

ANNEXE IV MÉCANISME DE L'AUTOPHAGIE

Les cellules eucaryotes utilisent deux moyens principaux pour éliminer les organites et molécules devenus inutiles ou nocifs, et en particulier les protéines : l'autophagie et le système ubiquitine-protéasome. L'autophagie est un processus de destruction non discriminatoire. Le système ubiquitine-protéasome agit d'une manière beaucoup plus sélective, car il impose une marque aux protéines avant de les faire disparaître (*annexe X.B*). Il existe d'autres différences entre les deux mécanismes. Le premier dégrade surtout les protéines à longue vie, tandis que le second assure le renouvellement des protéines à vie courte. Par ailleurs, le protéasome ne peut pas détruire les agrégats de protéines, alors que l'autophagie est capable de le faire.

IV.A. FONCTIONS

Dans l'ensemble, l'autophagie peut être considérée comme un processus favorable à la santé des cellules. Elle les protège contre certains envahisseurs qui réussissent à s'introduire dans le cytoplasme. Toutefois, certaines virus et certaines bactéries pathogènes échappent à la destruction par la voie autophagique. C'est le cas notamment pour le bacille de Koch et la légionnelle. L'autophagie protège aussi les cellules contre la sénescence métabolique en éliminant les mitochondries détériorées, qui produisent des quantités excessives de dérivés nocifs de l'oxygène, ainsi que les protéines endommagées par ces dérivés. Les acides aminés libérés lors de la dégradation des protéines ne sont pas perdus. Ils peuvent être réutilisés pour en construire de nouvelles. Un tel recyclage se produit aussi lorsque les cellules souffrent d'une carence alimentaire, et surtout d'un apport insuffisant en azote organique.

Certaines cellules, et notamment les neurones, recourent à l'autophagie pour éliminer les agrégats de protéines qui nuisent à leur fonctionnement. De fait, certaines formes de dégénérescence cérébrale, telles que les maladies d'Alzheimer et de Huntington, s'accompagnent d'un défaut dans l'exécution de l'autophagie. Les neurones des malades accumulent des vésicules autophagiques (*section B*), ce qui montre que le phénomène ne se déroule pas normalement.

L'autophagie peut aussi protéger l'organisme contre le cancer. D'une manière générale, ce processus est stimulé par les suppresseurs de tumeurs, tels que P53** (*section F*) et PTEN**. Le comportement du promoteur d'autophagie appelé bécline* (**BECLIN**) plaide en faveur de l'implication de l'autophagie dans le processus de cancérisation. Chez l'homme, le gène *BECLIN1* est délété dans 40 à 70 % des cas identifiés de cancer du sein ou de l'utérus. Par ailleurs, les souris hétérozygotes *becn1*^{+/-}, dont un allèle du gène *becn1* a été inactivé par la technique de l'inactivation in vitro (*annexe XI*) souffrent fréquemment de cancer.

IV.B. ASPECTS CELLULAIRES

L'autophagie se manifeste par l'apparition dans le cytoplasme de vésicules délimitées par une double membrane, appelées autophagosomes (*fig. IV.A*). L'origine des membranes limitantes reste assez obscure. L'hypothèse la plus vraisemblable est qu'elles dérivent du réticulum endoplasmique. Les vésicules englobent une région du cytoplasme et tous les éléments qui s'y trouvent, dont les plus aisément reconnaissables sont les mitochondries. Les vésicules fusionnent ensuite avec le compartiment des lysosomes, ce qui entraîne la destruction de leur contenu.

