérer un mécanisme de prise en charge de cette enzyme par l'autophagosome qui pourrait aller délivrer son contenu à la surface cellulaire. Ces résultats permettent également d'exclure le rôle potentiel des MDVs dans ce processus d'adressage. En effet, la formation de ces dernières est totalement indépendante de la machinerie précoce de l'autophagie puisque l'extinction de la protéine Beclin1 ou *atg5* n'affecte pas la génération des MDVs (Neuspiel et al. 2008; Soubannier et al. 2012).

Cependant, le mécanisme par lequel une protéine de la membrane interne mitochondriale pourrait être prise en charge par un autophagosome reste totalement inconnu. La membrane externe de la mitochondrie a été proposée comme site d'initiation et source de membrane pour la formation de l'autophagosome lors de la privation en nutriments. De ce fait, la membrane de l'autophagosome formé à partir de la mitochondrie se compose notamment de protéines de la membrane externe mitochondriale. (Hailey et al. 2010).

D'autre part, les mitochondries présentent des sites de contact entre la membrane interne et externe, au niveau desquels la F₀F₁-ATP-synthase est enrichie (Hoppel et al. 2002). Ainsi, ce complexe protéique pourrait ainsi être pris en charge au niveau de ces sites de contact par l'autophagosome naissant.

La machinerie précoce de l'autophagie est nécessaire à l'adressage de l'ensemble des protéines transitant par la voie de l'autophagie sécrétoire (Ponpuak et al. 2015). En revanche, les résultats divergent concernant l'implication de l'étape de fusion entre les autophagosomes et les endosomes tardifs/lysosomes.

Ce processus de maturation n'est pas impliqué dans l'adressage du CFTR à la membrane plasmique (Gee et al. 2011), il semble en revanche nécessaire à la sécrétion de l'IL1- β (Dupont et al. 2011). Ces études suggèrent que l'autophagosome destiné à la sécrétion pourrait emprunter des voies différentes en fonction des éléments qu'il transporte.

De manière intrigante, dans certains cas, comme pour les agrégats d' α -synucléïne, l'inhibition de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome tend à augmenter la sécrétion induite par l'autophagie (Ejlervskov et al. 2013). Ainsi, lorsque l'étape de fusion avec les lysosomes est inhibée, les autophagosomes destinés à la dégradation semblent pouvoir être redirigés au niveau de la membrane plasmique, afin d'expulser leur contenu.

Dans notre étude, nous avons démontré que cette étape tardive de fusion n'est pas impliquée dans le processus d'adressage de la F₁-ATPase à la membrane plasmique, en condition basale ou en condition d'autophagie. Néanmoins, l'extinction de la protéine Lamp2 augmente l'expression de la F₁-ATPase de surface, en condition contrôle, dans les cellules HepG₂ uniquement. Ces résultats suggèrent que dans ce type cellulaire, l'extinction de la protéine Lamp2 inhibe la dégradation de l'ecto-F₁-ATPase et pourrait par conséquent favoriser son recyclage à la membrane plasmique. Une autre hypothèse serait que l'inhibition de la dégradation de l'ATP synthase mitochondriale par les lysosomes, pourrait promouvoir l'accumulation de l'enzyme à la surface cellulaire.

En conclusion, nos résultats seraient en faveur de la formation d'un autophagosome transportant directement la F₁-ATPase à la membrane plasmique, indépendamment de sa fusion avec le lysosome. Cependant, l'hypothèse d'une étape de fusion intermédiaire avec des corps multivésiculaires formant des structures appelées amphisomes, ayant également la propriété de fusionner avec la membrane plasmique ne peut être exclue (Fader & Colombo 2009).

La F₁-ATPase de surface est impliquée dans un grand nombre de processus physiologiques dont la captation hépatique des HDL. Ce processus est dépendant de la génération par l'ecto-F₁-ATPase d'ADP, qui active le récepteur P2Y₁₃. Afin d'évaluer la fonctionnalité de l'ecto-F₁-ATPase adressée à la membrane plasmique par le processus de l'autophagie, nous avons d'une part mesuré le ratio ADP/ATP extracellulaire et d'autre part évalué l'internalisation des HDL marquées à l'alexa fluor⁵⁶⁸.

Nous avons pu démontrer que l'enzyme adressée à la surface cellulaire par autophagie est fonctionnelle. En effet, la stimulation de l'autophagie induit une augmentation du ratio ADP/ATP extracellulaire (**Figure 4**), associée à l'augmentation de l'internalisation des HDL (**Figure 5A, 5B**). Ces deux effets de l'autophagie sont strictement dépendants de l'ecto-F₁-ATPase puisqu'ils sont complètement abolis en présence de l'inhibiteur IF1, alors qu'ils sont indépendants du récepteur SR-BI (**Figure 5B, 5C**). De plus, l'inhibition de la machinerie impliquée dans la formation de l'autophagosome, de la même manière qu'elle empêche l'adressage de l'ecto-F₁-ATPase à la surface cellulaire (**Figure 2B**), inhibe l'augmentation de l'internalisation des HDL observée après carence nutritionnelle (**Figure 5D**).

Bago et al ont caractérisé en 2014 un nouvel inhibiteur de la kinase VPS34 : le VPS34-IN1. Ce dernier est sélectif de VPS34 puisqu'il n'exerce pas d'effet sur les autres protéines kinases ou lipides kinases (Bago et al. 2014).

Nos résultats préliminaires utilisant cet inhibiteur confirment les résultats que nous avons obtenu lors du traitement des cellules au 3-MA (**Figure S2**).

Résultats préliminaires :

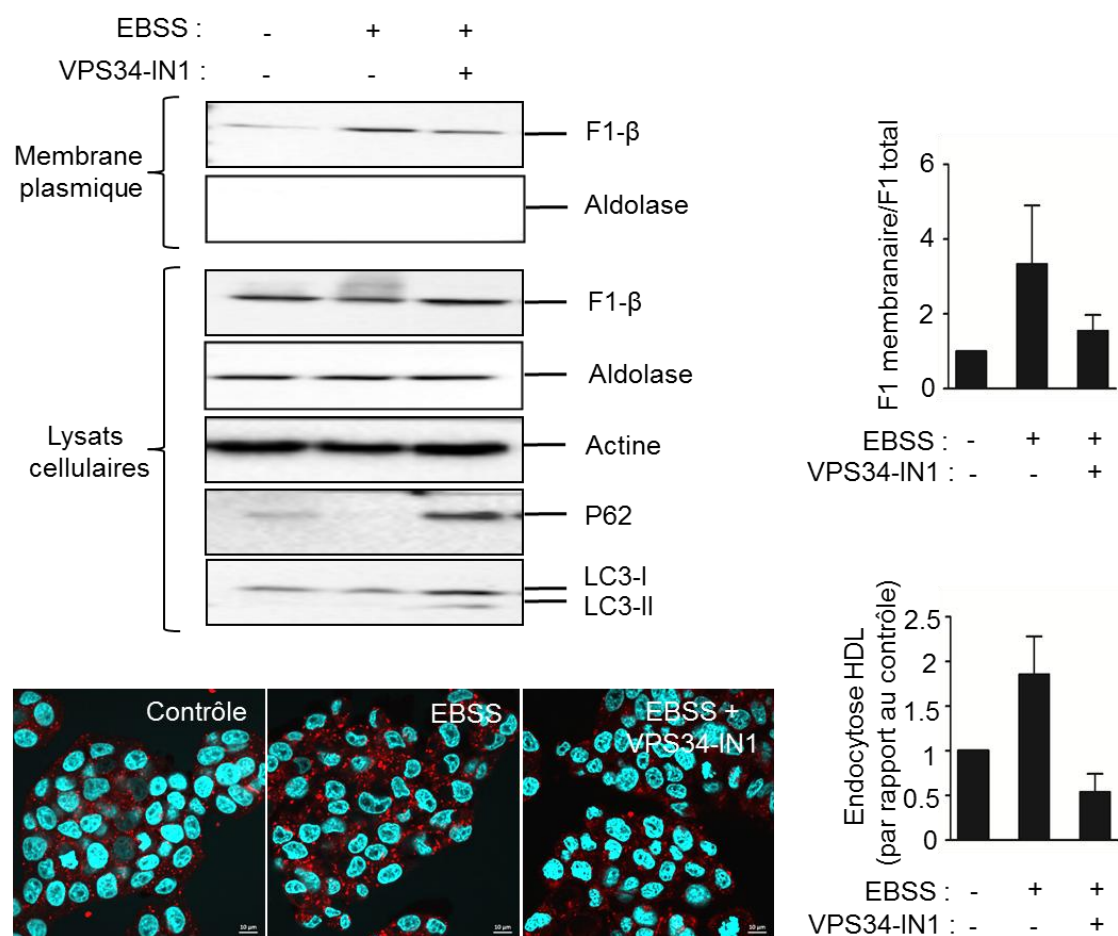


Figure Supplémentaire 2 : L'inhibition de la formation de l'autophagosome inhibe l'adressage de l'ecto-F₁-ATPase à la membrane plasmique induit par la carence nutritive. Des cellules HepG₂ ont été traitées avec du VPS34-IN1 (1 μM) pendant 12h puis incubées ou non dans un milieu EBSS durant 4h supplémentaires. **(A)** L'expression membranaire de la F₁-ATPase a été évaluée par biotinylation de surface puis western blot avec des anticorps dirigés contre la sous-unité β. L'induction de l'autophagie a été vérifiée par western blot avec des anticorps dirigés contre les protéines LC3-I/LC3-II et p62. Les immunoblots montrés sont représentatifs de deux expériences indépendantes. **(B)** Des HDL marquées à l'alexa-fluor⁵⁶⁸ 568 ont été ajoutées au milieu de culture et l'endocytose a été évaluée comme décrit dans la partie « matériels et méthodes ». Les immunoblots et les images de microscopie confocale montrés sont représentatifs de deux expériences indépendantes. Les quantifications montrées représentent la moyenne ± SEM de ces deux expériences indépendantes

Les premiers résultats suggèrent que comme lors du traitement au 3-MA, l'inhibition de la formation de l'autophagosome par traitement au VPS34-IN1 réduit l'adressage de la F₁-ATPase membranaire observé après stimulation de l'autophagie (**Figure S2A**). L'augmentation de l'endocytose de HDL observée dans cette même condition est par conséquent inhibée (**Figure S2B**).

5. Perspectives

5.1 Mécanismes d'adressage de la F₁-ATPase à la surface des hépatocytes primaires

Nous avons au cours de cette étude, démontré l'implication du processus d'autophagie dans l'adressage de la F₁-ATPase à la membrane plasmique de deux lignées cellulaires : HeLa et HepG₂. Sur cette dernière lignée, l'augmentation de l'expression de surface de l'ecto-F₁-ATPase après induction de l'autophagie est associée à augmentation de l'endocytose des HDL marquées à l'alexa-fluor⁵⁶⁸.

Dans la suite de ce projet, il semble donc nécessaire dans un premier temps, de confirmer la pertinence physiologique de notre modèle sur des hépatocytes primaires. Pour cela, l'autophagie pourrait être induite sur des hépatocytes primaires murins ou humains. L'expression à la membrane plasmique de la F₁-ATPase pourrait être évaluée comme précédemment par biotinylation de surface, mais également par d'autres techniques telle que l'immunofluorescence. Les expériences d'endocytose des HDL fluorescentes peuvent également être réalisées sur des cultures primaires d'hépatocytes (Fabre et al. 2010).

L'ecto-F₁-ATPase est un récepteur de haute affinité pour l'apoA-I. Nous avons démontré ici que son adressage à la surface cellulaire implique l'autophagie.

De plus, les HDL, l'apoA-I (Gerster et al. 2015) ou l'ApoL-I (une autre protéine des HDL) (Wan et al. 2008) sont également capables de stimuler l'autophagie sur les cellules tumorales colorectales.

Il serait donc intéressant d'étudier la régulation de l'expression de la F₁-ATPase à la membrane plasmique suite au traitement de cellules à l'apoA-I ou aux HDL. Dans la mesure où ces traitements stimuleraient l'autophagie, on pourrait s'attendre à une augmentation de l'adressage de l'ecto-F₁-ATPase. Ceci

constituerait un processus de rétrocontrôle impliqué dans la captation hépatique des HDL.

5.2 Etude de la dynamique de translocation de la F₁-ATPase par l'autophagie

Nous avons caractérisé au cours de cette étude l'implication du processus d'autophagie dans l'adressage à la membrane plasmique de la F₁-ATPase. Les protéines impliquées dans la formation de l'autophagosome sont nécessaires à l'adressage de l'enzyme à la surface des cellules. De ce fait, une des hypothèses de cette translocation serait la prise en charge de la F₁-ATPase mitochondriale par certains autophagosomes qui seraient par la suite acheminés vers la membrane plasmique et non vers les lysosomes.

Pour vérifier cette hypothèse, des expériences de co-transfection de plasmides codant pour une protéine de fusion fluorescente d'une sous-unité de la F₁-ATPase et de plasmides codant pour une protéine de fusion fluorescente d'une protéine de l'autophagie telle que LC3 pourraient être réalisées. Ce type d'expérience permettrait de suivre la dynamique de translocation de l'enzyme à la surface des cellules par les vésicules d'autophagie, en temps réel, par vidéo-microscopie. Nous pourrions également déterminer la localisation de la F₁-ATPase par microscopie électronique après marquage de la protéine avec des anticorps spécifiques couplés à des billes d'or. Ceci nous permettrait de mieux appréhender la localisation de l'enzyme par rapport aux vacuoles de l'autophagie.

