

Université de Montréal

**Développement d'une méthode d'isolation des noyaux
adaptée aux macrophages pour une caractérisation
protéomique d'une nouvelle structure autophagique
induite par le virus HSV-1**

par

Takoua Boukhris

Département de microbiologie et immunologie

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures

en vue de l'obtention du grade de maîtrise

en microbiologie et immunologie

Avril, 2011

© Takoua Boukhris, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**Développement d'une méthode d'isolation des noyaux
adaptée aux macrophages pour une caractérisation
protéomique d'une nouvelle structure autophagique
induite par le virus HSV-1**

Présentée par :
Takoua Boukhris

A été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Guy Lemay, président-rapporteur

Dr. Michel Desjardins, directeur de recherche

Dr. Hugo Soudeyns, membre du jury

Résumé

L'autophagie est un processus cellulaire catabolique qui a été conservé durant l'évolution de la levure à l'homme. Cet important mécanisme consiste en une dégradation des composants cytoplasmiques dans une structure lytique, le lysosome. Il existe trois types de l'autophagie : la microautophagie, l'autophagie médiée par les chaperones et la macroautophagie nommée « autophagie ».

Il a été démontré que lors de l'autophagie, le matériel cytoplasmique (protéines cytosoliques et organites) est séquestré dans l'autophagosome qui finit par fusionner avec le lysosome, formant ainsi l'autophagolysosome. Le matériel séquestré et la membrane interne de l'autophagosome seront dégradés par les hydrolases lysosomales. Plusieurs études se sont focalisées sur la détermination de la machinerie moléculaire et les mécanismes de l'autophagie. Il a été démontré l'implication de 31 molécules Atg essentielles dans le processus de l'autophagie. L'identification de ces protéines a permis de déceler le rôle de l'autophagie non seulement dans le maintien de l'homéostasie cellulaire mais aussi dans la défense contre les agents pathogènes. En effet, l'autophagie joue un rôle important dans l'immunité innée conduisant à contrôler l'évasion des pathogènes dont les bactéries et les virus. Également, l'autophagie est impliquée dans l'immunité adaptative en favorisant la présentation des antigènes viraux par le CMH de classe II aux cellules T CD4⁺. De plus, une étude récente suggère que l'autophagie contribue à la présentation antigénique par le CMH de classe I aux cellules T CD8⁺ durant une infection virale par le virus HSV-1 (Herpes simplex type 1). Toutefois, certains virus y compris HSV-1 ont pu développer des mécanismes pour contourner et inhiber en partie le rôle protecteur de l'autophagie. Récemment, une étude dans notre laboratoire a mis en évidence, lors d'une infection virale par HSV-1 des cellules macrophages BMA, la présence d'une nouvelle structure autophagique dans une phase tardive de l'infection. Cette nouvelle structure est différente des autophagosomes classiques à double membrane et est caractérisée morphologiquement par quatre membranes dérivées de l'enveloppe nucléaire interne et externe. Peu de choses ont été rapportées sur cette nouvelle voie autophagique qui peut être un mécanisme de défense cellulaire quand l'autophagie classique dans le cytosol est inhibée par HSV-1.

Il devient donc intéressant de caractériser les molécules impliquées dans la formation de ces autophagosomes issus du noyau par spectrométrie de masse. Pour ce faire, il était impératif d'établir un outil d'isolation des noyaux à partir de macrophages infectés par HSV-1 dans lesquels les autophagosomes issus des noyaux seront formés. La validation de cette méthode d'isolation a été effectuée en déterminant la pureté et l'intégrité des noyaux isolés à partir des cellules non infectées (contrôle) et infectées par HSV-1. La pureté des préparations de noyaux isolés a été caractérisée par l'absence de contaminants cellulaires et un enrichissement en noyaux. Également, il a fallu déterminer la cinétique de formation des autophagosomes issus des noyaux pour les deux lignées cellulaires de macrophages utilisées dans ce projet. Dans une perspective future, l'analyse protéomique à partir des échantillons purs des noyaux isolés (non infectés et infectés) mènera à identifier les protéines impliquées dans la formation des autophagosomes dérivés des noyaux, ce qui permettra ultérieurement d'effectuer des études sur les mécanismes moléculaires et les fonctions de cette nouvelle voie autophagique.

Mots clés : autophagie, autophagosome, Herpes simplex type 1, macrophage, isolation des noyaux, contamination cellulaire, protéomie.

Abstract

Autophagy is a catabolic cellular process that has been conserved during evolution from yeast to humans. More specifically, it consists of the degradation of cytoplasmic components within a lytic structure, the lysosome. There are at least three distinct types of autophagy; microautophagy, chaperone-mediated-autophagy, and macroautophagy which often referred to simply as “autophagy” in the literature.

It has been shown that during this type of autophagy, cytoplasmic material (cytosolic proteins and organelles) are sequestered in autophagosomes which fuse with lysosomes, forming autophagolysosomes where the sequestered material and the internal membrane of the autophagosomes are degraded by lysosomal hydrolases.

Many studies have focused on understanding the molecular machinery and mechanism of autophagy. It has been shown that 31 autophagy proteins (Atg) are implicated and essential in the autophagic process. More importantly, the identification of these proteins has permitted the discovery of the role of autophagy not only in the maintenance of cellular homeostasis but also in host defense against pathogenic agents. Autophagy plays an important role in innate immunity by clearing and destroying intracellular pathogens like bacteria and viruses. Autophagy is also implicated in adaptive immunity, by promoting the presentation of viral antigens on MHC class II molecules to CD4⁺ T cells. A recent study has shown that autophagy also contributes to antigen presentation on MHC class I molecules to CD8⁺ T cells during infection with Herpes simplex virus type 1 (HSV-1). Certain viruses including herpes viruses have developed mechanisms to inhibit autophagy. Interestingly, a recent study in our lab revealed the presence of a new autophagic structure that occurred during the late phase of viral infection of BMDM macrophages with HSV-1. These structures are different from the classic double membrane autophagosomes, and are morphologically characterized by four membranes emerging from the inner and outer nuclear envelope.

Very little was known about this novel nuclear-membrane autophagy pathway, which might function as a cellular defense mechanism when classic autophagy in the cytosol is inhibited by the virus. It is therefore of great interest to characterize the proteins involved in the formation of these autophagosomes from the nucleus by mass spectrometry. In order to do

so, it was imperative to establish a protocol for the isolation of nuclei from HSV-1 infected macrophages which carry nuclear autophagosomes on their envelope. The validation of this isolation method was carried out by determining the purity of isolated nuclei in uninfected (mock) and infected macrophages. The purity of isolated nuclei was characterized by the absence of cellular contaminants derived from other cellular organites and enrichment in nuclei. Moreover, the kinetic of autophagosome formation on the nuclei during infection had to be determined for the two macrophage cell lines used during this project. As a future perspective, a proteomic analysis of pure samples of isolated nuclei (uninfected and infected) should identify proteins implicated in the formation of autophagosomes derived from the nuclei, and thus allow further studies of the molecular mechanism and functions of this novel autophagy pathway.

Key words: autophagy, autophagosome, Herpes simplex type 1, macrophage, nuclei isolation, cellular contamination, proteomics.

Table des matières

Résumé	iii
Abstract	v
Liste des tableaux	ix
Liste des figures	x
Listes des abréviations	xiii
Remerciements	xv
Introduction	1
1. L'autophagie :	2
1.1 Définition et différents types de l'autophagie	2
1.2 Biogenèse des autophagosomes	12
1.3 Mécanismes moléculaires de l'autophagie.....	15
1.4 Régulation et contrôle de l'autophagie	22
1.5 Rôles de l'autophagie	26
2. Caractéristique du virus Herpes simplex type 1 HSV-1	32
2.1 Caractéristique morphologique du HSV-1	32
2.2 Xénophagie et mécanisme d'évasion du HSV-1	32
3. Isolation des organites.....	35
4. Introduction au projet de recherche.....	36
Matériels et Méthodes	39
1. Culture cellulaire	40
2. Virus et infection des cellules	40
3. Immunofluorescence des macrophages.....	40
4. Isolation des noyaux.....	41
4.1 Homogénéisation des cellules	43
4.2 Purification des noyaux.....	43
5. Préparation du lysat cellulaire total (TCL).....	46
6. Dosages des protéines par la méthode EZQ (Invitrogen)	46

7. Étude de la pureté des noyaux isolés.....	47
7.1 Immunobuvardage de type western blot.....	47
7.2 Microscopie électronique.....	49
Résultats	51
1. Étude de la cinétique de la formation des autophagosomes issus des noyaux.....	52
2. Isolation des noyaux des cellules macrophages.....	57
2.1 Comparaison des rendements en noyaux en fonction des différentes méthodes d'isolation appliquées.....	57
2.2 Étude de la pureté des préparations de noyaux.....	60
Discussion	79
1. Étude de la cinétique de la formation des autophagosomes issus des noyaux chez les cellules macrophages durant une infection par le virus HSV-1.....	81
2. Isolation des noyaux des cellules macrophages.....	82
2.1 Rendements en noyaux obtenus par les différentes techniques testées.....	82
2.2 Étude de la pureté des préparations de noyaux isolés de cellules macrophages.....	84
Conclusion	90
Bibliographie	i

Liste des tableaux

Tableau 1 : Les protéines clés impliquées dans le processus de l'autophagie	18
Tableau 2 : Les anticorps utilisés pour l'immunobuvardage des échantillons de noyaux isolés.....	48

Liste des figures

Figure 1 : Les deux formes de l'autophagie : la microautophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperones.....	3
Figure 2 : Les étapes de PMN chez <i>S. cerevisiae</i> (image adaptée de Krick et al., 2008).	5
Figure 3 : Autophagie médiée par les chaperones (CMA).....	7
Figure 4 : Représentation schématique du processus de la macroautophagie.	8
Figure 5 : Le processus de la macromitophagie (mitophagie) dans la levure.....	10
Figure 6 : Modèle schématique de la macropéxophagie (péxophagie).....	12
Figure 7 : Biogenèse des autophagosomes dans les cellules de mammifères.....	13
Figure 8 : Modèle schématique d'origine de l'autophagosome dans les cellules de mammifères	15
Figure 9 : Les protéines impliquées dans les différentes phases de l'autophagie.....	16
Figure 10 : Les protéines impliquées dans l'étape d'initiation de la nucléation de la membrane isolée.	20
Figure 11 : Régulation négative de l'autophagie par l'activation de la protéine kinase mTOR.....	24
Figure 12 : L'implication de l'autophagie dans plusieurs mécanismes immunitaires.....	28
Figure 13 : Évasion de certains virus de l'immunité innée contrôlée par l'autophagie.....	30
Figure 14: Inhibition de l'autophagie par HSV-1.	35
Figure 15 : Visualisation par microscopie électronique des autophagosomes dérivés du noyau lors d'une infection par HSV-1.	38
Figure 16 : Méthode utilisée pour l'isolation des noyaux de cellules macrophages.....	45
Figure 17 : Microscopie à fluorescence de l'expression de LC3b et de la glycoprotéine virale gB par les cellules macrophages RAW kb infectées par le virus HSV-1 F WT à divers temps d'infection (6, 8 et 10 heures) et par les cellules macrophages non infectées (contrôle).....	53
Figure 18 : Analyse par fluorescence de la cinétique de la formation de l'autophagosome issu de noyaux en détectant le signal de LC3a.....	54

Figure 19 : Immunofluorescence envers les marqueurs LC3b et gB chez les cellules BMA C11 infectées par HSV-1 F WT pour 6, 8, 10 hpi.	55
Figure 20 : Analyse par la microscopie à fluorescence du LC3a et VP5 dans les cellules macrophages BMA C11 infectées par le virus HSV-1 F WT pour une variété de temps d'infection (6, 8 et 10 hpi).....	56
Figure 21 : Rendements en noyaux des cellules macrophages RAW kb isolés.....	59
Figure 22 : Immunobuvardage des noyaux trouvés à la fraction 29/35% d'optiprep.....	61
Figure 23 : Images par la microscopie électronique des noyaux RAW kb isolés par différentes méthodes.	61
Figure 24 : Visualisation par la microscopie électronique de la pureté des noyaux isolés. .	63
Figure 25 : Visualisation par immunobuvardage de l'état de pureté des noyaux.	65
Figure 26 : Images par la microscopie électronique des noyaux isolés de cellules macrophages RAW kb par la méthode d'isolation des noyaux adaptée du groupe du Dr Roger Lippé (Rémillard-Labrosse et al., 2006)	66
Figure 27 : Immunobuvardages des noyaux obtenus par le cassage des cellules RAW kb avec un tampon de lyse incluant le détergent Triton X-100 0.1% et la purification sur un gradient de sucre.....	68
Figure 28 : Analyse par la microscopie électronique des noyaux non infectés isolés par la lyse avec un tampon de lyse et le cell cracker et la purification par la centrifugation sur un gradient de sucre.....	69
Figure 29 : Visualisation par immunobuvardage des noyaux isolés.....	69
Figure 30 : Analyse par immunobuvardage du matériel obtenu dans le culot.....	71
Figure 31 : Analyse par immunobuvardage du culot et de la fraction à l'interface 30/35% des préparations de noyaux isolés à partir de différentes quantités initiales de cellules BMA C11 non infectées.....	73
Figure 32 : Microscopie électronique des noyaux des cellules BMA C11 isolés.....	74
Figure 33 : Analyse par western blot des préparations de noyaux isolés non infectés présents dans le culot et traités avec le tampon TP.....	75
Figure 34 : Analyse par immunobuvardage des préparations de noyaux infectés par HSV-1 et non infectés.	76

Figure 35 : Observation par la microscopie électronique des autophagosomes issus des noyaux BMA C11 infectés par HSV-1 WT isolés à partir des cellules macrophages infectées pour 8 hpi. 77

Liste des abréviations

AMBRA-1	Activating Molecules in Beclin 1 Regulated Autophagy-1
AMPK	AMP-dependent kinase
Atg	Autophagy-related gene
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
CMA	Chaperone-mediated autophagy
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
DMEM	Dulbecco's modified essential medium
DTT	Dithiothréitol
eIF2 α	Facteur d'élongation eucaryotique 2 α
EBNA-1	Epstein-Barr virus nuclear antigen 1
FBS	Sérum fœtal de bovin
FIP200	Focal adhesion kinase (FAK) familyinteracting protein of 200 kD
gB	Glycoprotéine B
HB	Homogenisation buffer
HM	Milieu d'homogénéisation
hpi	Hour postinfection
Hsc	Heat shock cognate
Hsp	Heat shock protein
HSV-1	Herpes simplex virus type 1
ICP	Infected cell proteins
JNK-1	c-Jun N-terminal kinase-1
KDa	Kilodalton
LAMP-2a	Lysosome-associated membrane protein type-2A
LC3	Microtubule-associated protein 1 light chain 3
MAPK	Mitogen- activated protein kinases
MOI	Multiplicity of infection
mTOR	Mammalian target of rapamycin
MyD88	Myeloid differentiation primary response gene 88
nm	Nanomètre

Nvj	Nuclear vacuole junction
PAS	Pre-autophagosome structure
PBS	Phosphate buffer saline
PCNA	Proliferation cellular nuclear antigen
PERK	Double-stranded RNA-activated protein kinase-like ER kinase
PKD	Phosphatase kinase D
PKR	Double-stranded RNA-activated protein kinase
PMN	Piecemeal microautophagy of the nucleus
PI3K	Phosphatidylinositol 3-kinase
PRR	Pattern recognition receptor
Rab7	Ras-related GTP-binding protein 7
RE	RE
rpm	Rotation par minute
RPMN	Réseau de protéomique de Montréal
RSB	Reticulocyte standard buffer
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SKD1	Suppressor of K ⁺ transport growth defect1
SNARE	SNAP (soluble NSF attachment protein) receptors
TAP	Transporter associated with antigen processing
TCL	Total cell lysate
TLR	Toll-like receptor
TMV	Tobacco mosaic virus
UVRAG	Ultra-violet radiation resistance associated gene
VPS34	Vacuolar protein sorting 34

Remerciements

Je tiens énormément à remercier le Dr Michel Desjardins qui m'a accueilli au sein de son laboratoire de recherche et qui m'a donné l'opportunité de travailler sur un projet formidable et très motivant. Je remercie aussi tous les membres du laboratoire du Dr Desjardins notamment : Christiane Rondeau, Dr Sophie Duclos, Shayan Sadeghi, Dr Magali Chemali, Jonathan Boulais et Annie laplante. Un remerciement spécial pour le Dr Luc English pour l'aide apportée et les conseils précieux durant toute la durée de ma maîtrise. Je désire remercier en particulier la post-doctorante Kerstin Radkte pour l'énorme soutien qu'elle m'a accordé. Un gros merci au laboratoire du Dr Roger Lippé pour toute l'expertise et les souches virales fournies.

Je souhaite également remercier du fond du cœur mon compagnon Mohamed Gaha qui m'a soutenu et encouragé continuellement tout au long de la réalisation de ce projet. Finalement je souhaite exprimer toute ma gratitude à ma famille et ma meilleure amie, Imen abdelmadjid, de m'avoir épaulé régulièrement.