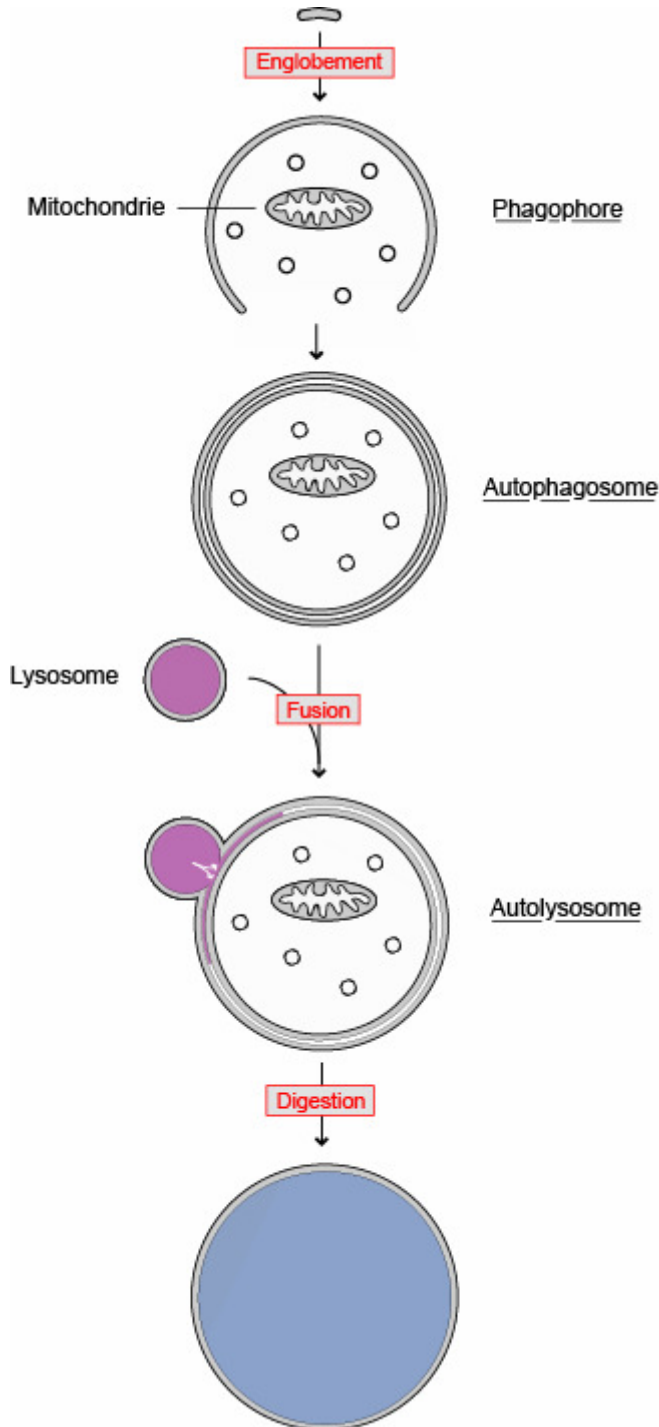


Fig. IV.A. Mécanisme de l'autophagie chez les mammifères.

Le processus commence par la formation de vésicules appelées phagophores tant qu'elles sont encore ouvertes et autophagosomes, lorsqu'elles se referment complètement et acquièrent une seconde membrane. Les autophagosomes séquestrent une partie du cytoplasme avec tous les éléments, figurés ou non, qu'il contient. La membrane externe des autophagosomes fusionne ensuite avec celle des lysosomes, ce qui crée une nouvelle variété de vésicules, dénommées autolysosomes. Les enzymes hydrolytiques contenus dans les lysosomes se répandent dans les vésicules et font disparaître leur membrane interne, puis tous les constituants du cytoplasme qu'elles ont inclus.

Du point de vue cytologique, il est difficile de faire la distinction entre les différentes étapes de l'autophagie, parce que les vésicules englobantes ont souvent moins d'un micron de diamètre. La méthode d'étude la plus appropriée est la microscopie électronique. Mais elle pose des problèmes, car les membranes des vésicules peuvent être facilement confondues avec celles qui délimitent les divers compartiments du cytoplasme. L'emploi du microscope photonique pose également des problèmes. Pour mettre en évidence les vésicules, il faut disposer d'anticorps fluorescents dirigés contre les protéines des membranes. Mais les images obtenues par ce procédé ne sont pas toujours claires. Il est souvent impossible d'identifier les divers types de vésicules d'autolyse (*fig. IV.A*), spécialement dans les cellules où leur taille est très faible.