Par ailleurs, nous pourrions également utiliser un plasmide codant pour une protéine de fusion fluorescente LC3 sensible aux variations de pH et permettant de différencier les autophagosomes des autolysosomes (Mizushima et al. 2010). De ce fait, la co-transfection de cette construction (tandem *mRFP-GFP-LC3*) et d'un plasmide codant pour une sous-unité de la F₁-ATPase fluorescente présenterait un double avantage. Cela permettrait d'une part de suivre la dynamique de translocation de l'enzyme à la surface en réponse à l'autophagie et d'autre part de confirmer que ce processus d'adressage est indépendant de la fusion entre l'autophagosome et le lysosome.

5.3 Implication de la dynamique mitochondriale dans le processus d'adressage à la membrane plasmique de la F₁-ATPase

Les mitochondries sont des organites mobiles, continuellement remodelées par des événements de fission et de fusion. De manière intéressante, le réseau mitochondrial est remodelé au cours de l'autophagie et de manière dépendante du type d'autophagie induit.

En effet, il a été démontré que durant l'autophagie induite par carence nutritive, les mitochondries ne sont ni séquestrées ni dégradées par l'autophagosome. Durant ce type d'autophagie, la protéine de fission Drp1 est déphosphorylée sur la sérine 616 (S⁶¹⁶) et est phosphorylée sur la sérine 637 (S⁶³⁷) par la protéine kinase PKA. Ces modifications post-traductionnelles empêchent la translocation de Drp1 du cytoplasme vers la mitochondrie, réduisant ainsi la fission mitochondriale, et favorisant en conséquence une élongation des mitochondries dépendantes des protéines de fusion MFN1 et OPA1. Cette hyperfusion des mitochondries éviterait la dégradation mitochondriale lors de ce type d'autophagie, optimiserait la production énergétique nécessaire à la survie cellulaire, et pourrait également permettre de fournir des lipides issus de la mitochondrie pour la formation de l'autophagosome (Gomes et al. 2011; Hailey et al. 2010; Rambold et al. 2011).

A l'inverse, la mitophagie, qui consiste en la dégradation de mitochondries défectueuses présentant des altérations irréversibles qui pourraient être nocives pour la cellule, est quant à elle précédée d'une étape de fission des mitochondries. Ceci permet leur prise en charge et leur dégradation par l'autophagosome (Ashrafi & Schwarz 2013).

Dans ce contexte, il semble intéressant d'étudier le rôle de cette dynamique mitochondriale et sa relation avec le processus d'autophagie dans le mécanisme d'adressage de l'ecto-F₁-ATPase à la membrane plasmique.

Résultats préliminaires :

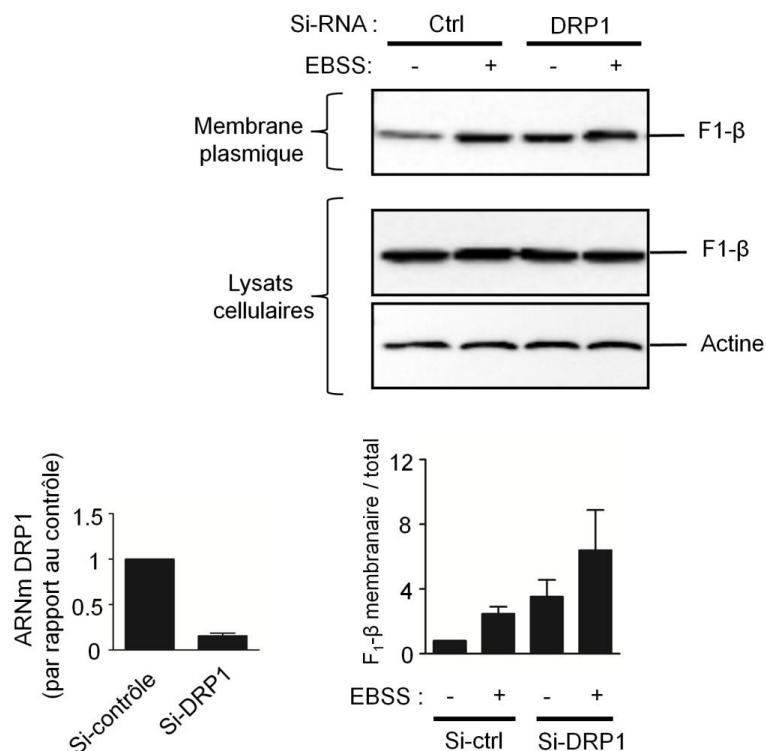


Figure Supplémentaire 3 : La fusion mitochondriale pourrait être impliquée dans l'adressage de l'ecto-F₁-ATPase à la membrane plasmique. Des cellules HepG₂ ont été transfectées avec des si-RNA contrôles, ou dirigés contre la protéine Drp1. 48h après, les cellules ont été incubées ou non, dans un milieu EBSS pendant 4h. L'efficacité de transfection a été vérifiée par RT-PCR quantitative. L'expression membranaire de la F₁-ATPase a été évaluée par biotinylation de surface puis western blot avec des anticorps dirigés contre la sous-unité β. Les immunoblots montrés sont représentatifs de deux expériences indépendantes. Les quantifications indiquées représentent la moyenne ± SEM de ces deux expériences.

Nos résultats préliminaires semblent indiquer que la fusion mitochondriale à elle seule est impliquée dans le processus d'adressage de la F₁-ATPase à la membrane plasmique. En effet, nous avons observé une augmentation de l'expression de l'ecto-F₁-ATPase lorsqu'on favorise l'hyperfusion des mitochondries par extinction de la protéine de fission Drp1. Cette augmentation observée est encore plus importante lorsqu'on induit l'autophagie par la carence nutritionnelle (**Figure S3**). Ces données suggèrent d'une part l'implication de la dynamique mitochondriale dans la régulation de l'expression à la surface cellulaire de la F₁-ATPase, et d'autre part la présence d'une interconnexion entre

l'autophagie, la fusion des mitochondries et l'adressage à la membrane plasmique de la F₁-ATPase.

Pour mieux comprendre le rôle de la fusion mitochondriale dans l'adressage de l'ecto-F₁-ATPase à la membrane plasmique, il sera nécessaire d'inhiber ce processus. Pour cela, nous pourrions éteindre l'expression des protéines de fusion Mfn1 et/ou Mfn2, ou OpaA1, ou encore surexprimer le double mutant de la protéine de fission Drp1, Drp1-S616E/S637A, qui empêche l'élongation mitochondriale induite par la carence nutritionnelle (Gomes et al. 2011; Rambold et al. 2011).

5.4 Identification d'autres acteurs moléculaires impliqués dans l'adressage de la F₁-ATPase à la surface cellulaire

Récemment, les rôles du récepteur TRIM16 et de la protéine SNARE sec22b ont été caractérisés dans le processus d'autophagie « sécrétoire ». En effet, TRIM-16 interagit avec l'interleukine-1 β et avec la protéine SNARE sec22b, formant un complexe qui sera alors pris en charge au sein de l'autophagosome.

Celui-ci est ensuite transporté à la membrane plasmique où il délivrera son contenu. Ce processus de sécrétion se caractérise également par l'intervention des protéines SNAREs Synthaxine3/4 et SNAP23/29 qui permettent la fusion de l'autophagosome avec la membrane plasmique.

L'autophagie étant impliquée dans l'adressage de la F₁-ATPase à la membrane plasmique, il serait intéressant dans la suite de ce projet d'identifier et d'explorer le rôle des récepteurs et des protéines SNAREs mis en jeu dans cet adressage.

Ceci pourrait être envisagé par une approche de criblage, d'une banque de siRNA ciblant les différentes classes de récepteurs impliqués dans l'autophagie, particulièrement la famille des TRIM, mais également les protéines SNAREs impliquées dans l'autophagie et dans le trafic vésiculaire en général.

Les résultats obtenus et validés nous permettraient d'identifier les divers partenaires impliqués dans l'adressage de la F₁-ATPase à la surface cellulaire afin de déchiffrer le ou les mécanismes moléculaires nécessaires à ce transport.

5.5 Caractérisation de la relevance physiologique de l'adressage de la F₁-ATPase à la membrane plasmique par l'autophagie

Le transport retour du cholestérol (TRC) constitue le processus majeur par lequel les HDL exercent leurs fonctions cardio-protectrices. Durant le TRC, les particules HDL assurent le transport du cholestérol des tissus périphériques et notamment des macrophages, vers le foie, où il est éliminé au niveau des voies biliaires.

Au niveau hépatique, l'ecto-F₁-ATPase joue un rôle clé dans l'endocytose des HDL. L'autophagie étant impliquée dans l'adressage de cette enzyme à la membrane plasmique, il serait intéressant dans la suite de ce projet, d'évaluer *in vivo* le rôle de l'autophagie dans l'endocytose hépatique des HDL dépendante de l'activité de l'ecto-F₁-ATPase.

Dans un premier temps, nous pourrions mettre à jeun des souris sauvages pendant 12h afin d'induire l'autophagie (Gomes et al. 2011; Codogno & Meijer 2013), puis évaluer par la suite l'expression membranaire hépatique de la F₁-ATPase par purification de la membrane plasmique.

De plus, divers paramètres physiologiques, tels que les concentrations plasmatiques en cholestérol et triglycérides (TG), les lipides hépatiques (cholestérol et TG) ainsi que les sécrétions de lipides biliaires (cholestérol, acides biliaires, phospholipides) après canulation de la vésicule biliaire des souris, pourraient être évalués. Afin de déterminer le rôle de l'ecto-F₁-ATPase dans la régulation de ces paramètres, nous pourrions traiter ou non les souris avec l'inhibiteur IF1.

L'implication de l'autophagie dans l'endocytose hépatique des HDL dépendante de l'ecto-F₁-ATPase pourrait également être étudiée sur des modèles de souris invalidées au niveau hépatique, pour certaines protéines nécessaires à l'autophagie comme *atg7* (Komatsu et al. 2005). Le traitement de souris sauvages avec le « *compound* » 31, un inhibiteur de la kinase VPS34 qui a montré son efficacité *in vivo* pourrait également être envisagé (Pasquier et al. 2015).

Ces diverses expériences permettraient de déterminer la relevance physiologique du processus d'adressage de l'ecto-F₁-ATPase par l'autophagie.

Le traitement de souris pro-athérogéniques ApoE^{-/-} avec un analogue de la rapamycine (un inducteur de l'autophagie), le sirolimus, réduit le contenu en cholestérol au niveau de la crosse aortique d'environ 36% (Basso et al. 2003).

Deux études récentes ont par ailleurs démontré que l'autophagie participe à la dégradation des gouttelettes lipidiques des macrophages et permet alors l'efflux du cholestérol libre généré, *via* le transporteur ABCA1 (Ouimet et al. 2011; Le Guezennec et al. 2012). De ce fait, l'inhibition du complexe mTORC1 semble ralentir la progression de la plaque d'athérome en stimulant le processus de transport retour du cholestérol (Le Guezennec et al. 2012; Vindis 2015).

Il semble donc intéressant d'étudier sur ce modèle de souris ApoE^{-/-} traité ou non au sirolimus, l'expression membranaire hépatique de l'ecto-F₁-ATPase, ainsi que les divers paramètres physiologiques mentionnés plus haut.

L'autophagie pourrait ainsi jouer un rôle athéroprotecteur à la fois au niveau vasculaire en stimulant l'efflux de cholestérol des macrophages, mais également au niveau métabolique en augmentant l'expression à la surface de l'ecto-F₁-ATPase, ce qui favoriserait l'endocytose hépatique du HDL-C et son élimination par le foie (Ouimet et al. 2011; Le Guezennec et al. 2012).

Ces études *in vivo* constitueraient un argument supplémentaire en faveur d'un nouveau rôle protecteur de l'autophagie au niveau hépatique en condition physiologique et pathologique.

5.6 Validation de ce mécanisme d'adressage sur d'autres modèles

De nombreux travaux dont ceux de notre équipe ont mis en évidence la présence de la F_1 -ATPase à la surface de différents types cellulaires dont les cellules endothéliales. A la surface de ces dernières, cette enzyme est notamment impliquée dans la survie et la prolifération cellulaire (Radojkovic et al. 2009), dans la transcytose des HDL (Cavelier et al. 2012), ainsi que dans la production de NO par la eNOS (données non publiées de laboratoire).

Dans ce contexte, il serait intéressant d'évaluer la contribution de l'adressage de la F_1 -ATPase par le mécanisme d'autophagie dans la protection des cellules endothéliales. Pour cela, l'autophagie pourrait être induite ou inhibée dans la lignée cellulaire HUVEC puis la prolifération cellulaire, l'apoptose et la transcytose des HDL pourraient être évaluées après stimulation par l'apoA-I et/ou après inhibition par l'IF1. La production de NO par les cellules endothéliales peut quant à elle être mesurée par l'utilisation de sonde fluorescente (DAF : 4-Amino-5-Methylamino-2',7'-Difluorofluorescein Diacetate).