Introduction

1. L'autophagie :

1.1 Définition et différents types de l'autophagie

1.1.1 Définition de l'autophagie

Chez les cellules eucaryotes, il existe deux voies principales pour éliminer les constituants cytoplasmiques devenus obsolètes : l'autophagie et le système ubiquitine-protéasome (Periyasamy-Thandavan et al., 2009). Le protéasome assure une dégradation constitutive des protéines menant à un renouvellement continu des protéines de courte durée de vie (Glickman et Ciechanover, 2002; Periyasamy-Thandavan et al., 2009). Pour l'autophagie, des constituants intracellulaires sont délivrés au lysosome pour aboutir à leur dégradation (De Duve et Wattiaux, 1966). Ainsi, l'autophagie constitue une voie alternative qui cible la dégradation des protéines essentiellement de longues durées de vie (Henell et al., 1987; Seglen et al., 1990; Reggiori et Klionsky, 2002; Bampton et al., 2005). L'autophagie est un processus catabolique cellulaire conservé au cours de l'évolution de la levure à l'homme (Shintani et Klionsky, 2004) qui aboutit à la dégradation des composants cellulaires incluant le cytosol et les organites cellulaires par l'autophagolysosome (Levine et Klionsky 2004; Cuervo 2004; Klionsky 2005; Inoue et al., 2006; Akiko et al., 2007; Crotzer et Blum, 2010). Ce processus d'autodigestion est induit à un niveau basal et sous des conditions de stress physiologique pour assurer la survie et le maintien de l'homéostasie cellulaire, notamment par le recyclage des nutriments essentiels à la cellule et l'élimination des protéines nocives et endommagées (Klionsky et Emr, 2000). Le mécanisme de l'autophagie est observé non seulement chez la levure et les cellules de mammifères, mais il se produit aussi chez la plante (Chen et al., 1994; Moriyasu et Oshumi, 1996).

1.1.2 Les différents types de l'autophagie

Il existe trois types majeurs de l'autophagie, soit la microautophagie, l'autophagie médiée par des protéines chaperones et la macroautophagie (Figure 1). Cette dernière représente la forme majeure de l'autophagie et elle peut être subdivisée en différentes sous catégories, notamment la mitophagie, le péxophagie, la « RE-phagy », la crinophagie et la xénophagie.

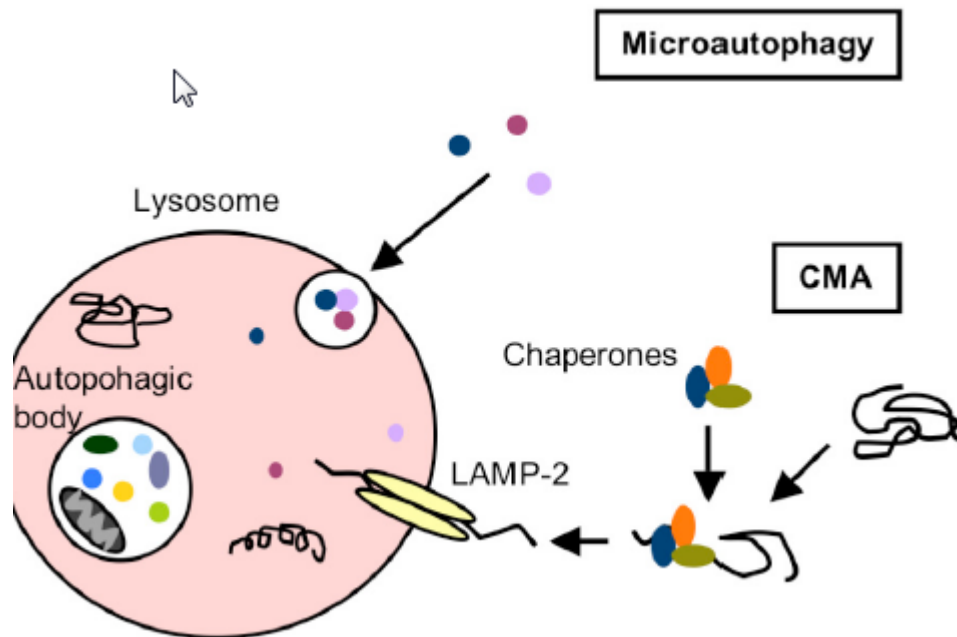


Figure 1 : Les deux formes de l'autophagie : la microautophagie et l'autophagie médiée par les protéines chaperones.

Durant la microautophagie, des invaginations de la membrane lysosomale englobent une partie du cytoplasme, entraînant sa dégradation. Dans le cas de l'autophagie médiée par des protéines chaperones, des protéines du cytosol entrent dans le compartiment lysosomal via l'interaction avec les chaperones cytoplasmiques, menant ainsi à leur digestion par les hydrolases lysosomales (image provenant de Knecht et al., 2009).

1.1.2.1 La microautophagie

Chez la levure, la microautophagie a été largement documentée tandis que peu d'études concernent la microautophagie des cellules de mammifères. Durant la microautophagie, des invaginations de la membrane lysosomale englobent du matériel cytoplasmique et subséquemment des vésicules (corps autophagiques) bourgeonnent dans le lumen du compartiment lysosomal, menant ainsi à la dégradation de ces composants cytoplasmiques internalisés (Kunz et al., 2004; Crotzer et Blum, 2010). Des études récentes ont identifié deux molécules clés qui agissent durant la microautophagie, apocalmoduline et le « vacuolar transporter chaperone » (VTC) (Deretic 2008). La microautophagie favorise la dégradation des composants cytosoliques solubles et la digestion d'une portion nucléaire.

Cette forme de l'autophagie, nommée piecemeal microautophagy of the nucleus (PMN), a été observée seulement chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* et correspond à une directe invagination et scission de la membrane nucléaire dans une vacuole résultant d'une dégradation par les hydrolases (Roberts et al., 2003; Uttenweiler et al., 2005). Le PMN se produit en plusieurs stades sous des conditions de carence en nutriments. En effet, la jonction noyau-vacuole (NV) est formée par l'interaction de la protéine nucléaire Nvj1 et la protéine vacuolaire Vac8 (stade I). Le bourgeonnement de la jonction NV donne lieu à une invagination dans la membrane vacuolaire (stade II), suivie par une formation d'une bulle nucléaire attachée à la vacuole (stade III). Après la fusion avec les extensions de la membrane vacuolaire (stade IV), une vésicule limitée par trois membranes est lâchée dans le lumen vacuolaire afin de la dégrader (stade V) (Figure 2). Une autre forme de microautophagie appelée micropexophagie a été uniquement caractérisée chez la levure méthylotrophique, *Pichia pastoris*, entraînant la dégradation du peroxysome (Farré et Subramani, 2004; Dunn et al., 2005; Sakai et al., 2006).

La microautophagie peut induire aussi la dégradation hydrolytique sélective des organites tels que la mitochondrie. Cette forme de microautophagie est nommée la micromitophagie. Durant la micromitophagie, la mitochondrie est directement assimilée par le lysosome et/ou la vacuole (Todde et al., 2009).

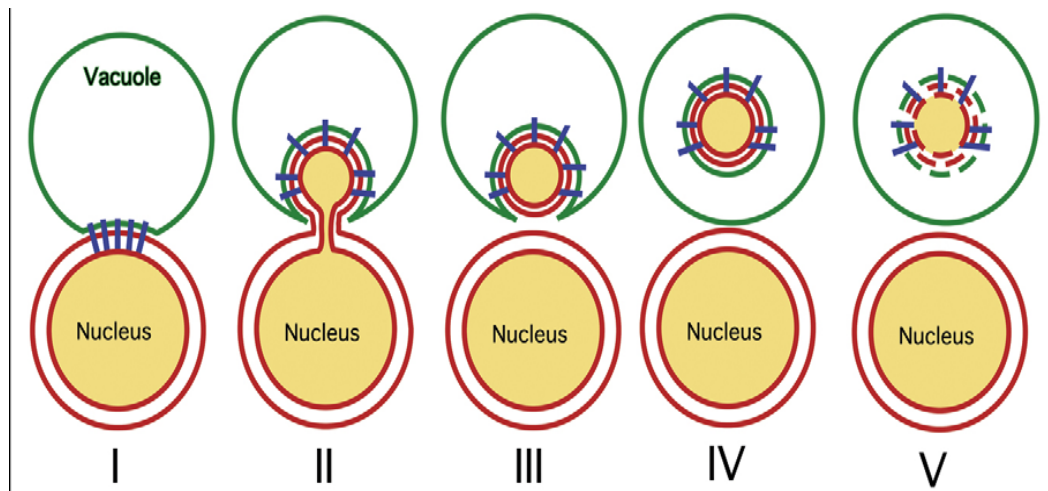


Figure 2 : Les étapes de PMN chez *S. cerevisiae* (image adaptée de Krick et al., 2008).

1.1.2.2 L'autophagie médiée par des protéines chaperones :

L'autophagie médiée par les chaperones (CMA) est une voie autophagique sélective qui permet le transfert spécifique des protéines cytosoliques vers les compartiments lysosomaux ou les endosomes (Figure 3) (Massey et al., 2006). Contrairement à la microautophagie et à la macroautophagie, l'autophagie médiée par des protéines chaperones n'implique pas un trafic membranaire pour la dégradation du matériel cytoplasmique dans les lysosomes.

Cette forme de l'autophagie est activée dans les cellules de mammifères sous des conditions prolongées de stress comme une carence en nutriments ou un stress oxydatif (Cuervo et al., 1995; Kiffin et al., 2004; Mizushima et al., 2004; Ravikumar et al., 2004; Iwata et al., 2005; Scherz-Shouval et al., 2007; Crotzer et Blum, 2010). La CMA joue un rôle important pour la survie cellulaire en fournissant les acides aminés essentiels à la survie cellulaire en cas de déficience de nutriments pour des longues durées et en prévenant la dégradation des protéines indispensables pour le maintien de l'intégrité des cellules sous des conditions de stress (Cuervo et al., 1995).

Des études ont montré qu'il existe une interaction directe entre la macroautophagie et la CMA. Cette dernière est activée lorsque la macroautophagie est bloquée sous des conditions de stress ou basales (Kaushik et al., 2008). Ce type de l'autophagie dépend d'un

complexe multiprotéique formé de chaperones moléculaires. Les mécanismes de la CMA ont été largement étudiés (Chiang et al., 1989 ; Agarraberes et Dice, 2001 ; Majeski et Dice, 2004; Massey et al., 2004) (Figure 3). La CMA cible entre autres la dégradation des protéines cytosoliques qui contiennent la séquence pentapeptide KFERQ (Dice 1990; Knecht et al., 2009). Ce motif KFERQ est reconnu par la chaperone Hsc70 (Chiang et al., 1989). Cette interaction entre protéine cytoplasmique et Hsc70 est modulée par des protéines co-chaperones du cytosol, incluant hsp40, hsp90, hip, hop et bag-1 (Agarraberes et Dice, 2001). Toutefois, le rôle spécifique de ces co-chaperones demeure encore inconnu. Le complexe protéine cytosolique-Hsc70 est ainsi transloqué à la membrane lysosomale tout en nécessitant l'activation de la chaperone Hsc73 pour atteindre le lumen lysosomal pour assurer la dégradation (Cuervo et al., 1997). Ce complexe protéine-Hsc70 transféré au lysosome interagit avec une protéine associée à la membrane lysosomale, LAMP-2a (Cuervo et Dice, 2000a; Kaushik et al., 2008). LAMP-2a est un récepteur lysosomal qui contient un résidu chargé positivement indispensable à la liaison au complexe protéine-Hsc70 (Cuervo et Dice, 1996; Cuervo et Dice, 2000b). Ce mécanisme de la CMA semble être en corrélation directe avec les niveaux de LAMP-2a en fonction du taux de dégradation, de la distribution et de la synthèse de *novο* du récepteur LAMP-2a (Cuervo et al., 2003; Cuervo et Dice, 2000a; Kiffin et al., 2004).

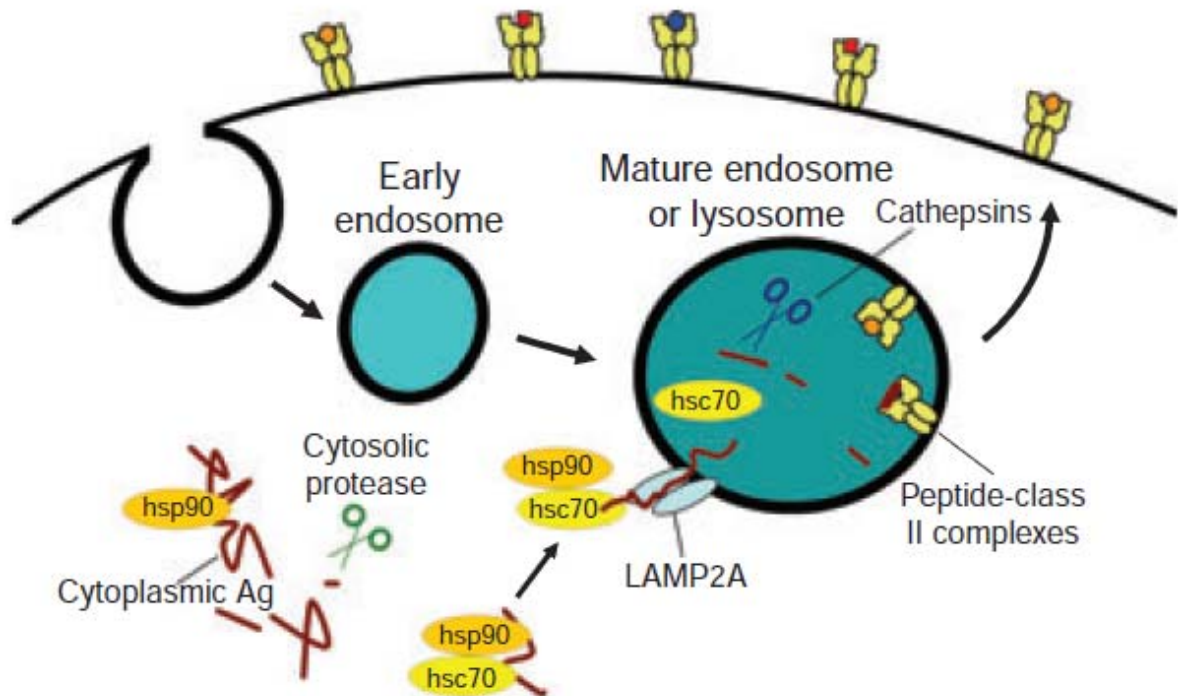


Figure 3 : **Autophagie médiée par les chaperones (CMA).**

Des protéines cytosoliques cibles présentant le motif KFERQ sont reconnues par les protéines Hsc70. Ce complexe protéine-Hsc70 est transporté au compartiment lysosomal. Cette interaction est modulée par des protéines co-chaperones telles que Hsp90. Le complexe ainsi interagit avec une protéine transmembranaire, LAMP-2a, trouvée dans le lysosome. Une fois les protéines transférées dans le lumen lysosomal, elles sont dégradées par les protéases cathepsines (image adaptée de Crotzer et Blum, 2010).

1.1.2.3 La macroautophagie

La macroautophagie constitue la forme majeure de l'autophagie et est souvent nommée autophagie. Ce type de l'autophagie est différent des deux autres types, car il implique la formation d'une vésicule spécifique qui transporte les composants cytoplasmiques aux lysosomes. La macroautophagie constitue un processus non spécifique dans lequel une portion du cytosol ou des organites sont séquestrés dans une vésicule dite autophagosome formée par une double membrane lipidique. L'autophagosome fusionne avec une organelle lytique, lysosome chez les cellules de mammifères, conduisant ainsi à la dégradation du

contenu séquestré par les hydrolases acides lysosomales (Figure 4) (Dunn 1994; Kundu et Thompson 2005; Inoue et al., 2006). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, un épuisement en carbone ou en azote stimule la voie macroautophagique non sélective (Baba et al., 1994; Egner et al., 1993; Takeshige et al., 1992). L'induction de la macroautophagie chez cette levure implique la formation de l'autophagosome, constitué d'une double membrane qui séquestre du matériel cytoplasmique ou les organites. Ainsi, la membrane externe de l'autophagosome fusionne avec une vacuole en présence des certains facteurs (Darsow et al., 1997; Sato et al., 1998). Subséquemment, ce corps autophagique est libéré dans le lumen de la vacuole, où il subit une dégradation par les hydrolases (Jones et al., 1997).