IV.D. ASPECTS MOLÉCULAIRES

De nombreux gènes gouvernent l'autophagie. Ils ont été d'abord caractérisés chez la levure, à cause des facilités qu'offre l'analyse génétique chez cet organisme et de la grande taille de ses lysosomes (appelés vacuoles). Une trentaine de gènes sont indispensables pour que l'autophagie se déroule normalement. Ils sont désignés par le sigle *atg***. Leurs produits ont des fonctions très diverses. On y trouve notamment quatre protéines membranaires (ATG2, ATG9, ATG18 et ATG22), une protéine kinase (ATG1), une protéase (ATG4), une lipase (ATG15), un cofacteur associé à une kinase (ATG6), deux protéines de fonction similaire à celle de l'ubiquitine (ATG8 et ATG12), et trois enzymes agissant sur ces protéines (*annexe IX.A*), l'un de type E1 (ATG7) et les deux autres de type E2 (ATG3 et ATG10).

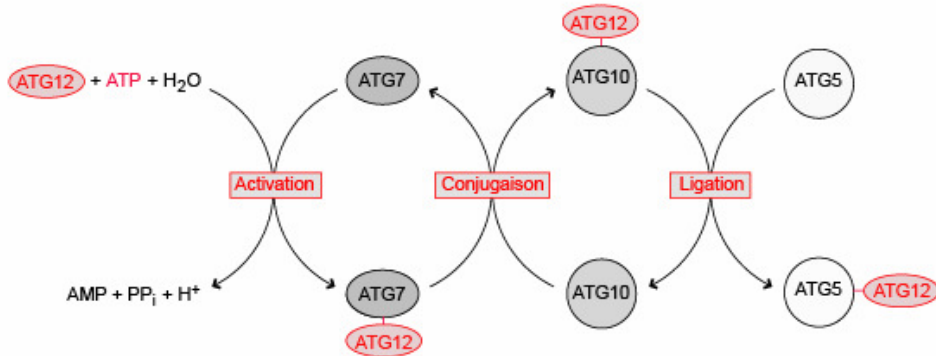
Parmi ces protéines, quelques-unes ont des fonctions bien définies (*tabl. IV*). La kinase ATG1 inhibe la formation des autophagosomes. La protéine ATG6 forme un complexe avec la kinase PI3K** de type III. La lipase ATG15 intervient dans la dégradation des membranes incluses dans les vacuoles. L'activase ATG7 et la conjugase ATG10 catalysent la fixation de l'étiquette ATG12 sur la protéine ATG5 (*fig. IV.B.1*), par un mécanisme qui ressemble à la fixation de l'ubiquitine sur diverses protéines cibles (*annexe X.A*). De même, l'activase ATG7 et la conjugase ATG3 catalysent la fixation de l'étiquette ATG8 sur un lipide membranaire (la phosphatidyléthanolamine ou PE). L'ATG8 subit une manipulation supplémentaire, parce qu'elle ne peut être activée par l'ATG7 que si elle est coupée au préalable par la protéase ATG4, qui fait apparaître une glycine à l'une de ses extrémités. Le composé ATG8-PE est capable de former des oligomères, qui interviendraient dans l'expansion et la fermeture des membranes des phagophores.