Concernant la contribution de cette voie dans la protection endothéliale *ex vivo*, des mesures de sécrétion de NO induite par l'apoA-I sur aorte isolée pourraient être effectuées à l'aide d'une technique de détection électrochimique (ampérométrie).

6. Conclusion

En conclusion, nous avons démontré que l'autophagie induit l'adressage à la surface des cellules de l'ecto- F_1 -ATPase, de façon dépendante des protéines impliquées dans la formation de l'autophagosome. De manière intéressante, cet adressage n'implique pas la fusion entre l'autophagosome et le lysosome. A la surface des hépatocytes, nous avons montré que l'ecto- F_1 -ATPase adressée était fonctionnelle, capable de moduler les niveaux de nucléotides extracellulaires et par conséquent de stimuler l'endocytose des HDL.

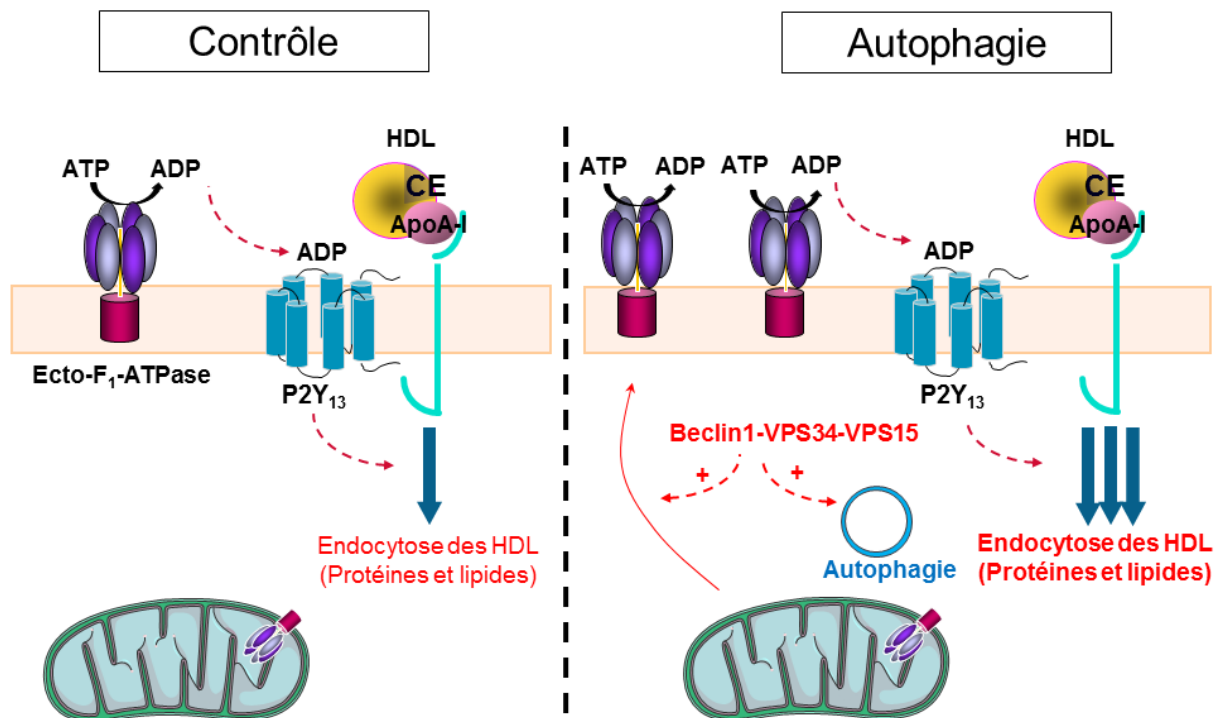


Figure 6 : Rôle de l'autophagie dans l'adressage de la F_1 -ATPase à la membrane plasmique. A la surface des hépatocytes, en condition basale, la F_1 -ATPase hydrolyse l'ATP formant de l'ADP. Ce dernier active le récepteur purinergique P2Y₁₃, ce qui conduit *in fine* à l'endocytose des HDL.

Nous avons démontré que la stimulation de l'autophagie augmente l'expression de l'ecto- F_1 -ATPase. Cette augmentation est dépendante des protéines impliquées dans la formation de l'autophagosome et est associée à une augmentation de l'activité de l'enzyme. En effet, cette dernière est capable de moduler les niveaux de nucléotides extracellulaires et par conséquent de stimuler l'endocytose des HDL.

7. Matériels et méthodes supplémentaires

7.1 Anticorps

Les anticorps dirigés contre les différents complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale sont résumés dans le tableau suivant :

Protéine ciblée	Espèce	Dilution
UQCRC2	Lapin (<i>proteintech, 14742-1-AP</i>)	1/1000
SDHA	Lapin (<i>proteintech, 14865-1-AP</i>)	1/1000
NDUFB8	Lapin (<i>proteintech, 14794-1-AP</i>)	1/1000
COX4	Lapin (<i>cell signalling, 4844</i>)	1/1000

Tableau III : Anticorps dirigés contre les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale

7.2 Inhibiteur de VPS34

Lorsque cela est indiqué et afin d'inhiber l'autophagie, les cellules ont été pré-traitées avec le VPS34-IN1 (12heures, 1 μ M), puis incubées ou non dans de l'EBSS durant 4 heures supplémentaires.

7.3 si-RNA Drp1 et PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR)

Le si-RNA dirigé contre la protéine Drp1 (**Tableau IV**) a été transfecté comme indiqué dans la partie « matériels et méthodes » :

si-RNA	Référence (Dharmacon, Smart pool : ON target plus)
Drp1	L-012092-00-0005

Tableau IV : Référence fournisseur du si-RNA dirigé contre la protéine Drp1

L'ARN total des cellules HepG₂ a été extrait au trizol (Invitrogen) après deux lavages dans du PBS froid. Une étape de séparation de phase en chloroforme suivie de la précipitation de l'ARN en isopropanol a ensuite été effectuée. La transcription inverse a été réalisée avec 1µg d'ARN et l'ADNc a été amplifié par qRT-PCR avec du SYBR green (Roche). Les amorces pour la qRT-PCR ont été élaborées avec le logiciel Primer Express (Life technologies SAS) et les séquences sont résumées dans le tableau suivant :

Gène	Séquence sens	Séquence antisens
Drp1	TGCCGTGAACCTGCTAGATGTG	TTACTGCCTTTGGCACACTGTC

Tableau V : Amorces utilisés pour la qRT-PCR

Les réactions de PCR ont été effectuées avec un StepOne™ (Thermo fisher) selon les paramètres cycliques suivant : 40 s à 60°C puis amplification de 10s à 95°C et dissociation de 10s à 95°C.

Le programme de la PCR a été suivi d'une courbe de fusion et les valeurs de CT (cycle de PCR) obtenues ont été normalisées par rapport aux quantités relatives du transcrit Rpl27 (gène ribosomal de référence). Les valeurs de CT de Rpl27 étaient constantes dans tous les échantillons.

Conclusion générale

Les deux études présentées dans la partie expérimentale ont permis d'identifier deux mécanismes de régulation de la voie ecto-F₁-ATPase d'endocytose des HDL (**Figure 28**).

Dans la 1^{ère} étude, nous avons mis en évidence le rôle de l'ANT dans la régulation de l'activité de l'ecto-F₁-ATPase à la surface des hépatocytes. En effet, cette ecto-translocase, dont le fonctionnement est dépendant des concentrations en ADP et ATP extracellulaires, importe dans la cellule l'ADP extracellulaire généré suite à l'activation de l'ecto-F₁-ATPase par l'apoA-I. Par conséquent, l'activité de l'ecto-ANT régule négativement l'endocytose des HDL dépendante de la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃.

Dans la 2^{ème} étude, nous avons identifié l'implication de l'autophagie dans la régulation de l'expression de l'ecto-F₁-ATPase à la membrane plasmique. De façon originale, nous avons observé que l'adressage de l'ecto-F₁-ATPase à la membrane plasmique est stimulé par l'induction de l'autophagie, *via* un mécanisme qui dépend des étapes précoces de la formation de l'autophagosome, mais qui ne dépend pas de la fusion de ce dernier avec le lysosome. L'ecto-F₁-ATPase adressée à la membrane plasmique en réponse à l'autophagie est fonctionnelle et est corrélée à la stimulation de l'endocytose des HDL.

Les résultats de ces deux études permettent une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires impliqués dans la captation hépatique des HDL soutenue par la voie ecto-F₁-ATPase. Ils pourraient être à la base de nouvelles approches thérapeutiques pour améliorer les fonctions athéroprotectrices des HDL en ciblant la dernière étape du transport retour de cholestérol et plus particulièrement l'internalisation hépatique du HDL-C.

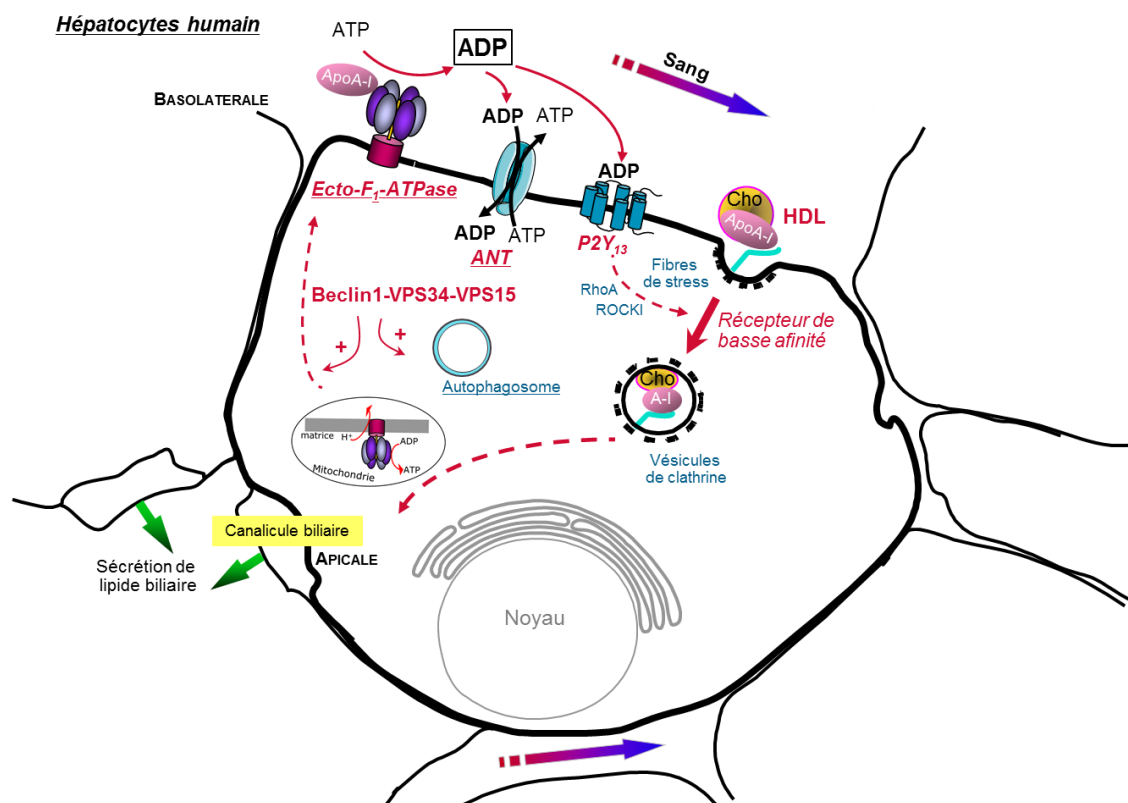


Figure 28 : Schéma bilan des travaux de thèse (études 1 et 2). L'ANT est présente à la membrane plasmique des hépatocytes (ecto-ANT) où elle importe l'ADP généré suite à l'activation de l'ecto-F₁-ATPase par l'apoA-I, régulant ainsi négativement l'endocytose des HDL.

En condition d'autophagie, la F₁-ATPase est adressée à la membrane plasmique par un mécanisme dépendant de la machinerie de formation de l'autophagosome. Une stimulation de cette voie d'adressage de l'ecto-F₁-ATPase à la membrane plasmique devrait permettre d'améliorer l'endocytose hépatique du HDL-C.