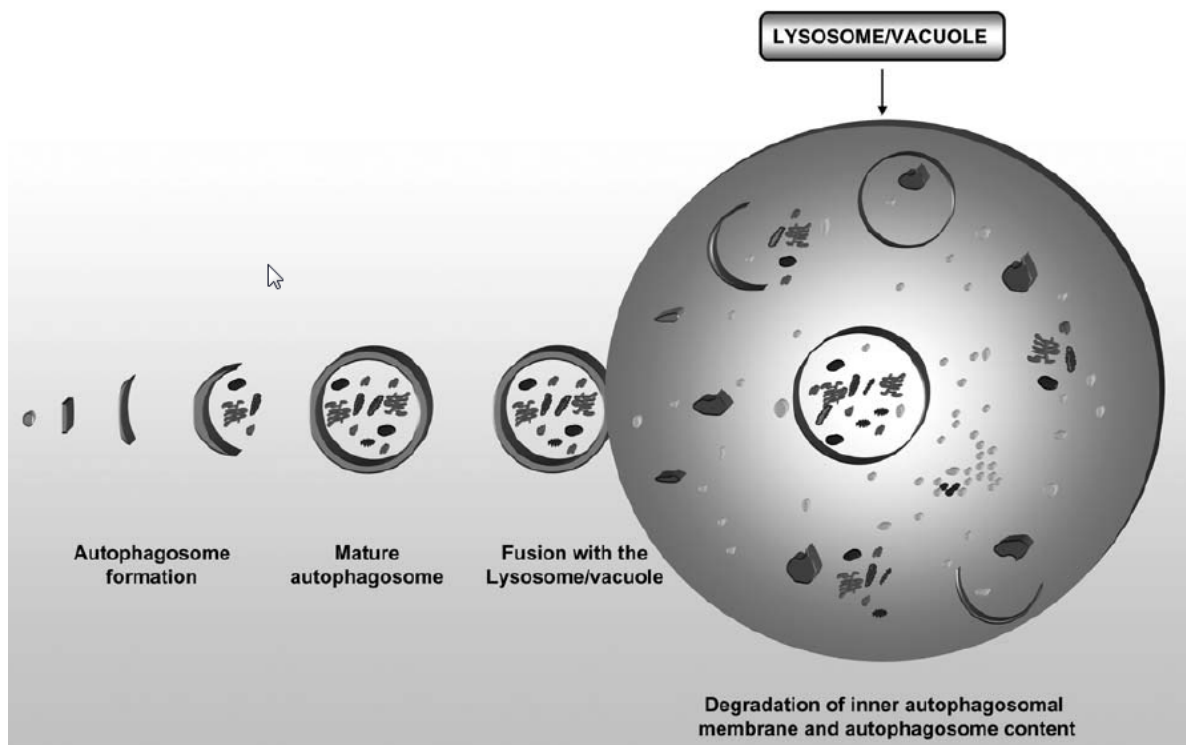


Figure 4 : **Représentation schématique du processus de la macroautophagie.**

Une fois que l'autophagie est stimulée, une vésicule comportant une double membrane appelée autophagosome est formée. L'autophagosome séquestre le matériel intracellulaire, incluant les protéines cytoplasmiques altérées et les organites endommagés. L'autophagosome ainsi formé fusionne par la suite avec le lysosome ou vacuole, entraînant la dégradation de son contenu et de la

membrane interne de l'autophagosome par les hydrolases (image provenant de Mariño et López-Otín, 2004).

La macroautophagie est classifiée en différentes catégories en se basant sur le composant cellulaire ciblé : mitophagie, RE-phagie, nucléophagie, xénophagie et péxophagie.

La mitophagie repose sur la dégradation sélective des mitochondries chez les cellules de mammifères et de levure (Clark 1957; Takeshige et al., 1992). Le mécanisme de la mitophagie chez la levure implique la séquestration de la mitochondrie dans une structure spécifique qui fusionne avec la vacuole, où la dégradation des composants séquestrés s'effectue (Figure 5). Concernant la levure, des études ont montré que la protéine Uth1 est requise pour la dégradation des mitochondries sous des conditions de carence en azote (Kundu et Thompson, 2005). La caractérisation du gène Uth1 et la détection de la perte du potentiel membranaire de la mitochondrie ont mis en évidence la dégradation spécifique des protéines mitochondriales par la mitophagie (Kissova et al., 2004; Priault et al., 2005). Toutefois, chez les cellules de mammifères, les molécules spécifiques qui ciblent la mitophagie ne sont pas encore identifiées.

La mitophagie joue un rôle primordial dans le maintien des fonctions et de l'intégrité des mitochondries (Kanki et Klionsky, 2008). Des recherches récentes avancent qu'une déficience de la mitophagie pourrait entraîner une accumulation des mitochondries endommagées et une augmentation des dommages oxydatifs (Zhang et al., 2007).

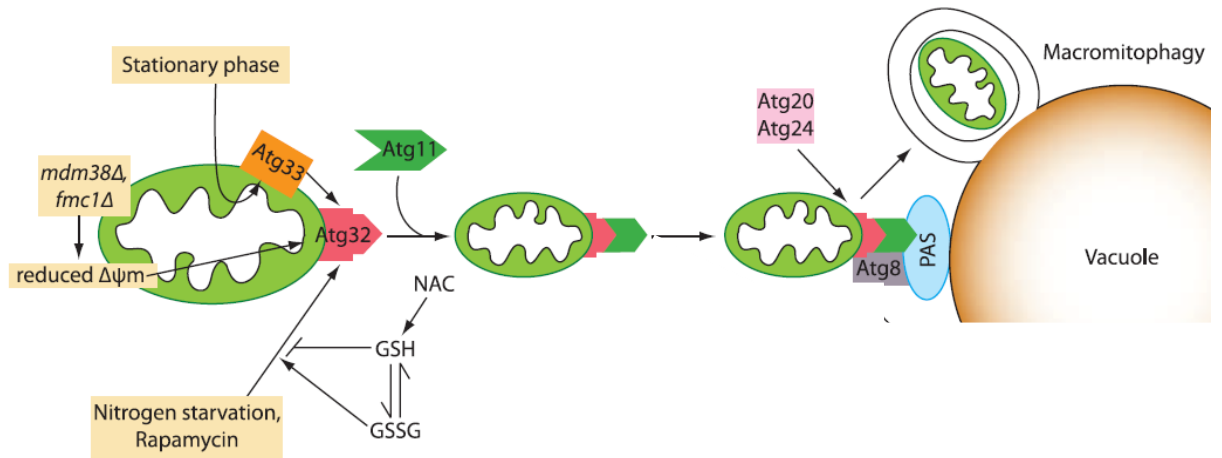


Figure 5 : Le processus de la macromitophagie (mitophagie) dans la levure.

Sous des conditions de carence en azote, de réduction du potentiel de la membrane mitochondriale, un traitement à la rapamycine ou le déclenchement de la phase stationnaire, la mitophagie est induite. Une fois que la mitophagie est stimulée, plusieurs protéines sont recrutées telles que Atg11, qui lie la protéine mitochondriale Atg32. Atg11 permet le recrutement de la mitochondrie dans une structure dite PAS. Cette dernière, qui séquestre la mitochondrie, fusionne avec la vacuole. Subséquemment, la mitochondrie est dégradée dans la vacuole par les hydrolases (image adaptée de Kanki et Klionsky, 2010).

Le « RE-phagie » implique la dégradation sélective du RE. Aussi, cette forme de l'autophagie repose sur la génération d'un autophagosome qui inclut sélectivement les membranes du RE. Cette classe de la macroautophagie est impliquée dans le contrôle de l'homéostasie cellulaire (Bernales et al., 2007). Il reste encore à déterminer les mécanismes de la séquestration sélective du RE à l'intérieur des autophagosomes.

En ce qui concerne la nucléophagie, cette classe de l'autophagie permet la dégradation des composants nucléaires endommagés chez les cellules de mammifères. Cette catégorie de la macroautophagie contribue à la réparation rapide des membranes nucléaires altérées (Park et al., 2009).

La xénophagie est une autre classe spécifique de l'autophagie qui joue un rôle important dans le mécanisme de défense contre les pathogènes intracellulaires incluant les parasites, les bactéries et les virus en limitant la réplication et la pathogénèse. Cette catégorie de l'autophagie implique la dégradation des composantes virales en favorisant la mort des

cellules infectées ou leur survie (Orvedahl et Levine, 2008). La xénophagie joue un rôle dans la réponse immunitaire contre les agents pathogènes en les éliminant et en augmentant la reconnaissance immunitaire des cellules infectées via la génération de peptides antigéniques permettant l'activation de l'immunité adaptative. Une telle voie autophagique est impliquée dans l'apprêtement des antigènes viraux endogènes pour leur présentation par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) aux lymphocytes T CD4⁺ (Nimmerjahn et al., 2003; Schmid et Munz, 2007). Également, ce processus semble avoir un rôle dans le chargement des peptides antigéniques sur le CMH de classe I conduisant ainsi à stimuler les lymphocytes T CD8⁺ (English et al., 2009).

La péxophagie est aussi une autre forme de la macroautophagie qui implique la dégradation du peroxisome par le compartiment lysosomal. Chez les levures *Y. lipolytica* et *S. cerevisiae*, le peroxisome est séquestré spécifiquement et individuellement dans une vésicule multimembranaire dite pexophagosome (Figure 6). Cette dernière fusionne avec le compartiment vacuolaire, où le peroxisome est exposé aux hydrolases (Sakai et al., 2006). La péxophagie assure le recyclage sélectif des peroxysomes en cas de conditions de répression des peroxysomes (Dunn et al., 2005; Monastyrska et Klionsky, 2006).

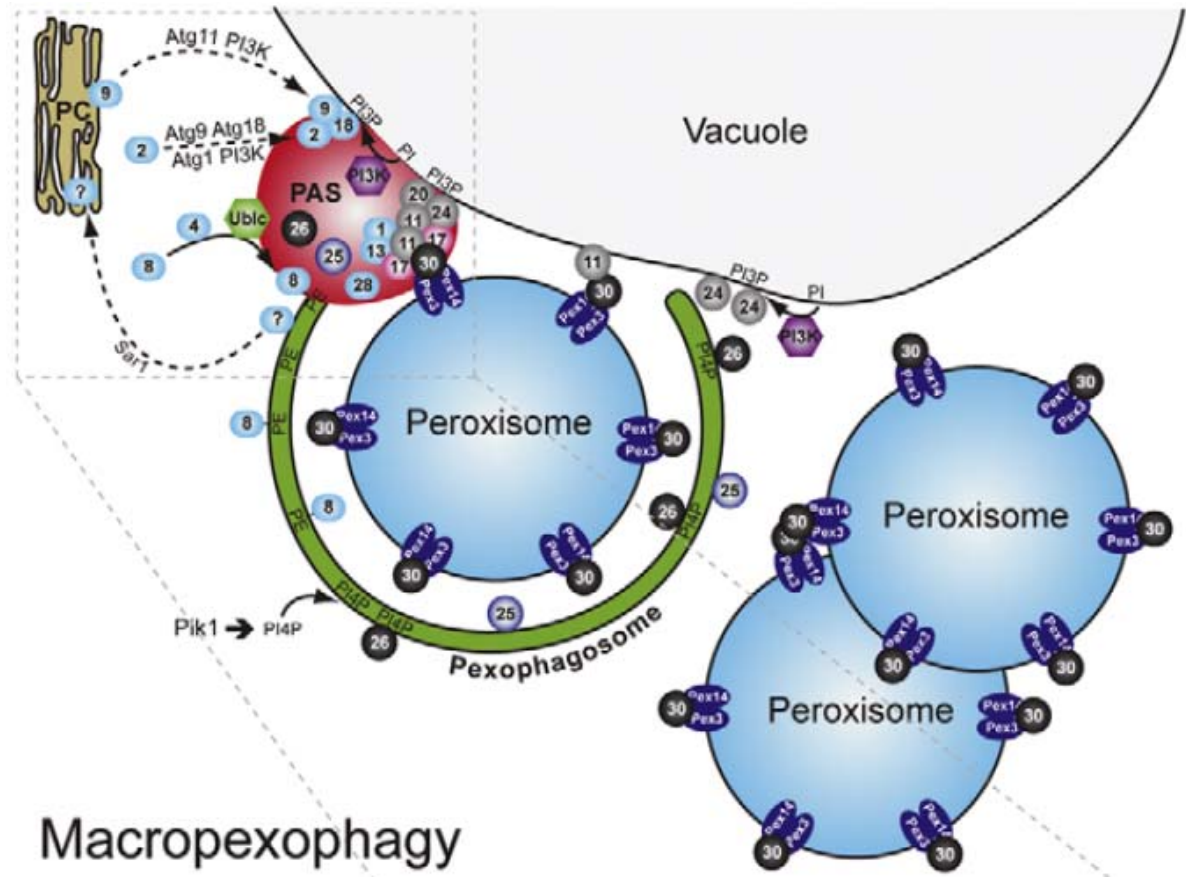


Figure 6 : Modèle schématique de la macropexophagie (pexophagie).

Sous des conditions de stress, plusieurs protéines sont recrutées pour l'achèvement de la pexophagie. Le peroxisome est séquestré par une structure appelée le pexophagosome. La membrane externe du pexophagosome fusionne avec la membrane de la vacuole. Ainsi, le matériel séquestré est dégradé par les hydrolases présentes dans le lumen vacuolaire (image tirée de Farré et Subramani, 2009).

1.2 Biogenèse des autophagosomes

Dans les cellules de mammifères, la biogenèse des autophagosomes commence, après l'induction par différents stimuli, par une étape d'initiation (nucléation) caractérisée par la formation du phagophore ou de la membrane isolée qui séquestre le matériel cytoplasmique. Après l'élongation du phagophore, une vésicule à double membrane appelée autophagosome englobe complètement le matériel cytoplasmique (Longatti et Tooze, 2009) (Figure7). Les autophagosomes subissent une maturation incluant la fusion

avec les endosomes formant les amphisomes et les lysosomes donnant ainsi les autolysosomes, où le contenu séquestré est dégradé (Seglen et al., 1990; Dunn 1994). Pour que la fusion puisse s'effectuer, une acidification des autophagosomes et/ou des lysosomes est indispensable (Yamamoto et al., 1998). Suite à l'événement de fusion des autophagosomes et les lysosomes, la membrane interne des autophagosomes aussi bien que les composants cytoplasmiques trouvés à l'intérieur sont dégradés par les hydrolases lysosomales (Noda et Yoshimori, 2009).

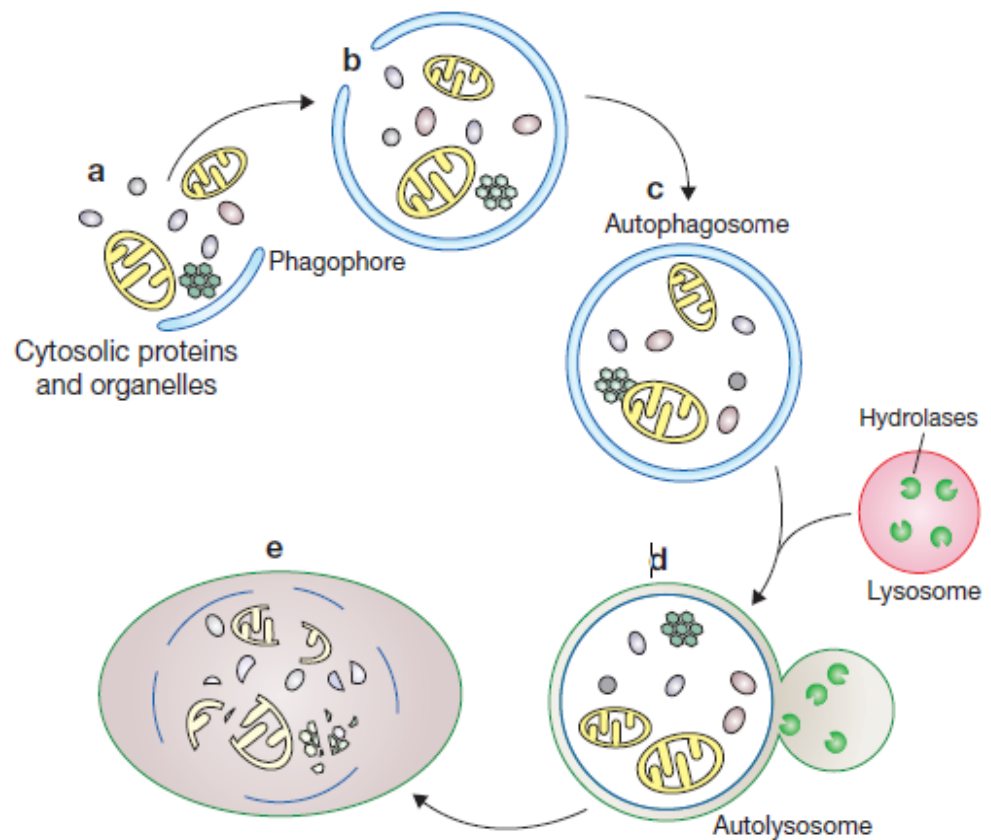


Figure 7 : **Biogenèse des autophagosomes dans les cellules des mammifères.**

(a, b) Une portion cytoplasmique incluant les organites est séquestrée par le phagophore ou la membrane isolée. Suite à l'élongation du phagophore, une vésicule à double membrane, l'autophagosome, est formée (c). Subséquemment, l'autophagosome fusionne avec les lysosomes pour que le matériel séquestré ainsi que la membrane interne de l'autophagosome subissent une dégradation par les hydrolases lysosomales (d,e) (image adaptée de Xie et Klionsky, 2007).

Dans la levure, l'équivalent du phagophore est la structure pré-autophagosomale (PAS). Elle constitue le site initial de recrutement de la machinerie autophagique. Cependant, ce site PAS n'a pas été observé chez les cellules de mammifères et joue un rôle fondamental dans la régulation du développement des membranes autophagosomales. Toutefois, dans les cellules de mammifères, l'origine de la portion membranaire formant le phagophore et la création des autophagosomes demeure encore ambiguë. Diverses recherches suggèrent que le RE présente la source primaire de celle-ci (Figure 9) (Axe et al., 2008; Reggiori et Tooze, 2009). D'autres études démontrent la contribution du RE en détectant un contact direct et physique entre la membrane isolée et le RE. (Hayashi-Nishino et al., 2009; Yla-Antilla et al., 2009). Un modèle postulant la contribution du RE suggère que l'autophagosome est formé à partir d'une structure dite omegasome (« cradle ») connectée au RE rugueux (Figure 8). Toutefois, la contribution du RE dans la formation des autophagosomes reste débattue. Récemment, des études proposent l'implication des mitochondries dans la formation des autophagosomes durant des conditions de famine dans les cellules de mammifères (Hailey et al., 2010).