Tabl. IV. Propriétés de quelques protéines ATG de la levure

Protéine	Nature ou fonction	Effet sur l'autophagie
ATG1	Protéine kinase	↘
ATG2	Protéine membranaire	-
ATG3	Enzyme de type E2 (conjugase)	↗
ATG4	Protéase	↗
ATG5	Substrat de l'ATG12	↗
ATG6	Cofacteur de la kinase PI3K III	↗
ATG7	Enzyme de type E1 (activase)	↗
ATG8	Étiquette → lipide	↗
ATG9	Protéine membranaire	-
ATG10	Enzyme de type E2 (conjugase)	↗
ATG12	Étiquette → protéine	↗
ATG15	Lipase	↗
ATG18	Protéine membranaire	-
ATG22	Protéine membranaire	-

Plusieurs protéines ATG découvertes chez la levure ont des orthologues* chez les animaux, et en particulier chez les mammifères. En général, ces protéines sont désignées par le même sigle. L'ATG6 fait exception, car son équivalent chez les mammifères est appelé bécline. La fonction des protéines ATG a été étudiée par la méthode d'inactivation des gènes (*annexe X*). La bécline est une protéine indispensable parce que les fœtus de souris qui en sont dépourvus (*becn^{-/-}*) meurent avant le milieu de la gestation. Les cellules ES** provenant des fœtus avortés ne peuvent pas accomplir correctement l'autophagie. Les cellules *atg3^{-/-}* ne forment pas de vésicules autophagiques, parce que les membranes isolantes ne se développent pas normalement. Les souris dont les gènes *atg5* ou *atg7* sont invalidés uniquement dans les cellules nerveuses souffrent de dégénérescence neuronale, ce qui montre que l'autophagie joue un rôle protecteur dans ce type de cellules.

1. Formation du conjugué ATG5-ATG12



2. Formation du conjugué PE-ATG8

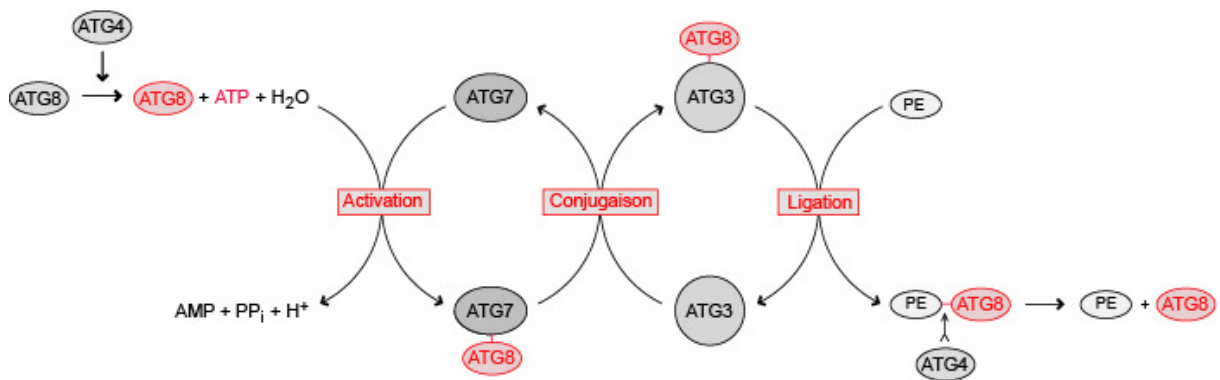


Fig. IV.B. Formation des conjugués ATG5-ATG12 et PE-ATG8.

Les deux processus font intervenir deux types d'enzymes qui jouent des rôles similaires à ceux que jouent les enzymes impliqués dans la fixation de l'ubiquitine sur une protéine cible.

- 1..Un enzyme de type E1 (l'ATG7) active la protéine ATG12, puis la transfère à un enzyme de type E2 (l'ATG10), qui la fixe à son tour sur la protéine ATG5
- 2..La formation du conjugué PE-ATG8 diffère de deux façons de celle du conjugué ATG5-ATG12. En premier lieu, la protéase ATG4 coupe la protéine ATG8 avant qu'elle soit activée par la protéine ATG7. En second lieu, la conjugase ATG10 est remplacée par une autre (l'ATG3), qui utilise comme substrat un lipide au lieu d'une protéine. Notons encore que la formation du conjugué PE-ATG8 est un processus réversible, parce qu'il peut être coupé par la protéase ATG4.