Bibliographie

- Abbracchio, M.P., 2006. International Union of Pharmacology LVIII: Update on the P2Y G Protein-Coupled Nucleotide Receptors: From Molecular Mechanisms and Pathophysiology to Therapy. *Pharmacological Reviews*, 58(3), pp.281–341.
- Acton, S. et al., 1996. Identification of Scavenger Receptor SR-BI as a High Density Lipoprotein Receptor. *Science*, 271(5248), pp.518–520.
- Aiello, R.J. et al., 2002. Increased atherosclerosis in hyperlipidemic mice with inactivation of ABCA1 in macrophages. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 22(4), pp.630–637.
- Alavian, K.N. et al., 2011. Bcl-xL regulates metabolic efficiency of neurons through interaction with the mitochondrial F1FO ATP synthase. *Nature Cell Biology*, 13(10), pp.1224–1233.
- Arakaki, N. et al., 2007. Cell-surface H⁺-ATP synthase as a potential molecular target for anti-obesity drugs. *FEBS Letters*, 581(18), pp.3405–3409.
- Arakaki, N. et al., 2003. Possible role of cell surface H⁺ -ATP synthase in the extracellular ATP synthesis and proliferation of human umbilical vein endothelial cells. *Molecular cancer research : MCR*, 1(13), pp.931–9.
- Ashrafi, G. & Schwarz, T.L., 2013. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria. *Cell Death Differ*, 20(1), pp.31–42.
- Axe, E.L. et al., 2008. Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *Journal of Cell Biology*, 182(4), pp.685–701.
- Backer, J.M., 2016. The intricate regulation and complex functions of the Class III phosphoinositide 3-kinase Vps34. *Biochemical Journal*, 473(15), pp.2251–2271.
- Badrnya, S., Assinger, A. & Volf, I., 2013. Native high density lipoproteins (HDL) interfere with platelet activation induced by oxidized low density lipoproteins (OxLDL). *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), pp.10107–10121.
- Bago, R. et al., 2014. Characterization of VPS34-IN1, a selective inhibitor of Vps34, reveals that the phosphatidylinositol 3-phosphate-binding SGK3 protein kinase is a downstream target of class III phosphoinositide 3-kinase. *The Biochemical journal*, 463(3), pp.413–27.
- Baker, P.W. et al., 1999. Ability of reconstituted high density lipoproteins to inhibit cytokine-induced expression of vascular cell adhesion molecule-1 in human umbilical vein endothelial cells. *Journal of lipid research*, 40(2), pp.345–53.
- Barrans, A. et al., 1994. Hepatic lipase induces the formation of pre-β1 high density lipoprotein (HDL) from triacylglycerol-rich HDL2. *J. Biol. Chem.*, 269(May), pp.11572–11577.
- Di Bartolomeo, S. et al., 2010. The dynamic interaction of AMBRA1 with the dynein motor complex regulates mammalian autophagy. *Journal of Cell Biology*, 191(1), pp.155–168.
- Basso, M.D., Nambi, P. & Adelman, S.J., 2003. Effect of sirolimus on the cholesterol content of aortic arch in ApoE knockout mice. *Transplantation Proceedings*, 35(8), pp.3136–3138.

- Beck, S.J. et al., 2016. Dereglulation of mitochondrial F1Fo-ATP synthase via OSCP in Alzheimer's disease. *Nature Communications*, 7(May), pp.1–16.
- Bellot, G. et al., 2009. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Molecular and cellular biology*, 29(10), pp.2570–81.
- Bellu, A.R. et al., 2001. Glucose-induced and nitrogen-starvation-induced peroxisome degradation are distinct processes in *Hansenula polymorpha* that involve both common and unique genes. *FEMS Yeast Research*, 1(1), pp.23–31.
- Botha, C.J. et al., 2014. Analytical confirmation of *Xanthium strumarium* poisoning in cattle. *Journal of Veterinary Diagnostic Investigation*, 26(5), pp.640–645.
- Botham, K.M. & Bravo, E., 1995. The role of lipoprotein cholesterol in biliary steroid secretion. Studies with in vivo experimental models. *Progress in lipid research*, 34(1), pp.71–97.
- Bowry, V.W., Stanley, K.K. & Stocker, R., 1992. High density lipoprotein is the major carrier of lipid hydroperoxides in human blood plasma from fasting donors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 89(November), pp.10316–10320.
- Boya, P., Reggiori, F. & Codogno, P., 2013. Emerging regulation and functions of autophagy. *Nature cell biology*, 15(7), pp.713–20.
- Boyer, P.D., 2000. Catalytic site forms and controls in ATP synthase catalysis. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1458(2–3), pp.252–262.
- Brenner, C. et al., 2011. Adenine nucleotide translocase family: four isoforms for apoptosis modulation in cancer. *Oncogene*, 30(8), pp.883–895.
- Brunet, a et al., 1999. Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor. *Cell*, 96(6), pp.857–868.
- Buckley, K.A. et al., 2003. Release and interconversion of P2 receptor agonists by human osteoblast-like cells. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 17(11), pp.1401–10.
- Burrell, H.E. et al., 2003. Human keratinocytes express multiple P2Y-receptors: Evidence for functional P2Y1, P2Y2, and P2Y4 receptors. *Journal of Investigative Dermatology*, 120(3), pp.440–447.
- Burrell, H.E. et al., 2005. Human keratinocytes release ATP and utilize three mechanisms for nucleotide interconversion at the cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 280(33), pp.29667–29676.
- Burwick, N.R. et al., 2005. An inhibitor of the F1 subunit of ATP synthase (IF1) modulates the activity of angiostatin on the endothelial cell surface. *Journal of Biological Chemistry*, 280(3), pp.1740–1745.
- Cabezón, E. et al., 2003. The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nature Structural Biology*, 10(9), pp.744–750.
- Cabezón, E. et al., 2002. The structure of bovine IF1, the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. *EMBO Journal*, 20(24), pp.6990–6996.
- Calkin, A.C. et al., 2009. Reconstituted high-density lipoprotein attenuates platelet

- function in individuals with type 2 diabetes mellitus by promoting cholesterol efflux. *Circulation*, 120(21), pp.2095–2104.
- Calvo, D. et al., 1997. CLA-1 is an 85-kD plasma membrane glycoprotein that acts as a high-affinity receptor for both native (HDL, LDL, and VLDL) and modified (OxLDL and AcLDL) lipoproteins. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 17(11), pp.2341–2349.
- Camont, L., Chapman, M.J. & Kontush, A., 2011. Biological activities of HDL subpopulations and their relevance to cardiovascular disease. *Trends in Molecular Medicine*, 17(10), pp.594–603.
- Carey, M.C., 1997. Homing-in on the origin of biliary steroids. *Gut*, pp.721–722.
- Carlsson, S.R. & Simonsen, A., 2015. Membrane dynamics in autophagosome biogenesis. *Journal of cell science*, pp.1–13.
- Cavelier, C. et al., 2012. The ϵ -chain of cell surface F₀F₁ ATPase modulates ApoA-I and HDL transcytosis through aortic endothelial cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 32(1), pp.131–139.
- Cavelier, C., Rohrer, L. & Von Eckardstein, A., 2006. ATP-binding cassette transporter A1 modulates apolipoprotein A-I transcytosis through aortic endothelial cells. *Circulation Research*, 99(10), pp.1060–1066.
- Champagne, E. et al., 2006. Ecto-F₁F_o ATP synthase/F₁ ATPase: metabolic and immunological functions. *Current opinion in lipidology*, 17(3), pp.279–84.
- Chan, E.Y.W. et al., 2009. Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Molecular and cellular biology*, 29(1), pp.157–71.
- Chang, S.Y. et al., 2002. Interaction of the C-terminal domain of p43 and the α subunit of ATP synthase: Its functional implication in endothelial cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 277(10), pp.8388–8394.
- Chanussot, F. et al., 1990. Studies on the origin of biliary phospholipid. Effect of dehydrocholic acid and cholic acid infusions on hepatic and biliary phospholipids. *Biochem J*, 270(3), p.691–5.
- Chatterjee, C. & Sparks, D.L., 2014. Hepatic lipase release is inhibited by a purinergic induction of autophagy. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 33(4), pp.883–894.
- Chen, C. et al., 2004. Mitochondrial ATP Synthasome: THREE-DIMENSIONAL STRUCTURE BY ELECTRON MICROSCOPY OF THE ATP SYNTHASE IN COMPLEX FORMATION WITH CARRIERS FOR Pi AND ADP/ATP. *Journal of Biological Chemistry*, 279(30), pp.31761–31768.
- Chen, X. et al., 2012. Secreted microRNAs: A new form of intercellular communication. *Trends in Cell Biology*, 22(3), pp.125–132.
- Chevrollier, A. et al., 2011. Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(6), pp.562–567.
- Chi, S.L. & Pizzo, S. V., 2006. Cell surface F₁F_o ATP synthase: a new paradigm? *Annals of medicine*, 38(6), pp.429–38.
- Chi, S.L. & Pizzo, S. V., 2006. Angiostatin is directly cytotoxic to tumor cells at low

- extracellular pH: A mechanism dependent on cell surface-associated ATP synthase. *Cancer Research*, 66(2), pp.875–882.
- Chin, R.M. et al., 2014. The metabolite α -ketoglutarate extends lifespan by inhibiting ATP synthase and TOR. *Nature*, 510(7505), pp.397–401.
- Chung, S. et al., 2011. Adipose Tissue ATP Binding Cassette Transporter A1 Contributes to High-Density Lipoprotein Biogenesis In Vivo. *Circulation*, 124(15), pp.1663–1672.
- Cízková, A. et al., 2008. TMEM70 mutations cause isolated ATP synthase deficiency and neonatal mitochondrial encephalomyopathy. *Nature genetics*, 40(11), pp.1288–90.
- Cleyrat, C. et al., 2014. Mpl traffics to the cell surface through conventional and unconventional routes. *Traffic*, 15(9), pp.961–982.
- Cockerill, G.W. et al., 1995. High-density lipoproteins inhibit cytokine-induced expression of endothelial cell adhesion molecules. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 15(11), pp.1987–94.
- Codogno, P. & Meijer, A.J., 2013. Autophagy in the liver. *Journal of Hepatology*, 59(2), pp.389–391.
- Cohen, D.E., 1999. Hepatocellular transport and secretion of biliary lipids. *Current Opinion in Lipidology*, 10(4), pp.295–302.
- Combettes-, M. & Jacqueline, F., 1999. SR-BI et métabolisme du cholestérol. , 15, pp.1252–1258.
- Conlan, M.G. et al., 1993. Associations of factor VIII and von Willebrand factor with age, race, sex, and risk factors for atherosclerosis: The Atherosclerosis Risk in Communities (ARIC) Study. *Thrombosis and Haemostasis*, 70(3), pp.380–385.
- Contessi, S. et al., 2007. IF(1) distribution in HepG2 cells in relation to ecto-F(0)F(1)ATP synthase and calmodulin. *J Bioenerg Biomembr*, 39(4), pp.291–300.
- Cooke, J., 2003. NO and angiogenesis. *Atherosclerosis (Supplements)(Component)*.
- Cortés-Hernández, P. et al., 2005. The inhibitor protein of the F1F0-ATP synthase is associated to the external surface of endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 330(3), pp.844–849.
- Costa-Mattioli, M. & Monteggia, L.M., 2013. mTOR complexes in neurodevelopmental and neuropsychiatric disorders. *Nat Neurosci*, 16(11), pp.1537–1543.
- Covian, R. & Balaban, R.S., 2012. Cardiac mitochondrial matrix and respiratory complex protein phosphorylation. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 303(8), pp.H940-66.
- Cuervo, A.M. et al., 1998. I κ B is a substrate for a selective pathway of lysosomal proteolysis. *Molecular biology of the cell*, 9(8), pp.1995–2010.
- Cuervo, A.M. & Wong, E., 2014. Chaperone-mediated autophagy: roles in disease and aging. *Cell research*, 24(1), pp.92–104.
- Cursio, R. et al., 2015. The role of autophagy in liver diseases: Mechanisms and potential therapeutic targets. *BioMed Research International*, 2015(1), pp.15–26.
- Czaja, M.J., 2011. Functions of autophagy in hepatic and pancreatic physiology and

- disease. *Gastroenterology*, 140(7), pp.1895–1908.
- Das, B.B. et al., 1994. No Title. , 180(July).
- Dietschy, J.M. & Turley, S.D., 2004. Thematic review series: brain Lipids. Cholesterol metabolism in the central nervous system during early development and in the mature animal. *Journal of lipid research*, 45(8), pp.1375–1397.
- Donaldson, S.H., Picher, M. & Boucher, R.C., 2002. Secreted and cell-associated adenylate kinase and nucleoside diphosphokinase contribute to extracellular nucleotide metabolism on human airway surfaces. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, 26(2), pp.209–215.
- Dubouloz, F. et al., 2005. The TOR and EGO protein complexes orchestrate microautophagy in yeast. *Molecular Cell*, 19(1), pp.15–26.
- Dupont, N. et al., 2011. Autophagy-based unconventional secretory pathway for extracellular delivery of IL-1beta. *Embo J*, 30(23), pp.4701–4711.
- Duran, J.M. et al., 2010. Unconventional secretion of Acb1 is mediated by autophagosomes. *Journal of Cell Biology*, 188(4), pp.527–536.
- Duve, D.E., 1967. L. D E T E R and C H R I S T I A N D E D U V E From The Rockefeller University, New York.
- Egami, Y. et al., 2005. Induced expressions of Rab24 GTPase and LC3 in nerve-injured motor neurons. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 337(4), pp.1206–1213.
- Ejlerskov, P. et al., 2013. Tubulin polymerization-promoting protein (TPPP/p25 α) promotes unconventional secretion of α -synuclein through exophagy by impairing autophagosome-lysosome fusion. *Journal of Biological Chemistry*, 288(24), pp.17313–17335.
- Eng, C. & Abraham, R., 2011. The autophagy conundrum in cancer: influence of tumorigenic metabolic reprogramming. *Oncogene*, 30(47), pp.4687–4696.
- English, L., Chemali, M. & Desjardins, M., 2009. Nuclear membrane-derived autophagy, a novel process that participates in the presentation of endogenous viral antigens during HSV-1 infection. *Autophagy*, 5(7), pp.1026–1029.
- Eskelinen, E.L., 2006. Roles of LAMP-1 and LAMP-2 in lysosome biogenesis and autophagy. *Molecular Aspects of Medicine*, 27(5–6), pp.495–502.
- Fabre, A.C. et al., 2010. P2Y₁₃ receptor is critical for reverse cholesterol transport. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 52(4), pp.1477–1483.
- Fabre, a C.S. et al., 2006. Cell surface adenylate kinase activity regulates the F(1)-ATPase/P2Y₁₃-mediated HDL endocytosis pathway on human hepatocytes. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*, 63(23), pp.2829–37.
- Fader, C.M. et al., 2008. Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in K562 cells. *Traffic*, 9(2), pp.230–250.
- Fader, C.M. et al., 2009. TI-VAMP/VAMP7 and VAMP3/cellubrevin: two v-SNARE proteins involved in specific steps of the autophagy/multivesicular body pathways. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(12), pp.1901–1916.