En effet, les autophagosomes peuvent être formés à partir de la membrane externe de la mitochondrie. Les lipides phosphatidylserine sont transloqués du RE vers la mitochondrie, où une enzyme spécifique les transforme en phatidylethanolamine (PE). Il est ainsi incorporé dans les autophagosomes en cours de formation, où des protéines (complexe Atg5-Atg12-Atg16 et la protéine LC3) seront conjuguées avec le PE. Par la suite, le complexe protéique Atg5-Atg12-Atg16 se dissocie de l'autophagosome et la double membrane lipidique se ferme. Finalement, l'autophagosome mature se détache de la mitochondrie (Figure 8). En dépit de ces recherches, l'origine des autophagosomes demeure encore imprécise.

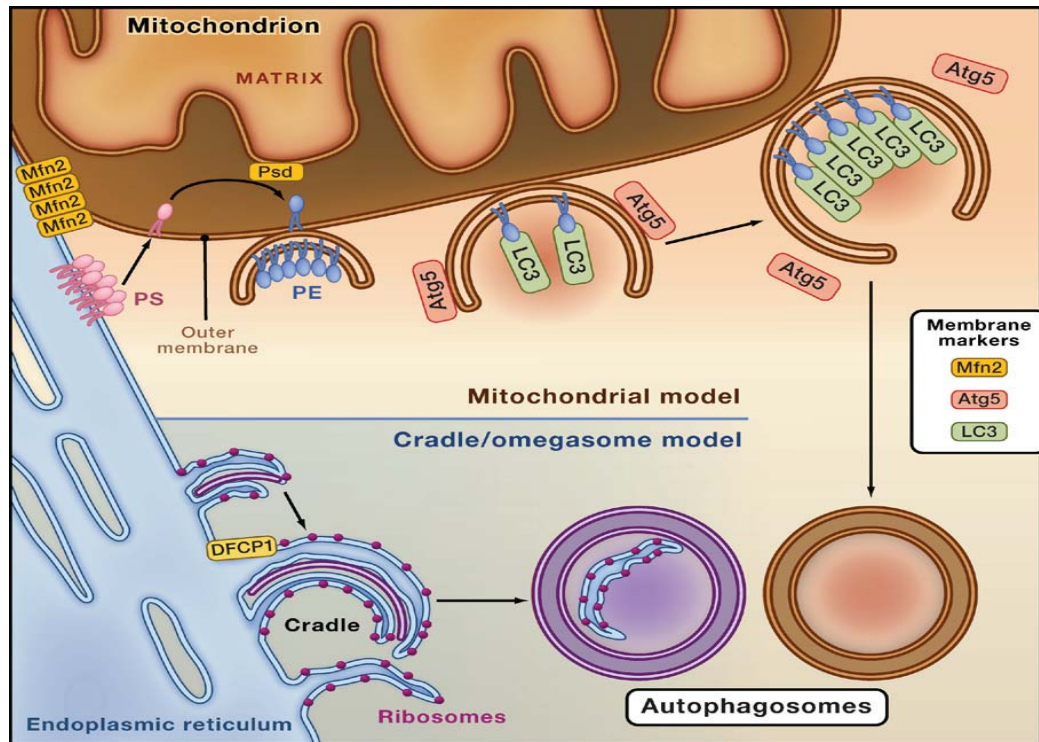


Figure 8 : **Modèle schématique de l'origine des autophagosomes dans les cellules de mammifères** (figure tirée de McEwan et Dikic, 2010).

1.3 Mécanismes moléculaires de l'autophagie

Bien que l'autophagie ait été premièrement élucidée en se basant sur les aspects morphologiques dans les cellules de mammifères, ses mécanismes moléculaires ont été d'abord décrits et caractérisés chez la levure. À ce jour, 31 protéines dites Atg sont associées à l'autophagie et ont été identifiées chez la levure. Ces protéines agissent au niveau de la régulation et de l'exécution de l'autophagie (Xie et Klionsky, 2007). Parmi ces protéines, 18 sont impliquées dans la formation des autophagosomes (Klionsky et al., 2003; Kabeya et al., 2007; Suzuki et ohsumi, 2007). Ces protéines gouvernent les différentes étapes du processus de l'autophagie, incluant la formation des autophagosomes, la fusion avec les lysosomes et ainsi la dégradation du matériel séquestré. En fait, après l'induction de l'autophagie, l'étape de nucléation de la membrane isolée repose sur l'implication des protéines hypophosphorylées ULK1 et Atg13. La nucléation est aussi favorisée par

l'activation des phosphatidylinositol-3-phosphate kinases classe III (PIK III) (Vps34 chez la levure) qui s'associent avec Béclin 1, Atg14 et VPS15. L'étape de l'élongation nécessite l'intervention de deux complexes de conjugaison, soient le Atg5-atg12-Atg16L et le complexe LC3-PE. Après le transport des autophagosomes complètement formés vers les lysosomes, la fusion se produit, donnant ainsi un autolysosome, où le matériel séquestré et la membrane interne des autophagosomes sont dégradés par les hydrolases (Figure 9). Les molécules intervenant dans le processus de l'autophagie jouent un rôle défini dans l'autophagie (Tableau 1).

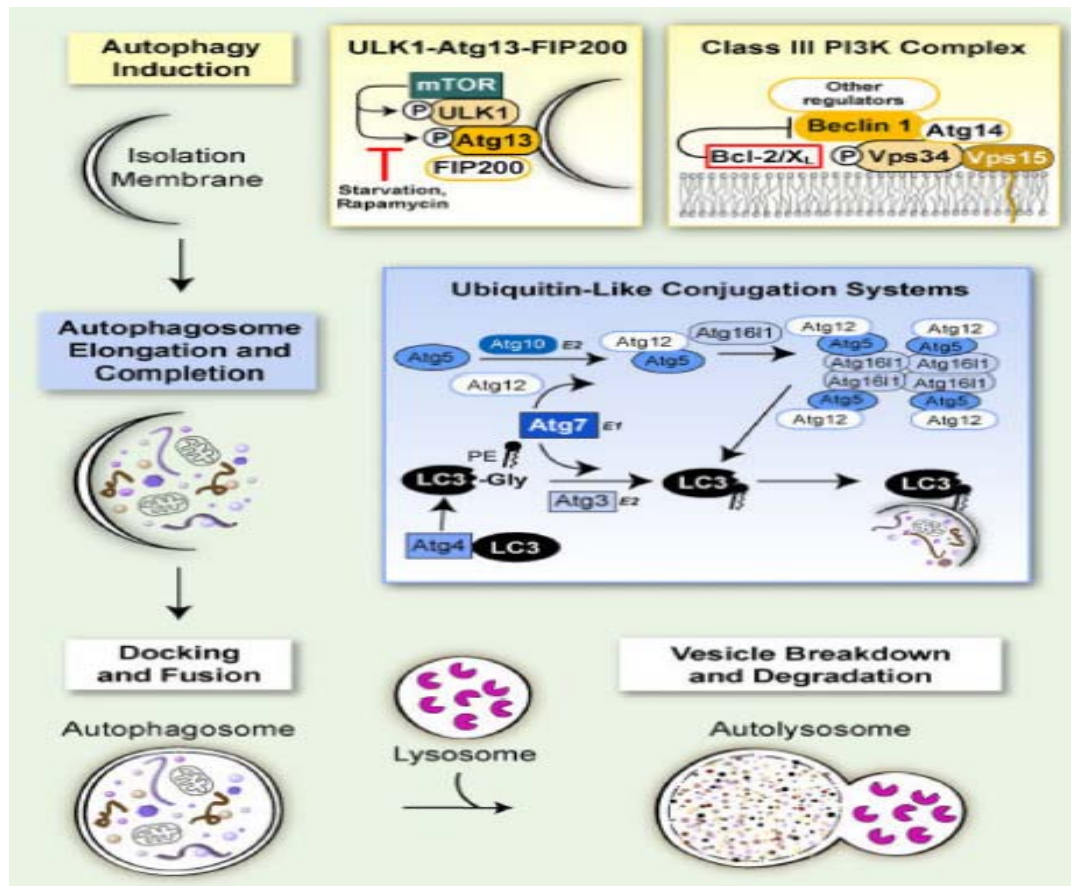


Figure 9 : Les protéines impliquées dans les différentes phases de l'autophagie.

Les protéines ULK1 et Atg13 et des phosphatidylinositol-3-phosphate kinases classe III activées sont impliquées dans l'étape de la nucléation de la membrane isolée. Ensuite, deux complexes de conjugaison, soient l'Atg5-Atg12-Atg16L et le complexe LC3-PE, interviennent dans l'élongation

et la formation de l'autophagosome. Finalement, l'autophagosome fusionne avec le lysosome résultant en la dégradation de la membrane interne de l'autophagosome et du matériel sequestré dans l'autophagosome par les hydrolases du lysosome (image provenant de Kudchodkar et Levine, 2009).

Tableau 1 : Les protéines clés impliquées dans le processus de l'autophagie

Les protéines chez la levure	Homologues chez les mammifères	Localisation cellulaire	Fonction dans l'autophagie
Atg1	ULK1,2	Cytoplasme	Phosphorylation d'Atg13 et Atg17, impliquée dans l'étape de la nucléation
Atg2	Atg2a,b	Cytoplasme	Forme un complexe avec Atg9 et Atg8, probablement intervient dans la nucléation
Atg3	Atg3	Cytoplasme	E2-like enzyme impliquée dans la formation du complexe conjugué LC3/Atg8-PE
Atg4	Atg4a,b	Cytoplasme	Une protéase qui permet le clivage d'Atg8 avant sa liaison avec PE et la libération du PE du complexe conjugué LC3-PE
Atg5	Atg5	Cytoplasme, vacuole autophagique	Forme un complexe avec Atg12 puis Atg12-Atg5 lie Atg16, requise pour le recrutement du deuxième système de conjugaison
Atg6(Vps30)	Béclin 1	Fraction membranaire	Sous unité du complexe PI3K I et III, impliquée dans la nucléation de la membrane autophagosomale
Atg7	Atg7	Cytosol et fraction membranaire	E1-like system enzyme intervient dans la conjugaison du complexe LC3-PE
Atg8	LC3	Membrane de la vacuole autophagique (autophagosome)	Ubiquitin-like protein dans le système de conjugaison LC3-PE, impliquée dans la formation de l'autophagosome
Atg9	Atg9a, b (APG9L1, APG9L2)	Membrane de PAS ou Phagophore	Protéine transmembranaire impliquée dans la formation de l'autophagosome
Atg10	Atg10	A déterminer	E2-like system impliqué dans la formation du complexe Atg12-Atg5
Atg12	Atg12	Fraction membranaire	Se lie à Atg12 formant le complexe Atg12-Atg5
Atg13	Atg13(Harbil)	Extrinsèque à la membrane	Module l'activité d'Atg1 et nécessaire pour l'initiation de l'autophagie
Atg14	Barkor ou mAtg14	Membrane de PAS ou phagophore	Fait partie du complexe PI3K III, impliquée dans la formation de l'autophagosome
Atg16	Atg16	Membrane de PAS ou phagophore	Associée à Atg5 et Atg12 formant le complexe Atg5-atg12-Atg16
Atg17	-	Membrane de PAS ou phagophore	Modifie l'activité d'Atg1, impliquée dans la l'initiation de l'autophagie
Atg18	Wipi1	Cytosol	Probablement impliquée dans la phase de nucléation
Atg29	-	Membrane de PAS ou phagophore, cytosol	Requise pour le recrutement d'autres protéines Atg tel qu'Atg17 pour PAS ou phagophore
Atg31	-	À déterminer	Recrutement d'Atg17 et agit avec Atg17 permettent l'expansion de la membrane autophagosomale

Plusieurs cascades de signalisation et de protéines semblent être impliquées dans l'étape de nucléation. Lorsque la protéine mTOR est inactivée, la protéine ULK1 (l'équivalent d'Atg1 chez la levure) est active et elle s'associe avec les protéines Atg13 et FIP200 (Atg17 chez la levure) (voir Figure 10). Des études suggèrent que les protéines ULKs (ULK1 et ULK2) permettent la phosphorylation d'Atg13 et FIP200 et les ULKs effectuent leur autophosphorylation (Jung et al., 2009; Chan et al., 2009). Les protéines ULK1 et Atg13 sont maintenues hypophosphorylées, stimulant ainsi l'expansion de la membrane isolée (Kudchodkar et Levine, 2009). Le complexe ULK1-Atg13-FIP200 permet le recrutement de diverses protéines au niveau de la membrane isolée pour induire l'initiation de la formation de l'autophagosome. Également, l'activation du PI3K III ou Vps 34 chez la levure est importante dans l'étape d'initiation de la nucléation de la membrane isolée afin de former l'autophagosome. L'activation du PI3K III dépend de son interaction avec un complexe multiprotéique contenant essentiellement la protéine Béclin 1 (orthologue d'Atg6 chez les mammifères) localisée sur la membrane transgolgienne. La liaison de PI3K III avec Béclin 1 est stimulée par des cofacteurs qui interagissent avec Béclin 1, tels qu'UVRAG (UV radiation Resistance Associated Gene) et AMBRA1 (Activating Molecules in Béclin 1 Regulated Autophagy) (Liang et al., 2006; Fimia et al., 2007). Les protéines mAtg14 ou Barkor (Atg14 chez la levure) et la kinase p150 (Vps15 chez la levure) font aussi partie du complexe multiprotéique qui s'associe avec PI3K III (He et Klionsky, 2009). PI3K III complexant avec Béclin 1 permet la formation des phosphatidylinositol-3-phosphates (PI3Ps) au niveau des endomembranes, favorisant ainsi l'autophagie en terme de recrutement des protéines indispensables à la génération des autophagosomes (Obara et al., 2008).

En outre, PI3K III semble être un facteur important pour déclencher la formation des autophagosomes. En effet, un agent pharmacologique identifié comme inhibiteur de la formation des autophagosomes, la 3-méthyladénine agit en inhibant les PI3K de classe III (Seglen et Gordon, 1982).

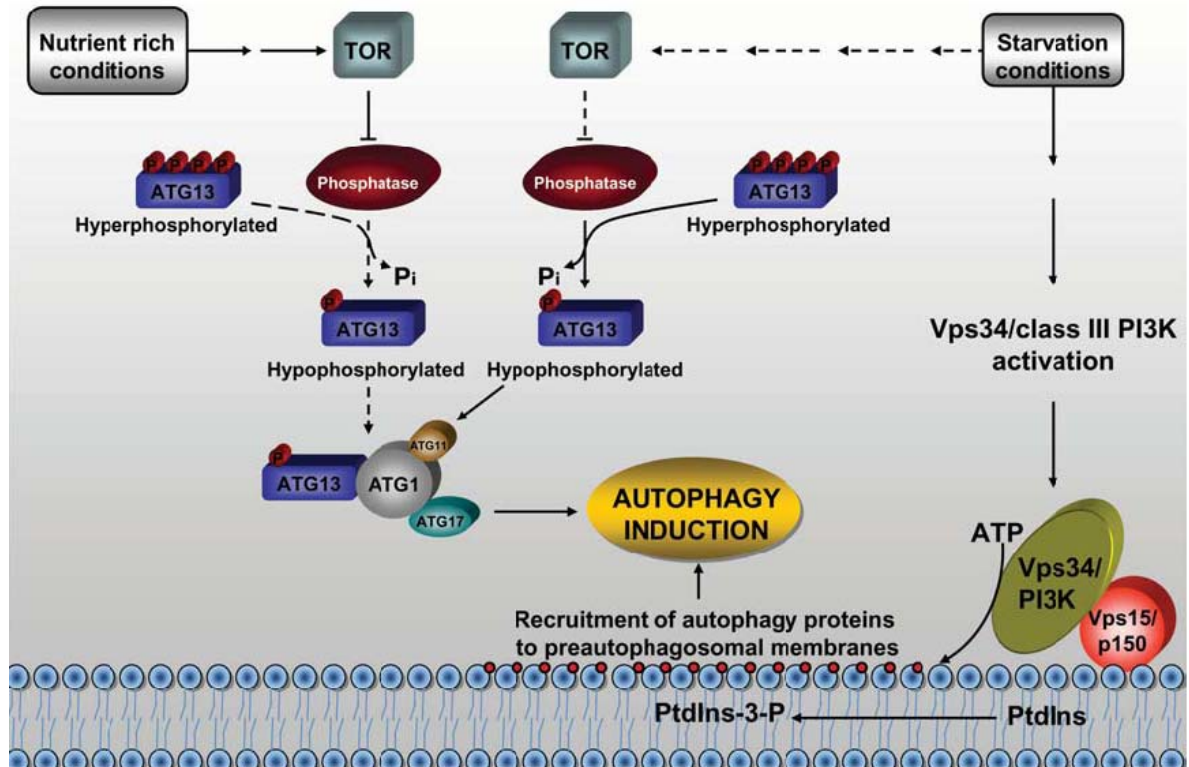


Figure 10 : Les protéines impliquées dans l'étape d'initiation de la nucléation de la membrane isolée.