IV.F. RÔLE DES PROTÉINES P53 ET BCL2 ET DES IONS Ca^{2+}

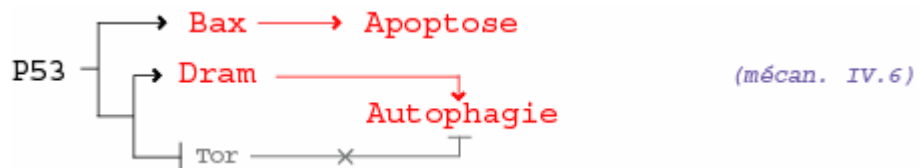
La protéine P53 peut promouvoir l'autophagie de différentes manières (*annexe XVI.M*). Elle stimule la synthèse de la protéine **Dram** (*Damage regulated autophagy modulator*) qui favoriserait la fusion des lysosomes et des autophagosomes. Elle ferme aussi la voie PKB/Akt**, ce qui inactive la kinase Tor et lève l'inhibition que celle-ci exerce sur l'autophagie (*mécan.IV.2*).

Selon certains auteurs, la protéine antiapoptotique BCL2** inhiberait l'autophagie parce qu'elle se lie à la bécline et l'empêche d'exercer son action. Suivant d'autres, BCL2 aurait plutôt un effet stimulateur sur ce même processus.

Le rôle des ions Ca^{2+} est moins controversé. Apparemment, ces ions inhibent l'effet inhibiteur de la protéine Tor grâce à une chaîne d'interaction faisant intervenir deux kinases.

IV.G. RELATION ENTRE L'APOPTOSE ET L'AUTOPHAGIE

L'apoptose et l'autophagie concourent l'une et l'autre à la destruction des cellules. La protéine P53 stimule les deux processus, le premier parce qu'elle active le facteur Bax (*annexe III.C.2*), et le second, parce qu'elle accroît la synthèse ou l'activité des protéines Dram et Tor (*mécan. IV.4 et IV.5*) :



Cependant, les cellules peuvent recourir à l'autophagie sans pour autant se suicider. C'est ce qui se produit notamment lorsqu'elles reçoivent un apport insuffisant en substances nutritives. Il se pourrait que la protéine BCL2** et les ions Ca^{2+} participent à cette régulation différentielle. Mais le mécanisme de cette régulation reste à élucider, car BCL2 a des effets incertains sur l'autophagie (*section F*). Il en va de même en ce qui concerne l'influence des ions Ca^{2+} sur l'apoptose (*annexe III.C.8*).

BIBLIOGRAPHIE

- Crichton D, Wilkinson S, O'Prey J, Syed N *et al.* DRAM, a p53-induced modulator of autophagy, is critical for apoptosis. *Cell* 2006; **126**: 121-34.
- Fruman DA, Meyers RE, Cantley LC. Phosphoinositide kinases. *Ann Rev Biochem* 1998; **67**: 481-507.
- Klionsky DJ. Good riddance to bad rubbish. *Nature* 2006; **441**: 819-20.
- Klionsky DJ, Cregg JM, Dunn WA, Emr SD *et al.* A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev Cell* 2003; **5**: 539-45.
- Liang XH, Jackson S, Seaman M, Brown K *et al.* Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. *Nature* 1999; **402**: 672-6.
- Lockshin RA, Zakeri Z. Apoptosis, autophagy, and more. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 2405-19.
- Marx J. Autophagy: is it cancer's friend or foe? *Science* 2006; **312**: 1160-1.
- Meijer AJ, Codogno P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 2445-62.
- Misushima N. Methods for monitoring autophagy. *Int J Biochem Cell Biol* 2004; **36**: 2491-502.
- Misushima N. Autophagy: process and function. *Genes Dev* 2007; **21**: 2861-73.
- Subramani S, Farré J-C. A ubiquitin-like protein involved in membrane fusion. *Cell* 2007; **130**: 18-20.
- Swerdlow S, Distelhorst CW. Bcl-2-related calcium signals as common mediators of both apoptosis and autophagy. *Dev Cell* 2007; **12**: 178-9.