- Fader, C.M. & Colombo, M.I., 2009. Autophagy and multivesicular bodies: two closely related partners. *Cell death and differentiation*, 16(1), pp.70–8.
- Feng, Y. et al., 2009. Critical role of scavenger receptor-BI – expressing bone marrow – derived endothelial progenitor cells in the attenuation of allograft vasculopathy after human apo A-I transfer. , 113(3), pp.755–764.
- Fielding, C.J. & Fieldinst, P.E., 1995. transport. , 36.
- Fluiter, K. et al., 1999. Scavenger Receptor BI Mediates the Selective Uptake of Oxidized Cholesterol Esters by Rat Liver. *Journal of Biological Chemistry*, 274(13), pp.8893–8899.
- Francis, G.A., 2010. The complexity of HDL. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1801(12), pp.1286–1293.
- Fu, Y. et al., 2011. A novel mechanism of T-lymphocyte and endothelial activation by shear stress: The role of ecto-ATP synthase β -chain. *Circulation Research*, 108(4), pp.410–417.
- Funderburk, S.F., Wang, Q.J. & Yue, Z., 2010. The Beclin 1-VPS34 complex - at the crossroads of autophagy and beyond. *Trends in Cell Biology*, 20(6), pp.355–362.
- Ganley, I.G., 2013. Autophagosome maturation and lysosomal fusion. *Essays Biochem*, 55(1), pp.65–78.
- García-Bermúdez, J. & Cuezva, J.M., 2016. The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1): A master regulator of energy metabolism and of cell survival. *Biochimica et biophysica acta*, 1857(8), pp.1167–1182.
- Garner, B. et al., 1998. Oxidation of high density lipoproteins. II. Evidence for direct reduction of lipid hydroperoxides by methionine residues of apolipoproteins AI and AII. *The Journal of biological chemistry*, 273(11), pp.6088–95.
- Gautier, T., Masson, D. & Lagrost, L., 2011. Métabolisme des lipoprotéines de haute densité (HDL). *Archives of Cardiovascular Diseases Supplements*, 3(4), pp.267–272.
- Gavaldà-Navarro, A., Mampel, T. & Viñas, O., 2016. Changes in the expression of the human adenine nucleotide translocase isoforms condition cellular metabolic/proliferative status. *Open Biology*, 6(2), p.150108.
- Ge, L., Zhang, M. & Schekman, R., 2014. Phosphatidylinositol 3-kinase and COPII generate LC3 lipidation vesicles from the ER-Golgi intermediate compartment. *eLife*, 3, p.e04135.
- Gee, H.Y. et al., 2011. Rescue of Δ 508-CFTR trafficking via a GRASP-dependent unconventional secretion pathway. *Cell*, 146(5), pp.746–760.
- Geisler, S. et al., 2010. PINK1/Parkin-mediated mitophagy is dependent on VDAC1 and p62/SQSTM1. *Nature cell biology*, 12(2), pp.119–131.
- Genoux, A. et al., 2011. Mitochondrial inhibitory factor 1 (IF1) is present in human serum and is positively correlated with HDL-cholesterol. *PLoS ONE*, 6(9).
- Genoux, A. et al., 2013. Serum IF1 concentration is independently associated to HDL levels and to coronary heart disease: the GENES study. *J Lipid Res*, 54(9), pp.2550–2558.

- Genoux, A. et al., 2016. Serum levels of mitochondrial inhibitory factor 1 are independently associated with long-term prognosis in coronary artery disease: the GENES Study. *BMC Medicine*, 14(1), p.125.
- Gerster, R. et al., 2015. Anti-inflammatory Function of High-Density Lipoproteins via Autophagy of I β B Kinase. *CMGH Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology*, 1(2), p.171–187.e1.
- Giorgio, V. et al., 2010. The ectopic FOF1 ATP synthase of rat liver is modulated in acute cholestasis by the inhibitor protein IF1. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 42(2), pp.117–123.
- Giulivi, C. et al., 2010. and activity loss in aging ATP synthase 1 F o Nitration of specific tyrosines in F. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 298(16), pp.978–987.
- Goffinet, M. et al., 2014. P2Y₁₃ receptor regulates HDL metabolism and atherosclerosis in vivo. *PLoS ONE*, 9(4).
- Gomes, L.C., Di Benedetto, G. & Scorrano, L., 2011. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation and sustain cell viability. *Nature cell biology*, 13(5), pp.589–98.
- González-Pecchi, V. et al., 2015. Apolipoprotein A-I enhances proliferation of human endothelial progenitor cells and promotes angiogenesis through the cell surface ATP synthase. *Microvascular Research*, 98, pp.9–15.
- Gonzalez, C.D. et al., 2011. The emerging role of autophagy in the pathophysiology of diabetes mellitus. *Autophagy*, 7(1), pp.2–11.
- Greig, A.V.H. et al., 2003. Purinergic receptors are part of a signaling system for keratinocyte proliferation, differentiation, and apoptosis in human fetal epidermis. *The Journal of investigative dermatology*, 121(5), pp.1145–9.
- Griffin, J.H., Mosnier, L.O. & Zlokovic, B. V., 2012. Protein C anticoagulant and cytoprotective pathways. *International Journal of Hematology*, 95(4), pp.333–345.
- Group, T.H.-T.C., 2014. Effects of Extended-Release Niacin with Laropiprant in High-Risk Patients. *New England Journal of Medicine*, 371(3), pp.203–212.
- Gu, X. et al., 1998. CELL BIOLOGY AND METABOLISM: The Efficient Cellular Uptake of High Density Lipoprotein Lipids via Scavenger Receptor Class B Type I Requires Not Only Receptor-mediated Surface Binding but Also Receptor-specific Lipid Transfer Mediated by Its Extracellula. , 273(41), pp.26338–26348.
- Le Guezennec, X. et al., 2012. Wip1-dependent regulation of autophagy, obesity, and atherosclerosis. *Cell Metabolism*, 16(1), pp.68–80.
- Gwinn, D.M. et al., 2008. AMPK Phosphorylation of Raptor Mediates a Metabolic Checkpoint. *Molecular Cell*, 30(2), pp.214–226.
- Hailey, D.W. et al., 2010. Mitochondria Supply Membranes for Autophagosome Biogenesis during Starvation. *Cell*, 141(4), pp.656–667.
- Hall, A., 2005. Rho GTPases and the control of cell behaviour. *Biochemical Society Transactions*, 33(Pt 5), pp.891–895.
- Hamasaki, M. et al., 2013. Autophagosomes form at ER-mitochondria contact sites. *Nature*, 495(7441), pp.389–393.

- Hamon, Y. et al., 2000. ABC1 promotes engulfment of apoptotic cells and transbilayer redistribution of phosphatidylserine. *Nature cell biology*, 2(7), pp.399–406.
- Hanna, R.A. et al., 2012. Microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3) interacts with Bnip3 protein to selectively remove endoplasmic reticulum and mitochondria via autophagy. *Journal of Biological Chemistry*, 287(23), pp.19094–19104.
- Harada, M., 2011. Autophagy in liver diseases. *Journal of UOEH*, 33(4), pp.337–344.
- Hardie, D.G., 2007. AMP-activated/SNF1 protein kinases: conserved guardians of cellular energy. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 8(10), pp.774–785.
- He, C. & Levine, B., 2010. The Beclin 1 interactome. *Current Opinion in Cell Biology*, 22(2), pp.140–149.
- He, Q.Y. et al., 2004. Identification of tumor-associated proteins in oral tongue squamous cell carcinoma by proteomics. *Proteomics*, 4(1), pp.271–278.
- Hejzlarová, K. et al., 2011. Expression and processing of the TMEM70 protein. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1807(1), pp.144–149.
- Hoppel, C. et al., 2002. Isolation of hepatic mitochondrial contact sites: previously unrecognized inner membrane components. *Analytical biochemistry*, 302(1), pp.60–9.
- Howard, A.D. et al., 2010. Characterization of apoA-I-dependent lipid efflux from adipocytes and role of ABCA1. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 343(1–2), pp.115–124.
- Howard, A.D. et al., 2011. The ϵ -subunit of ATP synthase is involved in cellular uptake and resecretion of apoA-I but does not control apoA-I-induced lipid efflux in adipocytes. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 348(1–2), pp.155–164.
- Huang, W. et al., 2014. Rapamycin enhances HBV production by inducing cellular autophagy. *Hepatitis Monthly*, 14(10).
- Huby, T. et al., 2006. Knockdown expression and hepatic deficiency reveal an atheroprotective role for SR-BI in liver and peripheral tissues. *Journal of Clinical Investigation*, 116(10), pp.2767–2776.
- Inoki, K. et al., 2002. TSC2 is phosphorylated and inhibited by Akt and suppresses mTOR signalling. *Nature cell biology*, 4(9), pp.648–57.
- Itakura, E. & Mizushima, N., 2013. Syntaxin 17: The autophagosomal SNARE. *Autophagy*, 9(6), pp.917–919.
- Jacquet, S. et al., 2005. The nucleotide receptor P2Y₁₃ is a key regulator of hepatic high-density lipoprotein (HDL) endocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 62(21), pp.2508–2515.
- Jäger, S. et al., 2004. Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuoles. *Journal of cell science*, 117(Pt 20), pp.4837–4848.
- Jewell, J.L. & Guan, K.L., 2013. Nutrient signaling to mTOR and cell growth. *Trends in Biochemical Sciences*, 38(5), pp.233–242.
- Jiang, X.-C., Jin, W. & Hussain, M.M., 2012. The impact of phospholipid transfer protein (PLTP) on lipoprotein metabolism. *Nutrition & metabolism*, 9(1), p.75.

- Jonas, A., 2000. Lecithin cholesterol acyltransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1529(1–3), pp.245–256.
- Jonckheere, A.I., Smeitink, J.A.M. & Rodenburg, R.J.T., 2012. Mitochondrial ATP synthase: Architecture, function and pathology. *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 35(2), pp.211–225.
- Khaminets, A., Behl, C. & Dikic, I., 2016. Ubiquitin-Dependent And Independent Signals In Selective Autophagy. *Trends in Cell Biology*, 26(1), pp.6–16.
- Kiffin, R., 2004. Activation of Chaperone-mediated Autophagy during Oxidative Stress. *Molecular Biology of the Cell*, 15(11), pp.4829–4840.
- Kim, B.W. et al., 2004. Extracellular ATP is generated by ATP synthase complex in adipocyte lipid rafts. *Experimental and Molecular Medicine*, 36(5), pp.476–485.
- Kim, J. et al., 2011. AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology*, 13(2), pp.132–41.
- Kim, K.-B. et al., 2006. Oxidation-reduction respiratory chains and ATP synthase complex are localized in detergent-resistant lipid rafts. *Proteomics*, 6(8), pp.2444–53.
- Kimura, T. et al., 2017. Dedicated SNAREs and specialized TRIM cargo receptors mediate secretory autophagy. *The EMBO journal*, 36(1), pp.42–60.
- Kimura, T. et al., 2003. High-density lipoprotein stimulates endothelial cell migration and survival through sphingosine 1-phosphate and its receptors. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 23(7), pp.1283–1288.
- Kimura, T. et al., 2010. Mechanism and role of high density lipoprotein-induced activation of AMP-activated protein kinase in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 285(7), pp.4387–4397.
- Kimura, T. et al., 2006. Role of scavenger receptor class B type I and sphingosine 1-phosphate receptors in high density lipoprotein-induced inhibition of adhesion molecule expression in endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 281(49), pp.37457–37467.
- Kimura, T., Mandell, M. & Deretic, V., 2016. Precision autophagy directed by receptor regulators - emerging examples within the TRIM family. *Journal of cell science*, 129(5), pp.881–891.
- Kineth, M.A. et al., 2007. The Golgi-Associated Protein GRASP Is Required for Unconventional Protein Secretion during Development. *Cell*, 130(3), pp.524–534.
- Kirkin, V. et al., 2009. A Role for NBR1 in Autophagosomal Degradation of Ubiquitinated Substrates. *Molecular Cell*, 33(4), pp.505–516.
- Kiššová, I. et al., 2007. Selective and Non-Selective Autophagic Degradation of Mitochondria in Yeast ND ES RIB. , 8627(August), pp.329–336.
- KLINGENBERG, M. & ROTTENBERG, H., 1977. Relation between the Gradient of the ATP/ADP Ratio and the Membrane Potential across the Mitochondrial Membrane. *European Journal of Biochemistry*, 73(1), pp.125–130.
- Ko, Y.H. et al., 2003. Mitochondrial ATP synthasome: Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP. *Journal of Biological Chemistry*,

278(14), pp.12305–12309.