Sous des conditions de carence en nutriments, la protéine mTOR est inactivée. Ainsi, Atg13 se lie à Atg1 (ULK1 chez les mammifères) puis se forme le complexe Atg1-Atg13 -Atg17 (appelée FIP200 chez les mammifères). Ce complexe est maintenu hypophosphorylé, favorisant ainsi l'autophagie. En absence de nutriments, la PI3K III (Vps34 chez la levure) est activée, permettant la formation des phosphatidylinositol-3-phosphates (PI3Ps). Cela favorise le recrutement des protéines essentielles à la formation des autophagosomes (image tirée de Marino et Lopez-Otin, 2004)

La formation des autophagosomes implique deux systèmes de conjugaison : Atg5-Atg12 et LC3 (Atg8)-PE. Atg12 activée par Atg7 est transférée vers Atg10 et, par la suite, Atg12 s'attache à Atg5. Le complexe de conjugaison Atg5-Atg12 s'associe avec Atg16, formant par oligomérisation un complexe hétérotrimérique Atg2-Atg5-Atg16 qui est associé à la membrane externe des autophagosomes en cours de formation à partir du phagophore (He et Klionsky, 2009). Le complexe Atg5-Atg12-Atg16 permet aussi le recrutement du second complexe de conjugaison. Le second complexe, LC3-PE, résulte du clivage de LC3 (microtubule-associated protein 1 light chain 3), qui est un orthologue d'Atg8 chez les

mammifères, par Atg7 et la protéase Atg4. Après le clivage du résidu glycine en C-terminal, LC3 clivé se lie à la phosphatidylethanolamine (PE) donnant ainsi le complexe LC3-PE ou LC3-II (Kudchodkar et Levine, 2009). Ce dernier joue un rôle de pivot dans l'élongation et la formation des autophagosomes. Après la formation complète de l'autophagosome, la protéine LC3 associée à sa membrane externe est recyclée, tandis qu'une partie du complexe LC3-II lié à sa membrane interne demeure associée à la membrane jusqu'à l'étape de dégradation par les hydrolases lysosomales.

Une fois la formation des autophagosomes achevée, ils sont transportés vers les lysosomes avec lesquels ils fusionnent pour former les autolysosomes (Levine et Kroemer, 2008). L'étape de fusion nécessite la maturation des autophagosomes avant leur transfert vers les lysosomes. Cependant, peu de choses sont connues sur le mécanisme de ces étapes. Chez la levure, la fusion des autophagosomes avec la vacuole requiert plusieurs facteurs qui sont impliqués dans différents types de transport vésiculaire. La machinerie SNARE est indispensable pour la maturation des autophagosomes. D'autres protéines telles que Vam3, Vam7, la famille Rab « GTP-binding protein Ypt7 » (homologue de Rab7) et Sec 18 médient la fusion des autophagosomes avec les lysosomes chez la levure (Darsow et al., 1997; Mayer et Wickner, 1997; Sato et al., 1998 ; Ishihara et al., 2001). Chez les mammifères, la fusion des autophagosomes et des lysosomes est beaucoup plus complexe, car elle nécessite plusieurs étapes de maturation incluant diverses phases de fusion membranaire avec les compartiments endosomaux et lysosomaux. Certaines études ont contribué à identifier des molécules clés dans le processus de fusion. Parmi ces protéines, des GTPases tels que Rab7, Rab22, et Rab24 sont requises pour acquérir la maturation des autophagosomes (Mesa et al., 2001; Munafò et Colombo, 2002; Wang et Klionsky, 2003; Jager et al., 2004). Aussi, SKD1 s'avère nécessaire pour la maturation des autophagosomes. En fait, une surexpression d'une forme mutée de la protéine SKD1 ATPase (SKD1 AAA ATPase), incapable d'hydrolyser l'ATP, provoque un dysfonctionnement des endosomes, causant l'apparition d'une morphologie anormale des endosomes et une altération du transport endosomal (Nara et al., 2002). Cette perturbation peut causer une accumulation massive des autophagosomes précoces, menant ainsi à une diminution de leur fusion avec les compartiments lysosomaux (Nara et al., 2002).

En plus, les microtubules, les éléments du cytosquelette et les protéines NSF (N-ethylmaleimide sensitive fusion protein) peuvent être impliqués dans la maturation et la fusion des autophagosomes avec les lysosomes. Également, l'acidification des autophagosomes semble être essentielle pour la fusion avec le lysosome (Kovacs et al., 1982; Yamamoto et al., 1998). Après la fusion de la membrane externe des autophagosomes avec la membrane lysosomale, les hydrolases dégradent le matériel cytoplasmique séquestré dans l'autophagosome (Kudchodkar et Levine, 2009).

1.4 Régulation et contrôle de l'autophagie

Il existe de multiples stimuli qui induisent l'autophagie. Chez la levure, une carence en apport d'azote organique constitue le stimulus le plus puissant. Dans les cellules de mammifères, plusieurs inducteurs de l'autophagie ont été caractérisés, incluant principalement une déficience nutritionnelle (facteurs de croissance, hormones), un manque d'acides aminés, en particulier les acides aminés essentiels (Esteban et al., 2007), ou une période de stress intracellulaire (stress énergétique, ER stress ou une infection par des pathogènes). Tous ces stimuli impliquent différentes voies de signalisation qui modulent l'autophagie.

1.4.1 La voie mTOR Kinase

Chez les mammifères, la sérine-thréonine kinase (mTOR) constitue le principal régulateur de l'initiation de l'autophagie. mTOR inhibe l'autophagie en présence de nutriments incluant les acides aminés et les facteurs de croissance. mTOR contrôle le niveau de phosphorylation des protéines ULK1. En effet, en cas de suffisance en nutriments, mTOR phosphoryle indirectement ULK1 ou indirectement deux autres protéines qui régulent la transduction du signal : 4E-BP1 et S6K1 (Knecht et al., 2009).

mTOR agit en prévenant la formation du complexe Atg1-Atg13-Atg17 chez la levure et ULK1-Atg13-FIP200 chez les mammifères, empêchant ainsi le déclenchement de l'autophagie (Mizushima et al., 2001; Suzuki et al., 2001; Kim et al., 2002).

Il y a deux complexes mTOR : mTORC1 et mTORC2. mTORC1, qui est sensible à l'inhibition par la rapamycine, phosphoryle 4E-BP1 et S6K1.

Le complexe mTORC2, dont l'activité n'est pas bloquée par la rapamycine, phosphoryle la protéine Akt (Knecht et al., 2009). Des études faites sur la drosophile et les mammifères suggèrent qu'en réponse aux acides aminés, la protéine Rag induit l'activation de mTORC1. En effet, la protéine Rag agit en médiant la translocation de mTORC1 vers un compartiment spécifique comportant l'activateur spécifique de TORC1, Rheb (Figure12) (Kim et al., 2008). Aussi, la présence d'acides aminés peut activer mTOR en stimulant Vps34 ou PI3K III (Figure11) (Byfield et al., 2005; Nobukuni et al., 2005). Toutefois, cela paraît contradictoire aux études qui indiquent le rôle positif de PI3K III dans l'induction de la formation des autophagosomes.

En présence d'insuline ou des facteurs de croissance, l'activité de la protéine kinase mTOR est contrôlée par PI3K classe I, entraînant ainsi son activation.

Un apport élevé en ATP/AMP induit une activation de l'AMPK (AMP-dependent kinase). L'activation de l'AMPK engendre une phosphorylation et une activation du complexe TSC2-TSC1, conduisant à une inhibition de mTOR et l'induction de l'autophagie (Inoki et al., 2003). Également, dans des conditions de stress du RE, l'AMPK peut être activée par CaMKK β (calcium-activated calmodulin dependent kinase- β), qui a été stimulé par une augmentation du niveau du calcium intracellulaire (Hoyer-Hansen et al., 2007). Aussi, une stimulation d'AMPK induite par une activation de la protéine p53 cause une inhibition de mTOR et, par conséquent, une augmentation de l'autophagie (Feng et al., 2005).

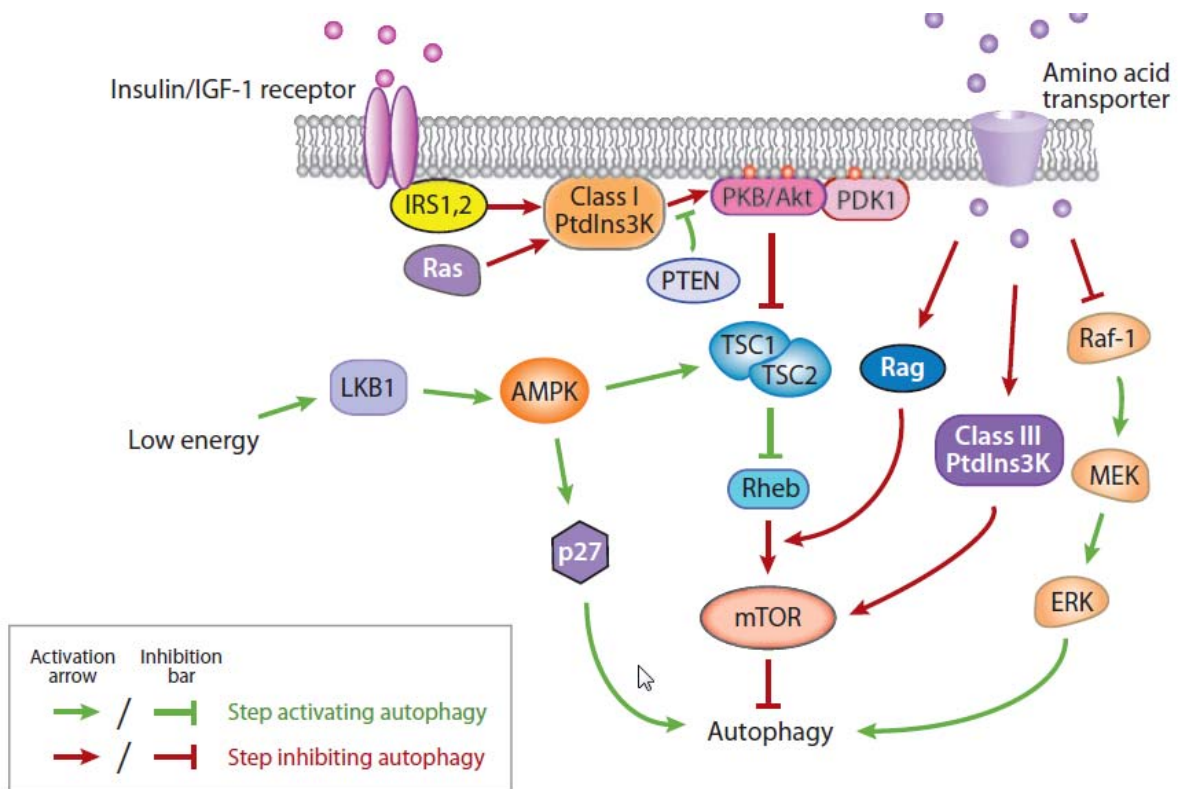


Figure 11 : **Régulation négative de l'autophagie par l'activation de la protéine kinase mTOR.**

En présence des acides aminés et des facteurs de croissance et/ou d'insuline, la protéine kinase mTOR est activée, menant à une inhibition du déclenchement de l'autophagie. La kinase mTOR peut être activée via la cascade de signalisation PI3KI, PI3K III et la protéine Rag (image provenant de He et Klionsky, 2009)

1.4.2 La voie de signalisation PI3K de classe I/Akt

La PI3K de classe I est impliquée dans le contrôle de l'autophagie via la modulation de l'activité de mTOR. En effet, la PI3K I phosphoryle le phospholipide PI-4-P (phosphatidylinositol-4-phosphate) et le PI-4,5-P₂ (phosphatidylinositol-4,5-diphosphate) pour donner du PI-3,4-P₂ (phosphatidylinositol-3,4-diphosphate) et du PI-3,4,5-P₃ (phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphate). Le produit de la PI3KI, PI-3,4,5-P₃, permet le recrutement à la membrane plasmique de la protéine kinase PKB/Akt et son activateur PDK1, entraînant l'activation et la phosphorylation de PKB/Akt par PDK1. La protéine kinase PKB/Akt activée favorise la phosphorylation de TSC2 (tuberous sclerosis complex 2). La phosphorylation de TSC2 provoque une dissociation du complexe formé par

l'interaction de TSC2 avec TSC1 (Manning et al., 2002; Meley et al., 2006). Par conséquent, l'activité GTPase de la protéine Rheb est bloquée, l'effet inhibiteur sur mTOR est levé, et mTOR deviendra en conséquence activée. La présence de facteurs de croissance et d'insuline induit l'activation de la voie de signalisation PI3K I, ce qui mène à l'activation de mTOR, résultant ainsi en l'abolition de l'autophagie. Toutefois, l'effet inhibiteur de l'autophagie de PI3KI est renversé par la protéine PTEN, qui induit la déphosphorylation du produit lipidique de PI3K I, causant une inactivation de PKB/Akt et donc une induction de l'autophagie (Arico et al., 2001).

1.4.3 La protéine Bcl-2

La protéine antiapoptotique Bcl-2 interagit avec le domaine BH3 au niveau de Béclin 1, qui favorise l'induction de l'autophagie (Maiuri et al., 2009). Cette interaction entre Bcl-2 et Béclin 1 induit une inhibition de l'autophagie, en séquestrant la protéine Béclin 1, ce qui interrompt la formation du complexe indispensable pour l'initiation de l'autophagie, Vps34-Vps15-Béclin 1.

Il a été suggéré que l'activité inhibitrice de Bcl-2 pouvait être supprimée durant des situations de stress. En effet, la kinase JNK1 (c-Jun N-terminal kinase) est activée et stimule la phosphorylation de Bcl-2. Ceci engendre la dissociation de Bcl-2 et de Béclin 1, et, conséquemment l'induction de l'autophagie (Wei et al., 2008).

1.4.4 La voie de signalisation médiée par le facteur d'initiation eucaryotique 2 α (eIF2 α).

Durant un stress du RE et en réponse à une infection virale, la phosphorylation d'eIF2 α provoque le déclenchement de l'autophagie. Chez la levure, il y a une seule kinase eIF2 α , GCN2 (general control nondepressible-2), alors que, chez les cellules de mammifères, on a montré l'existence de quatre kinases (GCN2, PKR, PERK et HRI) responsables de la phosphorylation d'eIF2 α . Chez la levure et les cellules MEFs (murine embryonic fibroblasts), GCN2 est requise pour la phosphorylation d'eIF2 α durant des situations de carence et la phosphorylation d'eIF2 α est médiée par PKR en réponse à une infection virale (Talloczy et al., 2002). La phosphorylation et l'activation d'eIF2 α peuvent engendrer une traduction sélective des facteurs de transcription, ce qui évoque une expression du gène

Atg12 et ainsi la formation du complexe Atg12-Atg5-Atg16 essentiel à la formation des autophagosomes lors de l'autophagie (Kourokou et al., 2007).

1.4.5 La voie de signalisation MAPKs

La famille MAPKs (Mitogen- activated protein kinases), incluant ERK1, ERK2, p38 et JNK, est impliquée dans le processus de l'autophagie (Meijer et Codogno, 2006; Corcelle et al., 2007). En effet, ERK1 et ERK2 activent l'autophagie et inhibent le maintien du complexe TSC1-TSC2 (Knecht et al., 2009). Aussi, durant un stress dû à une carence alimentaire, les kinases ERK1 et ERK2 sont activées, et une inhibition de ERK1/ERK2 pourrait entraîner une abolition de l'autophagie induite par la famine (Petiot et al., 2000).

1.5 Rôles de l'autophagie

1.5.1 Fonctions physiologiques de l'autophagie

L'autophagie constitue un mécanisme bénéfique assurant la survie cellulaire. Une inhibition de l'autophagie engendre une mort cellulaire (Boya et al., 2005). Ce phénomène physiologique est nécessaire pour le maintien de l'homéostasie de la cellule qui fait appel à l'élimination des agrégats protéiques et des organites endommagés en réponse à des conditions de stress de longue durée. Sous des conditions de stress, cette voie dégradative est largement augmentée pour contourner des conditions de stress en fournissant l'énergie et les macromolécules via un catabolisme des composants intracellulaires (Kudchodkar et Levine, 2009). De plus, durant des conditions de famine, l'autophagie permet de maintenir le pool des acides aminés. Des études précédentes ont démontré que sous des situations de famine l'autophagie est importante pour la survie de *Saccharomyces cerevisiae*, *Dictyostelium discoideum* et *Drosophila melanogaster* (Tsukada et Oshumi, 1993; Otto et al., 2003; Scott et al., 2004). En plus de l'implication de l'autophagie dans le maintien de la production des acides aminés, l'autophagie de base joue un rôle prépondérant dans le contrôle de la qualité intracellulaire. Des études génétiques faites sur des souris ont révélé l'importance cruciale de l'autophagie de base dans le contrôle de la qualité intracellulaire à travers le recyclage constitutif des composants cytoplasmiques (Levine et al., 2009). Les fonctions physiologiques de l'autophagie ne sont pas restreintes seulement aux fonctions mentionnées ci-dessus : l'activité autophagique est également un déterminant critique pour

le développement de différents organismes et la suppression des tumeurs (Levine et al., 2009).