- Komatsu, M. et al., 2005. Impairment of starvation-induced and constitutive autophagy in Atg7-deficient mice. *Journal of Cell Biology*, 169(3), pp.425–434.
- Kon, M. et al., 2011. Chaperone-mediated autophagy is required for tumor growth. *Science translational medicine*, 3(109), p.109ra117.
- Kowalski-Chauvel, A. et al., 2012. Identification of the F1-ATPase at the cell surface of colonic epithelial cells: Role in mediating cell proliferation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(49), pp.41458–41468.
- Kozarsky, K.F. et al., 1997. Overexpression of the HDL receptor SR-BI alters plasma HDL and bile cholesterol levels. *Nature*, 387(6631), pp.414–7.
- Kraya, A.A. et al., 2015. Identification of secreted proteins that reflect autophagy dynamics within tumor cells. *Autophagy*, 11(1), pp.60–74.
- Krick, R. et al., 2008. Piecemeal Microautophagy of the Nucleus Requires the Core Macroautophagy Genes. *Molecular Biology of the Cell*, 19(10), pp.4492–4505.
- Kubli, D. a & Gustafsson, Å.B., 2012. Mitochondria and mitophagy: the yin and yang of cell death control. *Circulation research*, 111(9), pp.1208–21.
- Kunji, E.R.S. et al., 2016. The transport mechanism of the mitochondrial ADP/ATP carrier. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1863(10), pp.2379–2393.
- Lagrost, L. et al., 1998. Structure and function of the plasma phospholipid transfer protein. *Curr Opin Lipidol*, 9(3), pp.203–209.
- Lamb, C.A. et al., 2016. TBC1D14 regulates autophagy via the TRAPP complex and ATG9 traffic. *The EMBO journal*, 35(3), pp.281–301.
- Lamb, C.A., Yoshimori, T. & Tooze, S.A., 2013. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 14(12), pp.759–774.
- Le Lay, S., Ferré, P. & Dugail, I., 2004. Adipocyte cholesterol balance in obesity. *Biochemical Society transactions*, 32, pp.103–106.
- Lazarou, M. et al., 2015. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy. *Nature*, 524(7565), pp.309–14.
- Lee, J.A. et al., 2007. ESCRT-III Dysfunction Causes Autophagosome Accumulation and Neurodegeneration. *Current Biology*, 17(18), pp.1561–1567.
- Levine, D.M. et al., 1993. In vivo protection against endotoxin by plasma high density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90(24), pp.12040–4.
- Li, W.W., Li, J. & Bao, J.K., 2012. Microautophagy: Lesser-known self-eating. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 69(7), pp.1125–1136.
- Liang, C. et al., 2006. Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nature cell biology*, 8(7), pp.688–99.
- Liang, C. et al., 2008. Beclin1-binding UVRAG targets the class C Vps complex to coordinate autophagosome maturation and endocytic trafficking. *Nature cell biology*, 10(7), pp.776–87.

- Libby, P.; Ridker, P. M.; Hansson, G.K., 2011. Progress and challenges in translating the biology of atherosclerosis. *Nature*, 473, pp.317–325.
- Lichtenstein, L. et al., 2015. Increased atherosclerosis in P2Y13/apolipoprotein E double-knockout mice: contribution of P2Y13 to reverse cholesterol transport. *Cardiovascular research*, 106(2), pp.314–23.
- Liu, L. et al., 2012. Mitochondrial outer-membrane protein FUNDC1 mediates hypoxia-induced mitophagy in mammalian cells. *Nat Cell Biol*, 14(2), pp.177–185.
- Liu, S.H. & Gottsch, J.D., 1999. Apoptosis induced by a corneal-endothelium-derived cytokine. *Investigative ophthalmology & visual science*, 40(13), pp.3152–9.
- Llorente-Folch, I. et al., 2015. The regulation of neuronal mitochondrial metabolism by calcium. *J Physiol The Journal of Physiology Neuroscience S J Physiol*, 59316(59316), pp.3447–3462.
- Loers, G. et al., 2012. The Interaction between Cell Adhesion Molecule L1, Matrix Metalloproteinase 14, and Adenine Nucleotide Translocator at the Plasma Membrane Regulates L1-Mediated Neurite Outgrowth of Murine Cerebellar Neurons. *Journal of Neuroscience*, 32(11), pp.3917–3930.
- Lupieri, A. et al., 2015. PI3K signaling in arterial diseases: Non redundant functions of the PI3K isoforms. *Advances in Biological Regulation*, 59, pp.4–18.
- Lv, L. et al., 2011. Acetylation Targets the M2 Isoform of Pyruvate Kinase for Degradation through Chaperone-Mediated Autophagy and Promotes Tumor Growth. *Molecular Cell*, 42(6), pp.719–730.
- Lyly, A. et al., 2008. Deficiency of the INCL protein Ppt1 results in changes in ectopic F1-ATP synthase and altered cholesterol metabolism. *Human Molecular Genetics*, 17(10), pp.1406–1417.
- Ma, Z. et al., 2010. Mitochondrial F1Fo-ATP synthase translocates to cell surface in hepatocytes and has high activity in tumor-like acidic and hypoxic environment. , 42(8), pp.530–537.
- Mackness, B. et al., 2004. Paraoxonase-1 inhibits oxidised LDL-induced MCP-1 production by endothelial cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 318(3), pp.680–683.
- Malaval, C. et al., 2009. RhoA/ROCK I signalling downstream of the P2Y13 ADP-receptor controls HDL endocytosis in human hepatocytes. *Cellular Signalling*, 21(1), pp.120–127.
- Mammucari, C. et al., 2007. FoxO3 Controls Autophagy in Skeletal Muscle In Vivo. *Cell Metabolism*, 6(6), pp.458–471.
- Mangiullo, R. et al., 2008. Structural and functional characterization of F(o)F(1)-ATP synthase on the extracellular surface of rat hepatocytes. *Biochimica et biophysica acta*, 1777(10), pp.1326–35.
- Manjithaya, R. et al., 2010. Unconventional secretion of *Pichia pastoris* Acb1 is dependent on GRASP protein, peroxisomal functions, and autophagosome formation. *Journal of Cell Biology*, 188(4), pp.537–546.
- Marathe, G.K., Zimmerman, G.A. & McIntyre, T.M., 2003. Platelet-activating factor acetylhydrolase, and not paraoxonase-1, is the oxidized phospholipid hydrolase of

- high density lipoprotein particles. *Journal of Biological Chemistry*, 278(6), pp.3937–3947.
- Mari, M. et al., 2010. An Atg9-containing compartment that functions in the early steps of autophagosome biogenesis. *Journal of Cell Biology*, 190(6), pp.1005–1022.
- Martinet, W. et al., 2004. 7-Ketocholesterol induces protein ubiquitination, myelin figure formation, and light chain 3 processing in vascular smooth muscle cells. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(12), pp.2296–2301.
- Martinet, W. et al., 2008. Interactions between cell death induced by statins and 7-ketocholesterol in rabbit aorta smooth muscle cells. *British journal of pharmacology*, 154(6), pp.1236–46.
- Martinet, W. & De Meyer, G.R.Y., 2009. Autophagy in atherosclerosis: A cell survival and death phenomenon with therapeutic potential. *Circulation Research*, 104(3), pp.304–317.
- Martinez, L.O. et al., 2000. Characterization of two high-density lipoprotein binding sites on porcine hepatocyte plasma membranes: Contribution of scavenger receptor class B type I (SR-BI) to the low-affinity component. *Biochemistry*, 39(5), pp.1076–1082.
- Martinez, L.O. et al., 2015. Ecto-F1-ATPase/P2Y pathways in metabolic and vascular functions of high density lipoproteins. *Atherosclerosis*, 238(1), pp.89–100.
- Martinez, L.O. et al., 2003. Ectopic beta-chain of ATP synthase is an apolipoprotein A-I receptor in hepatic HDL endocytosis. *Nature*, 421(6918), pp.75–79.
- Massey, A.C. et al., 2006. Consequences of the selective blockage of chaperone-mediated autophagy. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(15), pp.5805–10.
- Mayr, J.A. et al., 2010. Mitochondrial ATP synthase deficiency due to a mutation in the ATP5E gene for the F1 ϵ subunit. *Human Molecular Genetics*, 19(17), pp.3430–3439.
- Mercer, C.A., Kaliappan, A. & Dennis, P.B., 2009. A novel, human Atg13 binding protein, Atg101, interacts with ULK1 and is essential for macroautophagy. *Autophagy*, 5(5), pp.649–662.
- Mineo, C. et al., 2003. High density lipoprotein-induced endothelial nitric-oxide synthase activation is mediated by Akt and MAP kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), pp.9142–9149.
- Miyazaki, E. et al., 2005. Switching the sorting mode of membrane proteins from cotranslational endoplasmic reticulum targeting to posttranslational mitochondrial import. *Mol Biol Cell*, 16(4), pp.1788–1799.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. & Levine, B., 2010. Methods in Mammalian Autophagy Research. *Cell*, 140(3), pp.313–326.
- Mizushima, N., Yoshimori, T. & Ohsumi, Y., 2011. The Role of Atg Proteins in Autophagosome Formation. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 27(1), pp.107–132.
- Mookerjee-Basu, J. et al., 2010. F1-Adenosine Triphosphatase Displays Properties Characteristic of an Antigen Presentation Molecule for V 9V 2 T Cells. *The Journal of Immunology*, 184(12), pp.6920–6928.

- Moser, T.L. et al., 1999. Angiostatin binds ATP synthase on the surface of human endothelial cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96(6), pp.2811–6.
- Moser, T.L. et al., 2001. Endothelial cell surface F1-F0 ATP synthase is active in ATP synthesis and is inhibited by angiostatin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(12), pp.6656–61.
- Mowery, Y.M. & Pizzo, S. V., 2008. Targeting cell surface F1F0 ATP synthase in cancer therapy. *Cancer Biology and Therapy*, 7(11), pp.1837–1839.
- Mozaffarian, D. et al., 2016. *Heart disease and stroke statistics-2016 update a report from the American Heart Association*,
- Muesch, a et al., 1990. A novel pathway for secretory proteins? *Trends in Biochemical Sciences*, 15, pp.86–88.
- Murphy, A.J. et al., 2008. High-density lipoprotein reduces the human monocyte inflammatory response. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 28(11), pp.2071–2077.
- Murphy, A.J. et al., 2011. Neutrophil activation is attenuated by high-density lipoprotein and apolipoprotein A-I in vitro and in vivo models of inflammation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 31(6), pp.1333–1341.
- Narita, M., 2011. Spatial Coupling of mTOR. *Autophagy*, 966(May), pp.966–70.
- Navab, M. et al., 2000. Normal high density lipoprotein inhibits three steps in the formation of mildly oxidized low density lipoprotein: step 1. *Journal of lipid research*, 41(9), pp.1481–94.
- Neuspiel, M. et al., 2008. Cargo-Selected Transport from the Mitochondria to Peroxisomes Is Mediated by Vesicular Carriers. *Current Biology*, 18(2), pp.102–108.
- Nikoletopoulou, V., Papandreou, M.-E. & Tavernarakis, N., 2015. Autophagy in the physiology and pathology of the central nervous system. *Cell death and differentiation*, 22(3), pp.398–407.
- Nofer, J.-R. et al., 1998. HDL3-Mediated Inhibition of Thrombin-Induced Platelet Aggregation and Fibrinogen Binding Occurs via Decreased Production of Phosphoinositide-Derived Second Messengers 1,2-Diacylglycerol and Inositol 1,4,5-tris-Phosphate. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 18(6), pp.861–869.
- Nofer, J.R. et al., 2001. Suppression of Endothelial Cell Apoptosis by High Density Lipoproteins (HDL) and HDL-associated Lysosphingolipids. *Journal of Biological Chemistry*, 276(37), pp.34480–34485.
- Norata, G.D., 2005. High-Density Lipoproteins Induce Transforming Growth Factor- 2 Expression in Endothelial Cells. *Circulation*, 111(21), pp.2805–2811.
- O'Reilly, M.S. et al., 1994. Angiostatin: A novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a lewis lung carcinoma. *Cell*, 79(2), pp.315–328.
- Obatomi, D.K. & Bach, P.H., 1998. Biochemistry and toxicology of the diterpenoid glycoside atractyloside. *Food and Chemical Toxicology*, 36(4), pp.335–346.
- Ohman, T. et al., 2014. Dectin-1 Pathway Activates Robust Autophagy-Dependent