1.5.2 Autophagie et l'immunité

Diverses recherches approfondies portant sur la machinerie moléculaire impliquée dans le processus autophagique ont permis de dévoiler aussi bien l'importance de l'autophagie dans le maintien de l'homéostasie cytoplasmique que son rôle critique dans la défense contre les agents pathogènes. Bien que l'autophagie permette la séquestration et la dégradation des pathogènes, elle favorise aussi la présentation antigénique par le CMH de classe II et de classe I, le développement et la survie des lymphocytes et l'activation de la production d'interféron de type I via la stimulation de la voie de signalisation TLR7 (Figure 12).

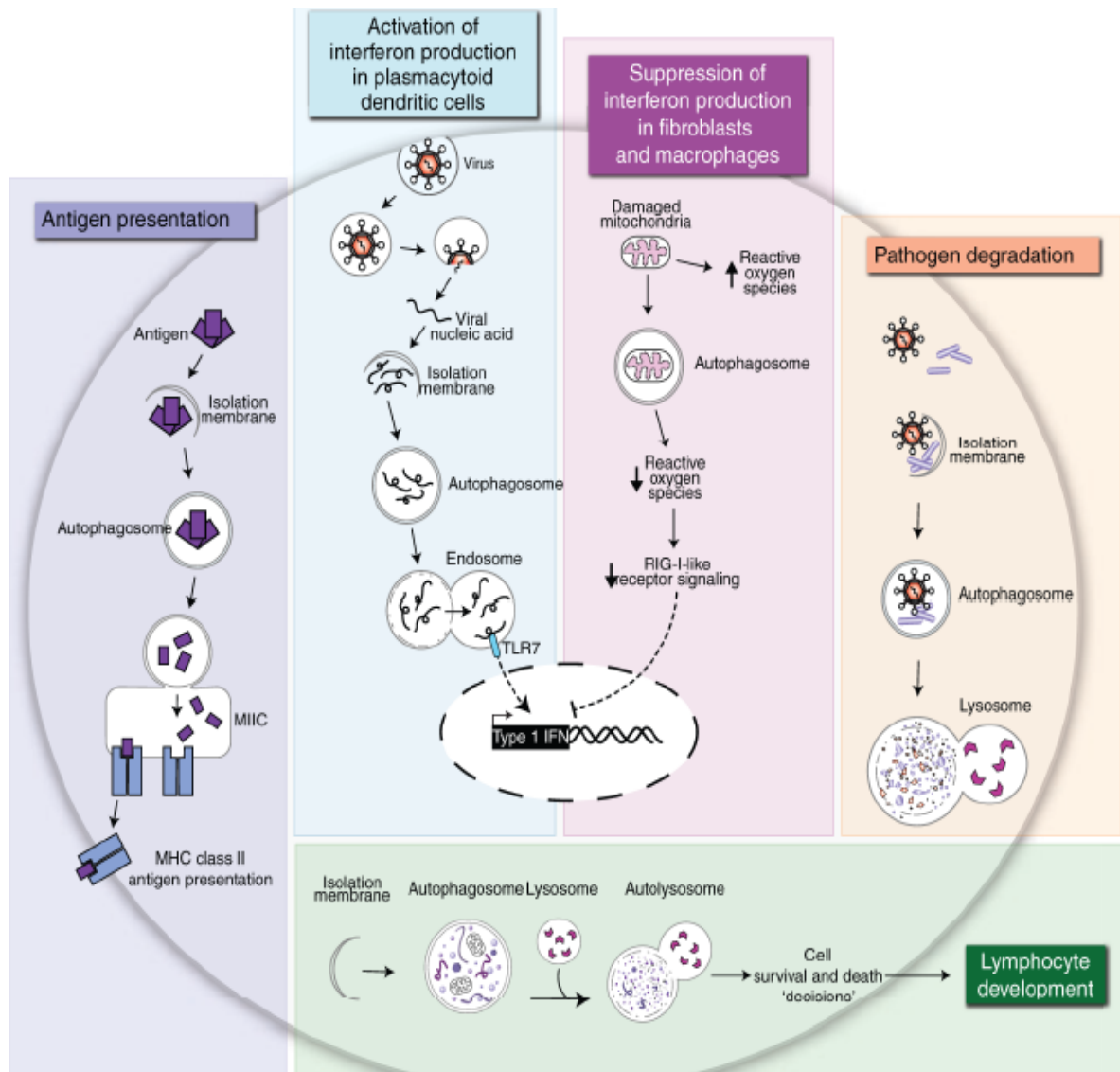


Figure 12 : L'implication de l'autophagie dans plusieurs mécanismes immunitaires.

L'autophagie est impliquée dans la présentation antigénique, dans l'activation et la production d'interféron par les cellules dendritiques, dans la dégradation des agents pathogènes envahisseurs et dans le développement des lymphocytes (image tirée de Virgin et Levine, 2009).

L'autophagie participe à la dégradation des bactéries intracellulaires présentes dans les phagosomes, notamment le *Mycobactérium tuberculosis*, dans les vacuoles endommagées tel que la bactérie *Salmonella enterica*, et celles localisées dans le cytosol, par exemple *Streptococcus groupe A* (Levine et al., 2009). Également, diverses études ont montré le rôle

clé de l'autophagie *in vitro* pour contrôler l'évasion immunitaire des pathogènes envahisseurs, notamment dans le cas de *Shigella flexneri* et *Salmonella typhimurium*...etc (Munz 2009; Orvedahl et Levine, 2009).

Les virus ont développé des stratégies pour échapper à la dégradation protéosomale (Tortorella et al., 2000). Toutefois, certaines études ont révélé le rôle protecteur de l'autophagie contre les infections virales. L'autophagie peut limiter la réplication virale du virus TMV et du virus Sindbis (Liu et al., 2005; Schmid et Munz, 2007; Orvedahl et al., 2010). Pourtant, certains virus, comme les picornavirus et les coronavirus, ont pu contrecarrer l'activité protectrice de l'autophagie en bloquant la fusion entre les autophagosomes et les lysosomes et en se répliquant à la surface des autophagosomes (Schmid et Munz, 2007) (Figure 13).

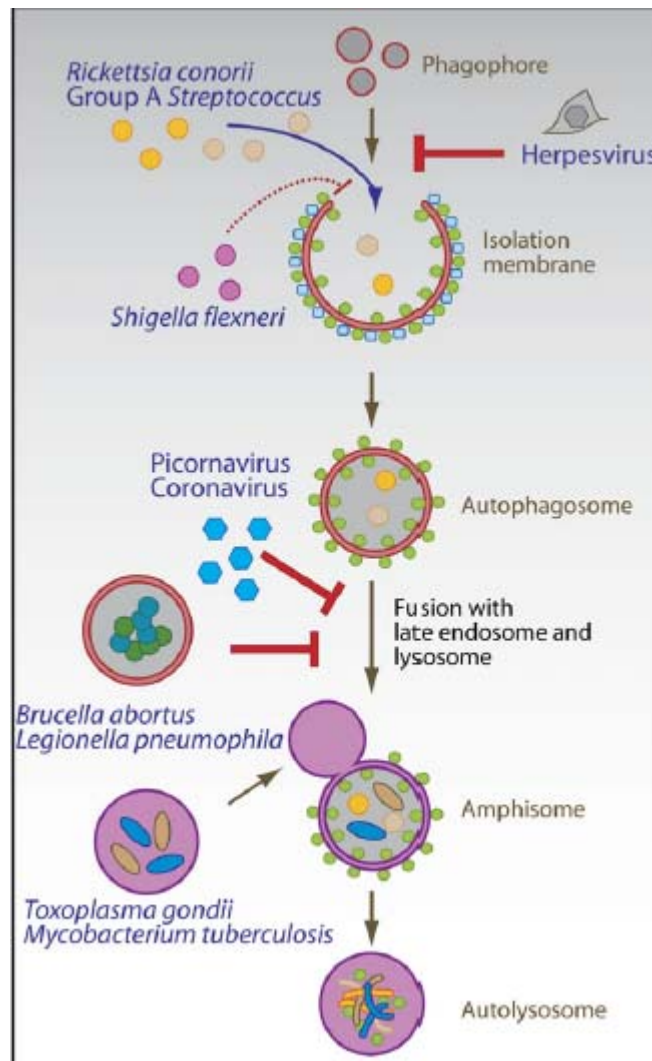


Figure 13 : **Évasion de certains virus de l'immunité innée contrôlée par l'autophagie.**

Les picorona virus et les corona virus interfèrent avec la fusion de l'autophagosome avec les lysosomes et les endosomes tardifs afin d'assurer leur réplication à la surface des membranes autophagosomales (image tirée de Schmid et Munz, 2007).

Durant une infection virale, un autre rôle de l'autophagie consiste à délivrer les constituants des pathogènes aux récepteurs endosomaux tels que les TLRs, stimulant ainsi l'immunité innée (Lee et al., 2007).

En effet, l'autophagie est requise pour la signalisation cellulaire médiée par les TLRs (Lee et al., 2007). Dans les cellules dendritiques, la protéine autophagique Atg5 est

indispensable pour le transfert du matériel génétique du virus de Sendai et du virus de la stomatite vésiculaire (VSV) du cytoplasme vers les récepteurs TLR7 localisés au niveau des compartiments vacuolaires (Lee et al., 2007). La reconnaissance du matériel génétique viral par TLR7 entraîne la synthèse d'INF- α , renforçant ainsi la réponse immunitaire vis-à-vis de l'infection virale. Aussi, il a été démontré que le recrutement de TLR9 au niveau des autophagosomes engendre une amplification de la cascade de signalisation des TLRs et du récepteur des cellules B (BCR) (Chaturvedi et al., 2008).

L'engagement de TLR7 et de TLR3 induit l'initiation de l'autophagie, favorisant la résistance contre les pathogènes (Shi et Kehrl, 2008; Delgado et al., 2008). Une inhibition des protéines adaptatrices MyD88 et TRIF de la cascade de signalisation des TLRs induit une suppression de l'autophagie (Shi et Kehrl, 2008). Cependant, les mécanismes, qui lient l'autophagie et l'immunité innée médiée par les TLRs ne sont pas encore clairs. Mis à part l'implication de la signalisation TLR dans l'activation de l'autophagie, on note que les PRRs (pattern-recognition-receptors) stimulent l'autophagie (Yano et al., 2008).

En plus de l'implication de la digestion autophagique dans l'immunité innée, l'autophagie joue aussi un rôle indubitable dans l'immunité adaptative en favorisant la présentation des antigènes viraux par le CMH de classe II aux cellules T. Les autophagosomes permettent le transport des protéines cytosoliques virales au CMH de classe II, menant à une présentation antigénique aux cellules T CD4⁺ (Paludan et al., 2005; Schmid et al., 2007; Nimmerjahn et al., 2003; Zhou et al., 2005). Citons l'exemple de la présentation de l'antigène viral EBNA-1 du virus d'Epstein Barr qui requiert l'autophagie (Paludan et al., 2005). Également, on a mis en évidence que l'induction de la voie autophagique par le traitement à la rapamycine induisait une augmentation de la présentation antigénique de l'antigène Ag85B chez les cellules macrophages et les cellules dendritiques infectées par *M. tuberculosis* (Levine et al., 2009). En plus, l'apprêtement des antigènes pour la présentation par le CMH de classe I a été démontrée par une autre étude. Cette dernière suggère que la présentation antigénique par le CMH de classe I aux cellules T CD8⁺ durant une infection virale par HSV-1 est augmentée par l'autophagie (English et al., 2009). Il est intéressant de noter que cette étude confirme l'implication de l'autophagie dans l'apprêtement et la présentation des peptides viraux endogènes associés aux CMH de classe I en détectant une réduction de la capacité à stimuler les cellules T CD8⁺ par les macrophages dans lesquels l'autophagie est réprimée

par une interférence par ARN contre la protéine Atg5. Aussi, l'implication de l'autophagie dans l'apprêtement vacuolaire et la présentation antigénique par le CMH de classe I de l'antigène gB est soutenue par des observations indiquant une amélioration de la stimulation des cellules T CD8⁺ lors du traitement des macrophages infectés par HSV-1 à la rapamycine, un inhibiteur de mTOR.

2. Caractéristique du virus Herpes simplex type 1 (HSV-1)

2.1 Caractéristique morphologique du HSV-1

HSV-1 est un agent infectieux qui est composé par une nucléocapside comprenant l'ADN viral, une capsidie icosaédrale qui recouvre le core, un tégument qui entoure la capsidie, et une enveloppe lipidique exposant des glycoprotéines virales. Le diamètre de la capsidie virale est d'environ 125 nm tandis que la taille du virus mature peut atteindre 225 nm (Knipe et Howley, 2007).

2.2 Xénophagie et mécanisme d'évasion de HSV-1

La xénophagie, un type de l'autophagie, sert entre autre de stratégie de défense antivirale. L'induction de la xénophagie permet de réduire la réplication de certains pathogènes (Rich et al., 2003; Andrade et al., 2006). D'autre part, elle permet le transport des particules virales aux compartiments lysosomaux pour les dégrader (Georgescu et Goruppi, 2009). Également, la xénophagie intervient dans la réponse immunitaire adaptative en contribuant à l'augmentation de la présentation antigénique par le CMH I et II (Crotzer et Blum, 2005; Dengjel et al., 2005; English et al., 2009). Malheureusement, HSV-1 a pu développer des stratégies pour atténuer la réponse immunitaire adaptative médiée par les cellules T CD4⁺ et T CD8⁺. La protéine virale ICP47 peut lier la molécule de transport des peptides viraux (TAP) et provoquer son inhibition, menant ainsi à une diminution importante de l'expression des antigènes viraux par le CMH I à la surface des cellules infectées (Glodsmith et al., 1998; Orr et al., 2005). De plus, ICP47 inhibe directement l'interaction entre les cellules T CD8⁺ et les neurones infectés par HSV-1 en contribuant à empêcher l'expression de CMH I par les neurones infectés (Goldsmith et al., 1998).

Également, HSV-1 a développé des stratégies pour contourner la défense antivirale médiée par la xénophagie (Alexander et Leib, 2008). Le virus bloque l'activité autophagique afin

d'éviter la dégradation des particules virales suite à la fusion des xénophagosomes avec le lysosome, ce qui permet de créer un environnement favorable à sa réplication. Néanmoins, des études récentes ont conclu que suite à une infection des macrophages par HSV-1, la capacité du virus HSV-1 à atténuer l'autophagie durant une phase précoce de l'infection est contrebalancée lors d'un stade tardif de l'infection par une réponse cellulaire impliquant l'induction d'une forme d'autophagie distincte de l'autophagie « classique » (English et al., 2009). Cette nouvelle forme de l'autophagie est caractérisée par la formation d'une structure formée par quatre feuilletts membranaires dérivés de l'enveloppe nucléaire (English et al., 2009). De plus, cette nouvelle structure vacuolaire participe à l'apprêtement des antigènes viraux pour la présentation antigénique par le CMH I, conduisant ainsi une stimulation de la réponse immunitaire adaptative.

L'inhibition de l'autophagie par HSV-1 fait appel à plusieurs mécanismes qui contrecarrent ainsi la réponse immunitaire innée (Figure 14). En effet, l'expression de la protéine ICP34.5 encodée par HSV-1 permet d'inhiber l'activité de la kinase PKR. ICP34.5 interagit avec la protéine phosphatase 1 α (PP1 α) par son domaine C-terminal (Pasiaka et al., 2006). Cette interaction entraîne la déphosphorylation de eIF2 α (He et al., 1997). Il est intéressant de noter que ICP34.5 peut lier Béclin 1, qui est requise pour la formation des autophagosomes (Orvedahl et al., 2007). Des recherches suggèrent que les acides aminés 68-87 d'ICP34.5 interagissent avec Béclin 1, bloquant ainsi l'autophagie (Kudchodkar et Levine, 2009). Une délétion du domaine BBD (Béclin 1-binding domain) présent dans ICP34.5 engendre une incapacité du virus à contrecarrer l'autophagie et une diminution de sa pathogénicité (Orvedahl et al., 2007).

ICP34.5 médie une réplication virale efficace et la neurovirulence du HSV-1 (Bolovan et al., 1994; Liu et al., 2003; Leib et al., 2009). L'importance de cette protéine virale dans l'inhibition de l'autophagie a été soutenue par plusieurs travaux.

De plus, HSV-1 peut induire une inhibition de l'autophagie via l'action de la glycoprotéine virale gB. En effet, lors d'une infection par HSV-1, la protéine gB peut se lier à « PKR-like ER-localized eIF2 α kinase » (PERK), un senseur de stress, situé au niveau de RE pour contrer son action de phosphorylation d'eIF2 α et par conséquent maintenir une apparence d'homéostasie dans le RE (Mulvey et al., 2007). D'autre part, des recherches ont souligné le rôle de gB pour bloquer le déclenchement de l'autophagie en réduisant la phosphorylation

d'eIF2 α (Lee et al., 2009). Cependant, dans notre laboratoire, lors d'une infection virale des macrophages par HSV-1, une nouvelle forme de l'autophagie se déclenchait pendant une phase tardive de l'infection (English et al., 2009). Toutefois, la machinerie moléculaire responsable de cette nouvelle réponse autophagique demeure inconnue. Étant donné que l'isolation des organites est une étape cruciale pour leur étude protéomique, il est fortement utile d'isoler les noyaux afin de caractériser les protéines impliquées dans cette voie autophagique nouvellement découverte.

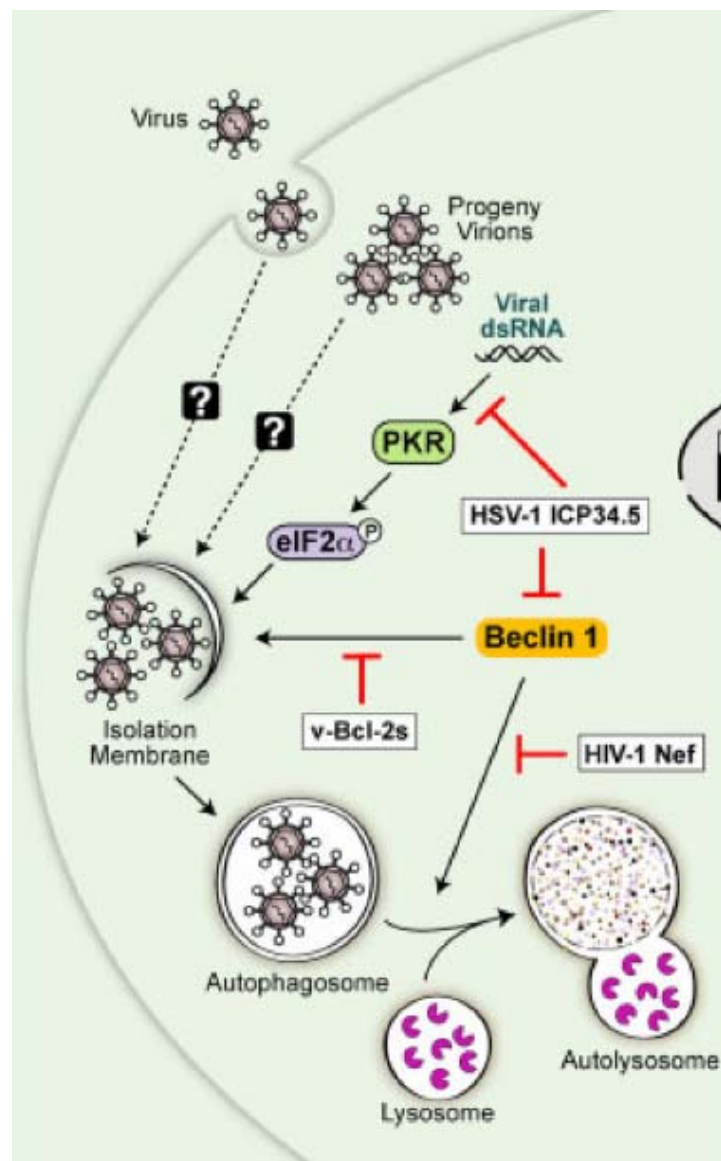


Figure 14: Inhibition de l'autophagie par HSV-1.

ICP34.5 bloque l'activité de Béclin 1, menant à une inhibition de la formation des autophagosomes. Aussi, ICP34.5 atténue l'activité de la protéine kinase PKR en induisant une déphosphorylation d'eIF2 α (image tirée de Kudchodkar et Levine, 2009).

3. Isolation des organites

Les cellules eucaryotes possèdent plusieurs types d'organites qui effectuent diverses fonctions spécifiques. Par exemple, le RE permet la synthèse de certaines protéines et les mitochondries assurent la génération d'ATP et interviennent dans la régulation des certaines voies de signalisation telle que l'apoptose (Dimmer et Scorrano, 2006).

L'identification des protéines et la connaissance de leur localisation dans les différents compartiments cellulaires sont capitales pour la compréhension de leurs fonctions physiologiques. Toutefois, la protéomique, les analyses biochimiques et l'étude de la structure et les fonctions de ces organites exigent l'utilisation d'échantillons purs. La nécessité d'isoler les organites pour faire une analyse protéomique de l'organite en question par spectrométrie de masse implique la séparation de l'organite d'autres compartiments de la cellule (Pandey et al., 2006; Sweetlove, 2006). Malheureusement, certains contaminants peuvent rester associés physiquement aux organites durant les étapes de purification. Donc, il est impératif d'avoir le plus de pureté possible, car lors d'une étude protéomique par spectrométrie de masse, les protéines localisées au niveau de l'organite d'intérêt et les contaminants seront identifiés (Wiederhold et al., 2010).

Des études précédentes ont analysé des protéines à partir des organites isolées de *Saccharomyces cerevisiae*, vu que c'est un organisme eucaryote (Yin et al., 2005; Inadome et al., 2005; Sarry et al., 2007; Wiederhold et al., 2009; Mosley et al., 2009).

Pareillement, plusieurs études protéomiques des organites ont eu recours à l'isolation des organites de cellules eucaryotes (Huber et al., 2003; Andersen et al., 2002; Hicox et al., 2010). Plusieurs méthodes d'isolation des noyaux ont été développées par fractionnement cellulaire (Novikoff et Holtzman, 1976; Alberts et al., 1989; Darnell et al., 1990).

Cette technique, basée sur les propriétés physiques (charge, densité), consiste en une centrifugation différentielle suivie d'une centrifugation sur gradient de densité, aboutissant

ainsi à la séparation de différentes fractions (noyau, mitochondries, lysosomes, RE...etc.) (Huber et al., 2003). Citons aussi l'exemple de la matrice nucléaire, qui a été isolée à partir de noyaux provenant du tissu de foie de souris par fractionnement cellulaire (Berezney et Coffey, 1977).

Aussi, plusieurs études ont pu isoler des mitochondries de différents tissus, incluant des fibroblastes en culture, le foie, les muscles squelettiques et les cellules cancéreuses du colon (Thiede et al., 2002 ; Frezza et al., 2007). Également, les noyaux ont été séparés d'autres organites dans quelques études. Cependant, les recherches ont été surtout faites sur des noyaux issus de cellules de foie (Blobel et Potter, 1966 ; Fleischer et Kervina, 1974; Berezney et Coffey, 1977; Howell et al., 1989; Greenberg et Bender, 1997 ; Farrell et Robert, 1998).

4. Introduction au projet de recherche

Des études précédentes ont permis d'identifier la machinerie moléculaire nécessaire à la formation des autophagosomes classiques formés par une double membrane. En effet, 31 molécules Atg ont été identifiées comme étant essentielles pour ce processus cellulaire (Klionsky et al., 2003; Huang et Klionsky, 2007). L'identification de ces protéines chez la levure et la détection de leurs orthologues chez autres organismes montrent la conservation de l'autophagie chez les eucaryotes. La découverte de ces molécules impliquées dans le mécanisme de l'autophagie a permis d'établir le rôle de l'autophagie dans la réponse immunitaire innée et adaptative (Deretic 2005; Schmid et al., 2007).

Tout récemment, dans notre laboratoire, durant une infection virale par HSV-1 des macrophages murins, une nouvelle structure autophagique a été détectée dans une phase tardive de l'infection en plus des autophagosomes classiques (English et al., 2009). La caractérisation morphologique de cette nouvelle forme par microscopie électronique a mis en évidence la présence de quatre membranes connectées à l'enveloppe nucléaire. Cette structure semble être issue par un processus dit de « coiling » de la membrane nucléaire interne et externe, formant ainsi un compartiment à quatre feuillets qui peut englober une portion cytoplasmique (Figure 15). Ce compartiment peut encercler des particules virales présentes dans le cytoplasme. Cette structure autophagique n'a pas été observée chez des cellules non infectées par HSV-1 et des cellules traitées à la rapamycine, ce qui suggère

l'implication de cette nouvelle structure dans la défense contre le virus. Également, cette recherche a confirmé la nature autophagosomique de cette structure en détectant l'accumulation du marqueur de l'autophagosome LC3, tant au niveau de la structure qui émerge de la membrane nucléaire que dans la structure à quatre membranes relâchée de l'enveloppe nucléaire et située dans le cytoplasme (English et al., 2009). Les résultats de cette recherche ont aussi indiqué une faible localisation de LC3 conduisant à la formation de cette nouvelle forme de l'autophagosome lors d'infection des macrophages par HSV-1 mutant ($\Delta 34.5$) inapte à induire une inhibition de l'autophagie comparativement au HSV-1 WT. Cela laisse supposer que certaines protéines, telles que Béclin 1, impliquées dans la formation des autophagosomes « classiques », ne sont pas requises pour la formation des autophagosomes issus de l'enveloppe nucléaire. Toutefois, la présence de LC3 au niveau de cette structure dérivée du noyau présage la participation partielle de la machinerie moléculaire de l'autophagie « classique » dans le développement de cette nouvelle forme de l'autophagie suite à l'infection par HSV-1.

À la lumière de ces travaux, mon projet de recherche consistait à développer et optimiser un outil d'isolation des noyaux de macrophages pour servir à une étude protéomique des autophagosomes issus du noyau lors d'une infection par HSV-1. Il était nécessaire d'établir un protocole d'isolation des noyaux des macrophages puisqu'il n'existait pas dans la littérature aucun protocole d'isolation des noyaux de ces cellules. Cependant on a tenté d'appliquer les techniques d'isolation qui existent déjà pour les autres cellules, mais ces techniques n'aboutissaient pas à un enrichissement en noyaux et un degré de pureté acceptable. Par conséquent, en premier lieu, une technique a été développée pour isoler des noyaux à partir des macrophages infectés et non infectés par HSV-1. En second lieu, l'état de la pureté des préparations de noyaux isolés et la cinétique de la formation des autophagosomes issus des noyaux ont été étudiés dans les deux lignées cellulaires de macrophages employées dans l'étude de English et al. Finalement, à long terme, à partir des échantillons de noyaux infectés, il sera possible de caractériser et qualifier les molécules impliquées dans la formation des autophagosomes dérivés de l'enveloppe nucléaire par une approche de protéomique.

Ce mémoire présente donc le développement d'un nouveau protocole d'isolation des noyaux adapté aux macrophages qui constitue un outil indispensable pour la

compréhension de la machinerie moléculaire impliquée dans la formation des autophagosomes émergés du noyau durant une infection par HSV-1.

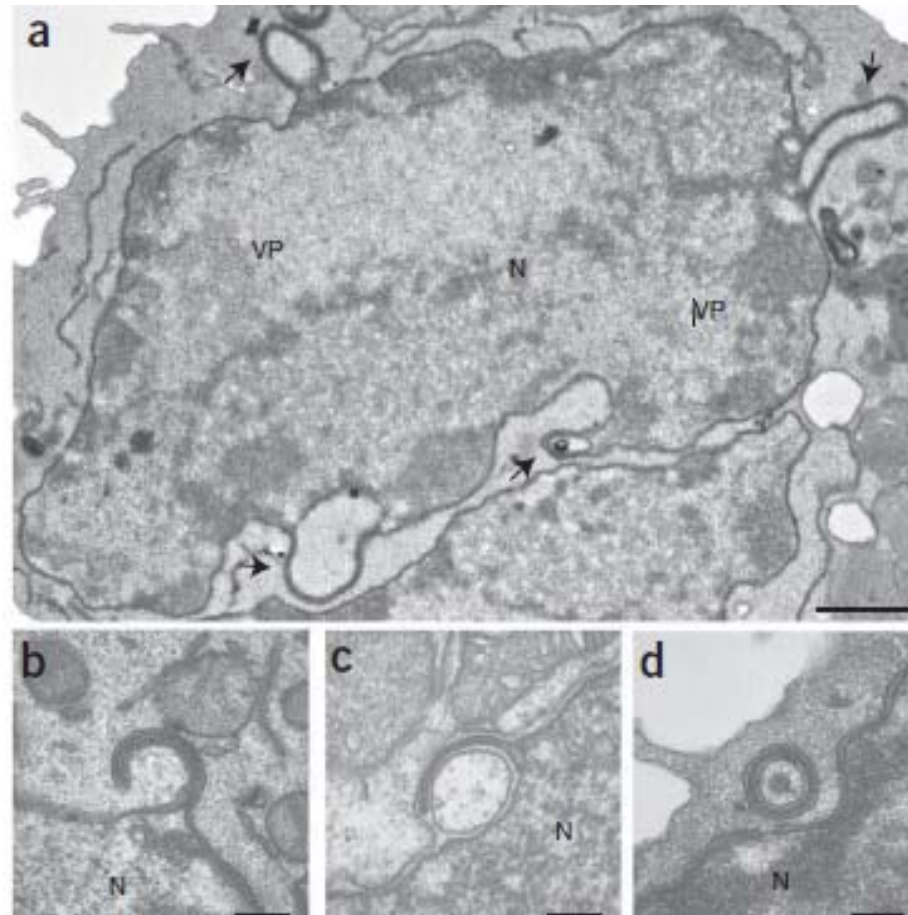


Figure 15 : **Visualisation par microscopie électronique des autophagosomes dérivés du noyau lors d'une infection par HSV-1.**

(a-b-c-d) processus de « coiling » de la membrane nucléaire interne et externe, résultant en la formation d'une structure à quatre membranes qui émerge du noyau des cellules infectées par HSV-1. VP: particule virale; N: noyaux (image tirée de English et al., 2009).

Matériels et Méthodes

1. Culture cellulaire

Les lignées cellulaires de macrophage de souris (RAW kb et BMA Clone 11) ont été développées dans notre laboratoire. Les cellules RAW kb ont été obtenues par une transfection des macrophages RAW 264.7 (ATCC, TIB-71) par un plasmide avec un promoteur fort qui code pour l'allèle Kb du CMH. Les cellules RAW kb, qui expriment l'allèle kb de façon stable et constitutive, ont été sélectionnées par la résistance à un facteur de sélection (antibiotique G418). Les cellules BMA Clone 11 ont été issues du sous clonage des macrophages BMA3.1A7 dérivées de souris C57BL/6 (Kovacsovic et Rock, 1995) par une dilution limitée. Ces cellules ont été cultivées dans un milieu DMEM complet (Wisent) avec 10% de FBS inactivé à la chaleur (56°C), des antibiotiques soit la pénicilline (100unité/ml) et la streptomycine (100µg/ml) et la glutamine (2mM). Les cellules ont été cultivées à 37°C avec 5% de CO₂ dans des pétris de diamètre 100 mm.

2. Virus et infection des cellules

La souche F du HSV-1 de type sauvage (WT) (ATCC, VR733), a été utilisée pour infecter les macrophages. Ce virus fut fourni gracieusement par le Dr Roger Lippé (département de pathologie et biologie cellulaire, Université de Montréal).

Les macrophages ont été infectés par une incubation pendant 30 minutes avec HSV-1 WT dilué avec du DMEM complet pour avoir une MOI de 10. Après l'aspiration du milieu contenant les virus, les cellules ont été incubées dans du DMEM frais pendant 8 heures.

3. Immunofluorescence des macrophages

Les cellules non infectées (contrôles) et les cellules infectées par HSV-1 WT présentes dans une plaque à 24 puits ont été incubées avec du paraformaldéhyde 4% (présent dans PBS à pH7.4) pendant 2 minutes à la température de la pièce. Après l'aspiration du paraformaldéhyde, les macrophages contrôles et infectés par le virus étaient fixés et perméabilisés avec une solution CytoFix/Cytoperm (BD Bioscience) durant 20 minutes à 4°C. Après, les cellules étaient incubées avec l'anticorps primaire anti-LC3a clivé fait chez le lapin (ABGENT) dilué 1 : 200 et l'anticorps primaire anti-Vp5 fait chez la souris (MAB H4.1) dilué 1 : 1000 pendant 2 heures à la température de la pièce. La dilution des anticorps

primaires est faite dans une solution contenant FBS et saponine fournie par le Kit CytoFix/Cytoperm (BD Biosciences) et diluée à 1 :10 dans l'eau. Après l'incubation des cellules avec les anticorps primaires, les cellules étaient incubées dans les anticorps secondaires, AlexaFluor568 goat-anti-rabbit et Alexa Fluor488 goat anti-mouse (Invitrogen), dilués à 1 : 1000 pour visualiser respectivement LC3a et VP5 dans les cellules infectées et les cellules contrôles. Les cellules ont été analysées par confocal laser-scanning microscope (LSM 510Meta Axiovert; Carl Zeiss).