- Unconventional Protein Secretion in Human Macrophages. *The Journal of Immunology*, 192(12), pp.5952–5962.
- Orsi, A. et al., 2012. Dynamic and transient interactions of Atg9 with autophagosomes, but not membrane integration, are required for autophagy. *Mol Biol Cell*, 23(10), pp.1860–1873.
- Ouimet, M. et al., 2011. Autophagy regulates cholesterol efflux from macrophage foam cells via lysosomal acid lipase. *Cell Metabolism*, 13(6), pp.655–667.
- Pankiv, S. et al., 2007. p62/SQSTM1 binds directly to Atg8/LC3 to facilitate degradation of ubiquitinated protein aggregates by autophagy*[S]. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), pp.24131–24145.
- Papandreou, I. et al., 2008. Hypoxia signals autophagy in tumor cells via AMPK activity, independent of HIF-1, BNIP3, and BNIP3L. *Cell death and differentiation*, 15(10), pp.1572–1581.
- Parzych, K.R. & Klionsky, D.J., 2014. An overview of autophagy: morphology, mechanism, and regulation. *Antioxidants & redox signaling*, 20(3), pp.460–73.
- Pasquier, B. et al., 2015. Discovery of (2S)- 8-[(3R)- 3-Methylmorpholin-4-yl]-1-(3-methyl-2-oxobutyl)-2-(trifluoromethyl)-3,4-dihydro- 2Hpyrimido[1,2- a]pyrimidin-6-one: A Novel Potent and Selective Inhibitor of Vps34 for the Treatment of Solid Tumors. *J. Med. Chem.*, 58(1), pp.376–400.
- Pattingre, S. et al., 2005. Bcl-2 antiapoptotic proteins inhibit Beclin 1-dependent autophagy. *Cell*, 122(6), pp.927–939.
- Phillips, M.C., 2014. Molecular mechanisms of cellular cholesterol efflux. *Journal of Biological Chemistry*, 289(35), pp.24020–24029.
- Piccioli, P. & Rubartelli, A., 2013. The secretion of IL-1?? and options for release. *Seminars in Immunology*, 25(6), pp.425–429.
- Pickrell, A.M. & Youle, R.J., 2015. The roles of PINK1, Parkin, and mitochondrial fidelity in parkinson's disease. *Neuron*, 85(2), pp.257–273.
- Ponpuak, M. et al., 2015. Secretory autophagy. *Current Opinion in Cell Biology*, 35(Figure 1), pp.106–116.
- Portal, I. et al., 1993. Importance of high-density lipoprotein-phosphatidylcholine in secretion of phospholipid and cholesterol in bile. *The American Journal of Physiology*, 264(6 Pt 1), pp.G1052--1056.
- Del Puerto, A., Wandosell, F. & Garrido, J.J., 2013. Neuronal and glial purinergic receptors functions in neuron development and brain disease. *Frontiers in cellular neuroscience*, 7(October), p.197.
- Pullman, M.E. & Monroy, G.C., 1963. A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase Occurring Adenosine Inhibitor of Mitochondrial Triphosphatase *. *Journal of Biological Chemistry*, 238(11), pp.3762–3769.
- Puri, C. et al., 2013. Diverse autophagosome membrane sources coalesce in recycling endosomes. *Cell*, 154(6), pp.1285–1299.
- Quillen, E.E. et al., 2006. Ectoadenylate kinase and plasma membrane ATP synthase activities of human vascular endothelial cells. *Journal of Biological Chemistry*,

281(30), pp.20728–20737.

- Van Raaij, M.J. et al., 1996. The ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria: The minimal inhibitory sequence. *Biochemistry*, 35(49), pp.15618–15625.
- Rabouille, C., Malhotra, V. & Nickel, W., 2012. Diversity in unconventional protein secretion. *Journal of Cell Science*, 125(22), pp.5251–5255. 3
- Radichev, I.A. et al., 2009. Biochemical evidence of the interactions of membrane type-1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP) with adenine nucleotide translocator (ANT): potential implications linking proteolysis with energy metabolism in cancer cells. *Biochemical Journal*, 420(1), pp.37–47.
- Radojkovic, C. et al., 2009. Stimulation of cell surface F1-ATPase activity by apolipoprotein A-I inhibits endothelial cell apoptosis and promotes proliferation. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 29(7), pp.1125–1130.
- Rahman, M. et al., 2014. Drosophila sirt2/mammalian SIRT3 deacetylates ATP synthase ?? and regulates complex V activity. *Journal of Cell Biology*, 206(2), pp.289–305.
- Rai, A.K. et al., 2013. Ectopic F0F1 ATP synthase contains both nuclear and mitochondrially-encoded subunits. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 45(6), pp.569–579.
- Rambold, A.S. et al., 2011. Tubular network formation protects mitochondria from autophagosomal degradation during nutrient starvation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(25), pp.10190–10195.
- Rämet, M.E. et al., 2003. High-density lipoprotein increases the abundance of eNOS protein in human vascular endothelial cells by increasing its half-life. *Journal of the American College of Cardiology*, 41(12), pp.2288–2297.
- Ravikumar, B. et al., 2010. Plasma membrane contributes to the formation of pre-autophagosomal structures. *Nat Cell Biol*, 12(8), pp.747–757.
- Razani, B. et al., 2012. Autophagy links inflammasomes to atherosclerotic progression. *Cell Metabolism*, 15(4), pp.534–544.
- Reggiori, F. & Tooze, S.A., 2012. Autophagy regulation through Atg9 traffic. *Journal of Cell Biology*, 198(2), pp.151–153.
- Robins, S.J. & Fasulo, J.M., 1997. High density lipoproteins, but not other lipoproteins, provide a vehicle for sterol transport to bile. *Journal of Clinical Investigation*, 99(3), pp.380–384.
- Rogler, G. et al., 1995. HDL-Mediated Efflux of Intracellular Cholesterol Is Impaired in Fibroblasts From Tangier Disease Patients. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 15(5), pp.683–690.
- Rogov, V. et al., 2014. Interactions between Autophagy Receptors and Ubiquitin-like Proteins Form the Molecular Basis for Selective Autophagy. *Molecular Cell*, 53(2), pp.167–178.
- Rohrer, L. et al., 2009. High-density lipoprotein transport through aortic endothelial cells involves scavenger receptor BI and ATP-binding cassette transporter G1. *Circulation Research*, 104(10), pp.1142–1150.

- Romanov, J. et al., 2012. Mechanism and functions of membrane binding by the Atg5-Atg12/Atg16 complex during autophagosome formation. *The EMBO journal*, 31(22), pp.4304–17.
- Rosenson, R.S. et al., 2011. HDL measures, particle heterogeneity, proposed nomenclature, and relation to atherosclerotic cardiovascular events. *Clinical Chemistry*, 57(3), pp.392–410.
- Rühle, T. & Leister, D., 2015. Assembly of F1F0-ATP synthases. *Biochimica et biophysica acta*, 1847(9), pp.849–860.
- Sahani, M.H., Itakura, E. & Mizushima, N., 2014. Expression of the autophagy substrate SQSTM1/p62 is restored during prolonged starvation depending on transcriptional upregulation and autophagy-derived amino acids. *Autophagy*, 10(3), pp.431–441.
- Sarkar, S. et al., 2005. Lithium induces autophagy by inhibiting inositol monophosphatase. *Journal of Cell Biology*, 170(7), pp.1101–1111.
- Sarkar, S., 2013. Regulation of autophagy by mTOR-dependent and mTOR-independent pathways: autophagy dysfunction in neurodegenerative diseases and therapeutic application of autophagy enhancers. *Biochemical Society Transactions*, 41(5), pp.1103–30.
- Sarraf, S.A. et al., 2013. Landscape of the PARKIN-dependent ubiquitylome in response to mitochondrial depolarization. *Nature*, 496(7445), pp.372–6.
- Schmidt, C. et al., 2008. Amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide bind to ATP synthase and regulate its activity at the surface of neural cells. *Molecular psychiatry*, 13(10), pp.953–969.
- Schwartz, C.C. et al., 1978. Multicompartmental Analysis of Cholesterol Metabolism in Man. *Journal of Clinical Investigation*, 61(2), pp.408–423.
- Schwartz, G.G. et al., 2009. Rationale and design of the dal-OUTCOMES trial: Efficacy and safety of dalcetrapib in patients with recent acute coronary syndrome. *American Heart Journal*, 158(6).
- Scotet, E. et al., 2005. Tumor recognition following Vgamma9Vdelta2 T cell receptor interactions with a surface F1-ATPase-related structure and apolipoprotein A-I. *Immunity*, 22(1), pp.71–80.
- Seetharam, D. et al., 2006. High-density lipoprotein promotes endothelial cell migration and reendothelialization via scavenger receptor-B type I. *Circulation Research*, 98(1), pp.63–72.
- Sergeant, N. et al., 2003. Association of ATP synthase ϵ -chain with neurofibrillary degeneration in Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 117(2), pp.293–303.
- Serhan, N. et al., 2013. Chronic pharmacological activation of P2Y₁₃ receptor in mice decreases HDL-cholesterol level by increasing hepatic HDL uptake and bile acid secretion. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1831(4), pp.719–725.
- Seva, C., Dickinson, C.J. & Yamada, T., 1994. Growth-Promoting Glycine-Extended. , 17(22), pp.3–6.
- Shaw, R.J. et al., 2004. The LKB1 tumor suppressor negatively regulates mTOR signaling. *Cancer Cell*, 6(1), pp.91–99.

- Shih, D.M. et al., 1998. Mice lacking serum paraoxonase are susceptible to organophosphate toxicity and atherosclerosis. *Nature*, 394(July), pp.284–287.
- Shimobayashi, M. & Hall, M.N., 2014. Making new contacts: the mTOR network in metabolism and signalling crosstalk. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 15(3), pp.155–62.
- Soubannier, V. et al., 2012. A vesicular transport pathway shuttles cargo from mitochondria to lysosomes. *Current Biology*, 22(2), pp.135–141.
- Soulet, C. et al., 2004. Gi-dependent and -independent mechanisms downstream of the P2Y₁₂ ADP-receptor. *Journal of Thrombosis and Haemostasis*, 2(1), pp.135–146.
- De Stefano, D. et al., 2014. Restoration of CFTR function in patients with cystic fibrosis carrying the F508del-CFTR mutation. *Autophagy*, 10(11), pp.2053–2074.
- Stolz, A., Ernst, A. & Dikic, I., 2014. Cargo recognition and trafficking in selective autophagy. *Nature cell biology*, 16(6), pp.495–501.
- Strong, A. & Rader, D.J., 2010. Clinical Implications of Lipid Genetics for Cardiovascular Disease. *Current Cardiovascular Risk Reports*, 4(6), pp.461–468.
- Suc, I. et al., 1997. HDL and ApoA prevent cell death of endothelial cells induced by oxidized LDL. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology*, 17(10), pp.2158–66.
- Suen, D.-F. et al., 2010. Parkin overexpression selects against a deleterious mtDNA mutation in heteroplasmic cybrid cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(26), pp.11835–11840.
- Sugatani, J. et al., 1996. High-density lipoprotein inhibits the synthesis of platelet-activating factor in human vascular endothelial cells. *J Lipid Mediat Cell Signal*, 13(1), pp.73–88.
- Sugiura, A. et al., 2014. A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles. *The EMBO Journal*, 33(19), pp.2142–2156.
- Sumi, M. et al., 2007. Reconstituted high-density lipoprotein stimulates differentiation of endothelial progenitor cells and enhances ischemia-induced angiogenesis. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 27(4), pp.813–818.
- T.P. Ashford and K.R. Porter., 1962. Downloaded from on February.
- Tall, A.R. et al., 2008. HDL, ABC Transporters, and Cholesterol Efflux: Implications for the Treatment of Atherosclerosis. *Cell Metabolism*, 7(5), pp.365–375.
- Tanaka, Y. et al., 2000. Accumulation of autophagic vacuoles and cardiomyopathy in LAMP-2-deficient mice. *Nature*, 406(6798), pp.902–906.
- Temel, R.E. & Brown, J.M., 2015. A new model of reverse cholesterol transport: EnTICEing strategies to stimulate intestinal cholesterol excretion. *Trends in Pharmacological Sciences*, 36(7), pp.440–451.
- Tso, C. et al., 2006. High-density lipoproteins enhance progenitor-mediated endothelium repair in mice. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 26(5), pp.1144–1149.
- Uittenbogaard, A. et al., 2000. High Density Lipoprotein Prevents Oxidized Low Density

- Lipoprotein-induced Inhibition of Endothelial Nitric-oxide Synthase Localization and Activation in Caveolae *. , 275(15), pp.11278–11283.
- van der Vaart, A., Griffith, J. & Reggiori, F., 2010. Exit from the Golgi Is Required for the Expansion of the Autophagosomal Phagophore in Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Biology of the Cell*, 21(13), pp.2270–2284.
- Vane, J.R. & Botting, R.M., 1995. Pharmacodynamic profile of prostacyclin. *The American Journal of Cardiology*, 75(3 SUPPL. 1).
- Vantourout, P. et al., 2008. Ecto-F1-ATPase and MHC-class I close association on cell membranes. *Molecular Immunology*, 45(2), pp.485–492.
- Velikkakath, A.K. et al., 2012. Mammalian Atg2 proteins are essential for autophagosome formation and important for regulation of size and distribution of lipid droplets. *Mol Biol Cell*, 23(5), pp.896–909.
- Vickers, K.C. et al., 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature Cell Biology*, 13(4), pp.423–433.
- Vindis, C., 2015. Autophagy: An emerging therapeutic target in vascular diseases. *British Journal of Pharmacology*, 172(9), pp.2167–2178.
- Viswambharan, H. et al., 2004. Reconstituted High-Density Lipoprotein Inhibits Thrombin-Induced Endothelial Tissue Factor Expression Through Inhibition of RhoA and Stimulation of Phosphatidylinositol 3-Kinase but not Akt/Endothelial Nitric Oxide Synthase. *Circulation Research*, 94(7), pp.918–925.
- Voight, B.F. et al., 2012. Plasma HDL cholesterol and risk of myocardial infarction: A mendelian randomisation study. *The Lancet*, 380(9841), pp.572–580.
- Wai, T. & Langer, T., 2016. Mitochondrial Dynamics and Metabolic Regulation. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 27(2), pp.105–117.
- Walker, J.E., 2012. The ATP synthase: The understood, the uncertain and the unknown. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817, p.S1.
- Wan, G. et al., 2008. Apolipoprotein L1, a novel Bcl-2 homology domain 3-only lipid-binding protein, induces autophagic cell death. *Journal of Biological Chemistry*, 283(31), pp.21540–21549.
- Wang, J. et al., 2008. Effect of a novel inhibitory mAb against ??-subunit of F1F0 ATPase on HCC. *Cancer Biology and Therapy*, 7(11), pp.1829–1835.
- Wang, L.-J. et al., 2014. The Microtubule-associated Protein EB1 Links AIM2 Inflammasomes with Autophagy-dependent Secretion. *Journal of Biological Chemistry*, 289(42), pp.29322–29333.
- Wang, N. et al., 1996. Scavenger Receptor BI (SR-BI) Is Up-regulated in Adrenal Gland in Apolipoprotein A-I and Hepatic Lipase Knock-out Mice. , pp.21001–21004.
- Wang, S., Peng, D. & Yi, Y., 2016. The unsolved mystery of apoA-I recycling in adipocyte. *Lipids in Health and Disease*, 15(1), p.35.
- Wang, Z.G., White, P.S. & Ackerman, S.H., 2001. Atp11p and Atp12p are Assembly Factors for the F1-ATPase in Human Mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 276(33), pp.30773–30778.

- Wei, Y. et al., 2008. JNK1-Mediated Phosphorylation of Bcl-2 Regulates Starvation-Induced Autophagy. *Molecular Cell*, 30(6), pp.678–688.
- Weichhart, T., Hengstschlager, M. & Linke, M., 2015. Regulation of innate immune cell function by mTOR. *Nature reviews. Immunology*, 15(10), pp.599–614.
- Weidberg, H. et al., 2010. LC3 and GATE-16/GABARAP subfamilies are both essential yet act differently in autophagosome biogenesis. *The EMBO journal*, 29(11), pp.1792–802.
- Wen-Li, Z. et al., 2012. Inhibition of the ecto-beta subunit of F1F0-ATPase inhibits proliferation and induces apoptosis in acute myeloid leukemia cell lines. *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, 31(1), p.92.
- White, E., 2015. the role for autophagy in cancer (White, 2015).pdf. *Journal of Clinical Investigation*, 125(1), pp.42–46.
- Williams, A. et al., 2008. Novel targets for Huntington's disease in an mTOR-independent autophagy pathway. *Nature chemical biology*, 4(5), pp.295–305.
- Wittig, I. et al., 2010. Assembly and oligomerization of human ATP synthase lacking mitochondrial subunits a and A6L. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, 1797(6–7), pp.1004–1011.
- Wittig, I. & Schägger, H., 2008. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et biophysica acta*, 1777(7–8), pp.592–598.
- Wong, Y.C. & Holzbaur, E.L.F., 2014. Optineurin is an autophagy receptor for damaged mitochondria in parkin-mediated mitophagy that is disrupted by an ALS-linked mutation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(42), pp.E4439-48.
- Wu, W. et al., 2014. ULK1 translocates to mitochondria and phosphorylates FUNDC1 to regulate mitophagy. *EMBO Reports*, 15(5), pp.566–575.
- Wu, Y.T. et al., 2010. Dual role of 3-methyladenine in modulation of autophagy via different temporal patterns of inhibition on class I and III phosphoinositide 3-kinase. *Journal of Biological Chemistry*, 285(14), pp.10850–10861.
- Xu, K. et al., 2010. Autophagy plays a protective role in free cholesterol overload-induced death of smooth muscle cells. *Journal of lipid research*, 51(9), pp.2581–2590.
- Yamamoto, H. et al., 2012. Atg9 vesicles are an important membrane source during early steps of autophagosome formation. *Journal of Cell Biology*, 198(2), pp.219–233.
- Yamamoto, K. et al., 2007. Involvement of cell surface ATP synthase in flow-induced ATP release by vascular endothelial cells. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, 293(June 2007), pp.H1646–H1653.
- Yang, M.S., Yu, L.C. & Gupta, R.C., 2004. Analysis of changes in energy and redox states in HepG2 hepatoma and C6 glioma cells upon exposure to cadmium. *Toxicology*, 201(1–3), pp.105–113.
- Yegutkin, G.G., 2008. Nucleotide- and nucleoside-converting ectoenzymes: Important modulators of purinergic signalling cascade. *Biochim Biophys Acta*.
- Yegutkin, G.G., Henttinen, T. & Jalkanen, S., 2001. Extracellular ATP formation on vascular endothelial cells is mediated by ecto-nucleotide kinase activities via

- phosphotransfer reactions. *The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 15(1), pp.251–260.
- Ylä-Anttila, P. et al., 2009. 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy*, 5(8), pp.1180–1185.
- Yonally, S.K. & Capaldi, R.A., 2006. The F1F0 ATP synthase and mitochondrial respiratory chain complexes are present on the plasma membrane of an osteosarcoma cell line: An immunocytochemical study. *Mitochondrion*, 6(6), pp.305–314.
- Yoshii, S.R. & Mizushima, N., 2015. Autophagy machinery in the context of mammalian mitophagy. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1853(10), pp.2797–2801.
- Zaffagnini, G. & Martens, S., 2016. Mechanisms of Selective Autophagy. *Journal of Molecular Biology*, 428(9), pp.1714–1724.
- Zhang, M. et al., 2015. Translocation of interleukin-1?? into a vesicle intermediate in autophagy-mediated secretion. *eLife*, 4(NOVEMBER2015).
- Zhang, Q. et al., 2010. Essential role of HDL on endothelial progenitor cell proliferation with PI3K/Akt/cyclin D1 as the signal pathway. *Experimental biology and medicine (Maywood, N.J.)*, 235(9), pp.1082–1092.
- Zhang, X. et al., 2008. Dual functions of a monoclonal antibody against cell surface F1F0 ATP synthase on both HUVEC and tumor cells. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(8), pp.942–950.
- Zhang, Y.-L. et al., 2010. The autophagy-lysosome pathway: a novel mechanism involved in the processing of oxidized LDL in human vascular endothelial cells. *Biochemical and biophysical research communications*, 394(2), pp.377–382.
- Zhao, J. et al., 2007. FoxO3 Coordinately Activates Protein Degradation by the Autophagic/Lysosomal and Proteasomal Pathways in Atroaching Muscle Cells. *Cell Metabolism*, 6(6), pp.472–483.

ANNEXES

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

Articles scientifiques

Cardouat G, Duparc T, Fried S, Perret B, Najib S* and Martinez LO*. Ectopic adenine nucleotide translocase activity controls extracellular ADP levels and regulates the F₁-ATPase-mediated HDL endocytosis pathway on hepatocytes. BBA- Molecular and Cell Biology of Lipids (ELS).

Accepté

Communications orales et affichées :

Guillaume Cardouat, Laurent Martinez, and Souad Najib

“Unexpected role of autophagy in targeting functional mitochondrial ATP synthase to the plasma membrane.” 39th ELC Meeting, European Lipoprotein Club, 5-8 septembre 2016, Tutzing, Allemagne (Poster).

Guillaume Cardouat, Steven Fried, Laurent Martinez, and Souad Najib

“Un rôle inattendue de l'autophagie dans l'adressage de l'ATP synthase mitochondriale à la surface cellulaire – implication dans le métabolisme des HDL” Journée du club autophagie toulousain - workshop, 1^{er} juin 2016, Toulouse, France (communication orale).

Guillaume Cardouat, Laurent Martinez, and Souad Najib

“Unexpected role of autophagy in targeting functional mitochondrial ATP synthase to the plasma membrane.” 84th EAS Congress, European Atherosclerosis Society, 29 Mai – 1^{er} juin 2016, Innsbruck, Autriche (communication orale).

Guillaume Cardouat, Laurent Martinez, and Souad Najib

“Un rôle inattendue de l'autophagie dans l'adressage de l'ATP synthase mitochondriale à la surface cellulaire – implication dans le métabolisme des HDL” Printemps de la Cardiologie, Groupe de Réflexion sur la Recherche Cardiovasculaire, GRRC, 7-8 avril 2016, Dijon, France (communication orale & communication affichée).

Guillaume Cardouat, Steven Fried, Laurent Martinez, and Souad Najib

“Unexpected role of autophagy in targeting functional mitochondrial ATP synthase to the plasma membrane.” Keystone symposia, Mitochondrial Dynamics, 3-7 avril 2016, Steamboat springs, Colorado, USA (communication affichée).

Guillaume Cardouat, Laurent Martinez, and Souad Najib.

“Role of autophagy and/or mitophagy in F₁-ATP synthase plasma membrane targeting: A new therapeutic target for atherosclerosis.” Journée de l'école doctorale BSB, Avril 2015, Toulouse, France (communication orale).

Rôle de l'autophagie et du métabolisme nucléotidique extracellulaire dans la régulation de la voie ecto-F₁-ATPase d'endocytose des HDL

L'effet protecteur des HDL sur les pathologies cardio-vasculaires est principalement attribué à leur rôle central dans le "Transport Retour du Cholestérol" (TRC). Ce processus assure l'efflux du cholestérol excédentaire des cellules périphériques vers le foie, au niveau duquel il est éliminé dans les sécrétions biliaires.

Dans ce contexte, notre équipe a identifié à la surface des cellules hépatiques la présence d'un complexe enzymatique, très proche de l'ATP synthase mitochondriale, comme étant un récepteur de haute affinité pour l'apoA-I (protéine majoritaire des HDL). Cette ATP synthase de surface, également appelée ecto-F₁-ATPase, joue un rôle clef dans l'endocytose hépatique des HDL. En effet, la liaison de l'apoA-I stimule l'activité ATPasique de l'enzyme, entraînant la production d'ADP extracellulaire puis l'activation spécifique du récepteur nucléotidique P2Y₁₃, aboutissant *in fine* à l'endocytose des HDL. Ainsi, l'équipe a montré le rôle clé de la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃ dans l'endocytose hépatique des HDL et par conséquent dans les effets protecteurs de ces derniers dans l'athérosclérose.

Les travaux de thèse présentés ici visent à déterminer les mécanismes de régulation de cette ecto-F₁-ATPase.

Compte tenu de l'importance de la régulation des taux d'ADP et d'ATP extracellulaires dans l'endocytose des HDL, nous nous sommes intéressés dans un premier temps aux acteurs moléculaires qui pourraient réguler le métabolisme nucléotidique à la surface cellulaire. Nous avons mis en évidence la présence, à la surface des cellules HepG₂, de l'adénine nucléotide translocase (ANT), une autre protéine classiquement localisée à la mitochondrie. Nous avons montré que l'ecto-ANT est impliquée dans la régulation des taux des nucléotides adényliques ADP et ATP extracellulaires et que son fonctionnement est lui-même dépendant du taux de ces derniers dans le milieu extracellulaire. De plus, nous avons montré que l'ecto-ANT est également impliquée dans la régulation de l'ADP généré suite à l'activation de l'ecto-F₁-ATPase, régulant ainsi négativement l'endocytose des HDL dépendante de la voie ecto-F₁-ATPase/P2Y₁₃.

Dans un second temps, nous nous sommes intéressés aux mécanismes impliqués dans l'adressage de l'ecto-F₁-ATPase à la membrane plasmique. Cette ecto-F₁-ATPase a été identifiée à la surface de divers types cellulaires où elle est impliquée dans une variété de processus physiologiques et physiopathologiques. Cependant, à l'heure actuelle, le mécanisme d'adressage de cette enzyme à la membrane plasmique reste inconnu.

Nous avons montré que le processus d'autophagie est nécessaire à l'expression de l'enzyme à la membrane plasmique. En effet, nous avons montré que l'autophagie induite par la carence en nutriments augmente l'expression de la F₁-ATPase à la membrane plasmique. De manière intéressante, cette translocation est dépendante de la machinerie impliquée dans la formation de l'autophagosome, mais n'emprunte pas la voie canonique impliquant la fusion de l'autophagosome avec le lysosome. Nous avons également démontré que l'augmentation d'expression de l'ecto-F₁-ATPase en réponse à l'autophagie est corrélée à une endocytose plus importante des HDL par les hépatocytes, et que cette augmentation est dépendante de la voie ecto-F₁-ATPase.