4. Isolation des noyaux

La méthode utilisée pour l'isolation des noyaux des cellules de macrophages fut adaptée de la technique utilisée par le groupe du laboratoire du Dr Roger Lippé pour les cellules Hela en suspension (Rémillard-Labrosse et al., 2006). Les cellules récoltées après deux reprises de lavage avec du PBS 1X ont été homogénéisées à l'aide d'une méthode mécanique. En effet, les cellules ont été resuspendues dans un tampon hypotonique RSB pH7.4 modifié de Penman (Penman 1966) (NaCl 10 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.4, MgCl₂ 5mM) qui engendre un gonflement des cellules pour faciliter le cassage. Ensuite après la vérification de l'état du gonflement des cellules par microscope photonique, les cellules ont été cassées dans un ratio de 2×10^7 cellules/ml par un Cell craker à l'aide d'une bille de taille 7.978mm. Également, une autre taille de bille (8.002 mm) a été testée pour le type cellulaire utilisé pour cette étude. Après le cassage, l'osmolarité du lysat cellulaire a été rééquilibrée en ajoutant deux volumes d'une solution contenant PBS 1X et MgCl₂ 5mM. Par la suite, la solution de lysat cellulaire a été déposée sur un coussin d'optiprep 40 % et une centrifugation à basse vitesse (800 g) a été appliquée pendant 15 minutes. Les différentes concentrations d'optiprep ont été obtenues à partir de la dilution de la solution dite *working solution* WS 50% d'optiprep avec le milieu d'homogénéisation HM pH7.8 (0.25M sucrose, KCl 25Mm, MgCl₂ 5mM, Tris-HCl 20mM) pour avoir le pourcentage voulu. Le matériel situé sur le coussin d'optiprep a été récupéré par une pompe péristaltique et diluée dans une solution HM ou l'optiprep 40% pour avoir une concentration d'optiprep 25%. Finalement, un gradient d'optiprep composée de quatre concentrations différentes a été fait. D'abord, une couche d'optiprep 35% placée au fond du tube SW41 a été recouverte par une couche d'optiprep 29 %. Puis une couche d'optiprep 27% a été ajoutée. Subséquemment, une

couche d'optiprep 25%, contenant les noyaux résultants de la centrifugation à basse vitesse, a été placée à la surface du gradient. Le gradient était centrifugé à 10,000 g pour 20 minutes. Les noyaux prélevés à l'interface 29/35 du gradient d'optiprep ont été dilués dans du Laemlli 1X pour faire des études de la pureté des préparations de noyaux. Également, le rendement des noyaux obtenus a été examiné en comptant le nombre final de noyaux colorés au bleu de trypan par l'hématimètre par rapport au nombre initial de cellules. Aussi cette méthode a été réalisée en effectuant d'autres techniques de cassage de cellules notamment par un homogénéisateur Dounce et par une aiguille à microémulsion. En outre, pour cette technique d'isolation des noyaux, un tampon HB (8% sucrose, 3mM imidazole pH7.4, 2mM DTT, cocktail d'inhibiteur des protéases 1X) a été testé pour resuspendre les cellules avant de les briser avec Dounce dans un ratio 2×10^7 cellules/ml. Par la suite, les étapes précédées pour l'isolation des noyaux ont été effectuées selon la description ci-dessus.

Toutefois, plusieurs modifications ont été réalisées pour cette méthode afin de mettre au point et d'adapter l'isolation des noyaux aux types cellulaires employés pour cette étude.

En premier lieu, un nombre limité de cellules (entre 1×10^7 et 3×10^7) a été récupéré après deux lavages avec PBS 1X. Plus tard, les cellules ont été cassées en utilisant 10 ml d'un tampon de lyse (Kit Sigma-Aldrich ; NUC-201) dont du Triton X-100 0.1 %, du dithiothreitol (DTT) 1mM et des inhibiteurs de protéases complete 1X (Roche) ont été ajoutés. Après une incubation de 3, 5 et 7 minutes, le lysat cellulaire a été resuspendu dans un volume de 28ml de sucrose 1.8M (sucrose 2M et sucrose cushion (Kit d'isolation des noyaux ; Sigma), et a été mis au dessus d'un coussin de 10ml de sucrose 1.8M. Les noyaux ont été obtenus après une centrifugation de 30,000 g pour 45 minutes (rotor SW28 Beckman). L'état de lyse a été examiné par un microscope optique. Le culot de noyaux récoltés a été utilisé pour détecter la pureté et vérifier le rendement en noyaux

Un autre modèle expérimental utilisé a été développé pour maximiser et mettre au point l'isolation des noyaux (Figure 16). En effet, lors de l'isolation des noyaux, toutes les étapes s'effectuaient à une température de 4°C et les solutions utilisées sont aussi ajustées à 4°C. L'isolation des noyaux a été faite à partir des macrophages non infectés (contrôles) et des macrophages infectés par HSV-1 (WT) pour 8 heures. Un nombre maximal de 3×10^7 de cellules comptées par l'hématimètre a été récolté par tube dans le milieu DMEM. Après

une étape de centrifugation pendant 5 minutes à 500 g, le culot des cellules récolté a été lavé deux fois dans le PBS 1X (Wisent).

4.1 Homogénéisation des cellules

L'isolation des noyaux requiert l'homogénéisation des cellules. Celle-ci est réalisée à l'aide d'un détergent et d'une technique mécanique. D'abord, le culot de cellules a été incubé environ 5 minutes dans un tampon de lyse froid (Kit Sigma-Aldrich) renfermant du Triton X-100 0.1%, du dithiothreitol (DTT) 1mM et des inhibiteurs de protéases complete 1X (Roche) ont été ajoutés. Subséquemment, les cellules ont été brisées aussi mécaniquement par cavitation en utilisant un cell cracker dans lequel une bille de taille 8.002mm a été placée au lieu d'une bille de taille 7.978mm.

Pour les cellules non infectées, 1 à 2 passages ont été nécessaire pour assurer efficacement le cassage des cellules alors que pour les cellules infectées 2 passages s'avéraient essentiels pour le cassage. La qualité de la lyse a été vérifiée par microscopie photonique (Zeiss Axiovert 25). Également, la vérification des noyaux intacts colorés au bleu de trypan a été effectuée par observation au microscope optique. Une fois les cellules brisées, 10ml de sucrose 1.8M (sucrose 2M et sucrose cushion (Kit d'isolation des noyaux; Sigma- Aldrich) est ajouté au lysat cellulaire résultant pour arrêter la lyse cellulaire et éviter ainsi de détériorer les noyaux.

4.2 Purification des noyaux

La purification des noyaux requiert des étapes de centrifugation en réalisant un gradient discontinu de densité. Ces étapes de centrifugation permettent un fractionnement cellulaire séparant ainsi les noyaux d'autres constituants cellulaires. Premièrement, un gradient de sucrose a été fait dans des tubes d'ultracentrifugation SW28. Ce gradient est composé d'une couche de 10 ml de sucrose 1.8M recouverte d'une autre solution formée de 10ml de cellules lysées auquel un volume 18ml de sucrose 1.8M est additionné. Le gradient a été centrifugé pendant 45 minutes à 13000 rpm (30,000 g) en utilisant un rotor SW28 (Beckman). La pureté du culot de noyau prélevé après la centrifugation a été examinée par immunobuvardage et par microscopie électronique. Deuxièmement, un autre gradient discontinu a été établi en utilisant une solution d'optiprep.

Le gradient discontinu d'optiprep est constitué de trois couches : 25%, 30% et 35%. Ces différentes concentrations sont obtenues à partir de la solution dite *working solution* (WS) de 50 % d'optiprep qui a été diluée avec le milieu d'homogénéisation HM pH7.8 (0.25M sucrose, KCl 25Mm, MgCl₂ 5mM, Tris-HCl 20mM) pour avoir le pourcentage adéquat. La solution (WS) est obtenue en mélangeant 5 volumes de la solution stock d'optiprep commercialisé 60% (Axis-Shield) avec un volume de diluant pH7.8 (KCl 150Mm, MgCl₂ 30Mm, Tris-HCl 120Mm). Dans des tubes SW41, 2.2 ml d'optiprep 35% a été placé au fond du tube, suivie de 2.89 ml d'optiprep 30 %. Puis, le culot de noyau obtenu par la centrifugation du gradient de sucrose a été resuspendu dans 5ml d'optiprep 25% et déposé à la surface du gradient d'optiprep. Ensuite, le gradient a été centrifugé à 7600 rpm (10,000 g) (rotor SW41-Ti Beckman) pendant 20 minutes. À la fin de la centrifugation, les noyaux ont été récoltés au fond du tube au lieu d'être au niveau d'interface 30/35% selon autre protocole utilisant un gradient d'optiprep, où les noyaux n'ont pas été prélevés au fond du tube (Graham, 2001). Pour augmenter la pureté des noyaux, les culots des noyaux ont été encore resuspendus dans 10ml de PBS 1X froid et ultracentrifugés pendant 30 minutes à 15000 rpm (rotor SW41-Ti Beckman). Le surnageant obtenu a été éliminé et les culots de noyaux ont été placés dans un volume approprié de tampon Laemmli 1X (0.05M Tris-HCl pH6.8, SDS 1%, glycérol 10%, 0.005% bleu du bromophénol, mercapthoéthanol 1%) pour réaliser certaines expériences, notamment l'analyse de la pureté des préparations de noyaux par immunobuvardage avant l'identification des protéines par spectrométrie de masse. Également, les noyaux récoltés ont été resuspendus dans du PBS 1X et centrifugés pendant 5 minutes à 15000 rpm pour analyser morphologiquement la pureté des noyaux par la microscopie électronique. Aussi, on a testé si le nombre cellulaire utilisé peut influencer le rendement et l'état de pureté des préparations de noyaux obtenus par cette méthode.

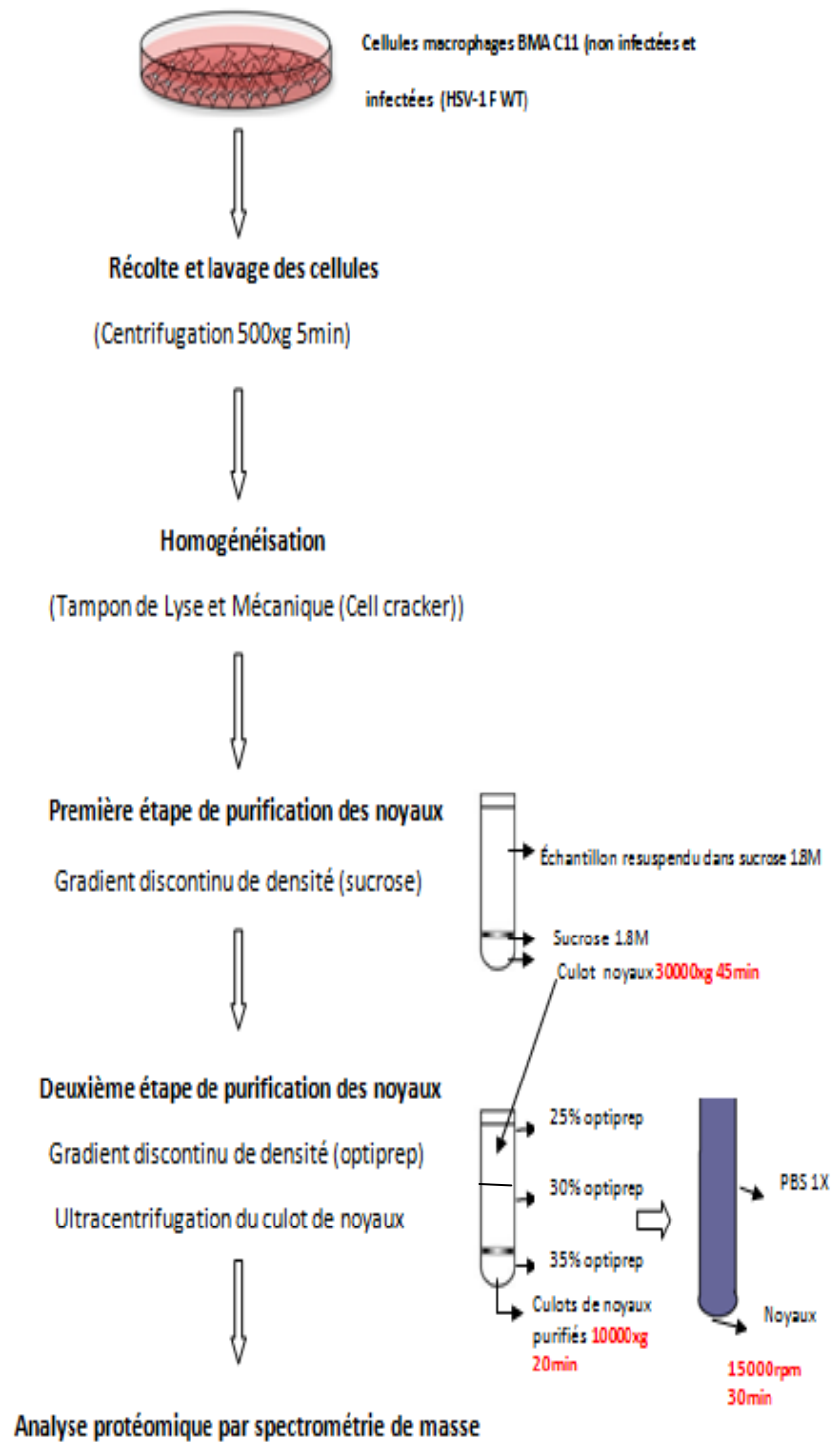


Figure 16 : **Méthode utilisée pour l'isolation des noyaux de macrophages.**

5. Préparation du lysat cellulaire total (TCL)

Les cellules de macrophages cultivées (non infectées et infectées par le HSV-1) dans des pétris 100mm ont été récoltées par centrifugation à 500 g (rotor GS-6R Beckman) pendant 5 minutes à 4°C. Après deux lavages des cellules avec le PBS 1X, le culot obtenu a été resuspendu dans 1ml du Laemmli 1X contenant de la benzodase nucléase (250 unités/ml) (Novagen).

6. Dosages des protéines par la méthode EZQ (Invitrogen)

La technique de la détermination de la concentration des protéines implique en premier lieu la préparation de la courbe standard, le lysat cellulaire total (TCL) des cellules infectées et non infectées, et les échantillons des noyaux recueillis dans le tampon Laemmli 1X après l'isolation des noyaux.

Pour ce faire, une courbe standard a été effectuée en diluant avec le tampon Laemmli 1X une solution de 2mg/ml d'ovalbumine afin d'obtenir plusieurs concentrations notamment 0mg/ml, 0.05mg/ml, 0.1mg/ml, 0.2 mg/ml, 0.5mg/ml, 1mg/ml, 1.5mg/ml et 2mg/ml. Ces dilutions composant la courbe standard, les échantillons des noyaux et les TCLs ont été chauffés à 95°C pendant 5 minutes pour dénaturer les protéines. Les TCLs chauffés et les échantillons de noyaux ont été dilués 1 :10 avec Laemmli 1X. Ensuite, 1µl de tous les tubes à doser a été chargé par puits en triplicata sur un papier à essai déposé sur une plaque de 96 puits. Puis, le papier a été séché et incubé avec du méthanol pendant 5 minutes à la température de la pièce. Ensuite, après le séchage du papier, les protéines ont été colorées avec un composant A (Kit EZQ ; Invitrogen) pendant 30 minutes en agitant. Par la suite, le papier a été rincé trois fois dans une solution de lavage (10% méthanol et 7% acide acétique) puis le papier a été séché. La lecture de la concentration protéique est effectuée par la mesure de la fluorescence à 418nm d'excitation et à une longueur d'onde 650nm d'émission au moyen d'un spectrofluomètre (SpectraMax Gemini EM).

7. Étude de la pureté des noyaux isolés

7.1 Immunobuvardage de type western blot

7.1.1 Electrophorèse et transfert

Les échantillons des noyaux récoltés par l'isolation des noyaux et les TCLs dénaturés à 95°C pendant 5 minutes, et le marqueur Standard de poids moléculaire connu (Precision Plus Biorad) ont été chargés sur un gel de SDS-polyacrylamide 4-12% (Biorad). Ensuite, l'électrophorèse est utilisée sous un voltage constant de 200V dans un tampon de migration (Tris 25mM, glycine 192mM, SDS 0.1%) pendant 30 minutes à la température de la pièce. Après la migration des protéines en fonction de leur poids moléculaire, les protéines ont été transférées sur une membrane de PVDF (polyvinylidene fluoride) 0,22um qui a été émergée dans le méthanol 100% durant 5 minutes et dans le tampon de transfert pendant 5 minutes sous agitation. L'électro-transfert est réalisé à un courant constant 300 mA pendant 30 minutes dans un tampon de transfert contenant Tris 50mM, glycine 380mM, SDS 0.1% et méthanol 20%. Pour l'immunobuvardage de l'anticorps primaire anti-LC3 (faible poids moléculaire), le transfert a été effectué pendant 20 minutes au lieu de 30 minutes.

7.1.2 Hybridation des protéines avec les anticorps

Après l'étape de transfert des protéines, la membrane PVDF est incubée pour une heure sous agitation douce et à la température de la pièce dans une solution de blocage constituée de PBS 1X, Tween 20 0.2% et 5% de lait écrémé en poudre. Cette étape permet d'éviter les liaisons non spécifiques des anticorps à la membrane. Ensuite, la membrane a été coupée en fonction du poids moléculaire de l'anticorps primaire à tester et a été incubée dans l'anticorps primaire dilué avec la solution de blocage avec agitation pendant une heure à la température de la pièce. Les anticorps primaires utilisés sont mentionnés dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Les anticorps utilisés pour l'immunobuvardage des échantillons de noyaux isolés.

organites	Anticorps primaires	Poids moléculaire (KDa)	dilution	Anticorps secondaire (espèce)	Distributeur
Endosome et lysosome	Lamp-1 rat monoclonal (IgG2a)	110	1 :200	rat	Development studies hybridoma bank (DSHB)
Noyau	p62 nucleoporin souris monoclonal (IgG2b)	62	1 :250	souris	BD sciences (#610497)
Noyau	Lamine A/C souris monoclonal	70	1 :2000	souris	BD sciences (#612163)
Mitochondrie	Tim23 Souris monoclonal (IgG2a)	23	1 :2500	souris	BD sciences (#611222)
Mitochondrie	Prohibitin souris monoclonal (IgG1)	30	1 :400	souris	Neomarker (#MS 261-P1)
RE (RE)	Calnexine lapin polyclonal	90	1 :3000	lapin	Fourni par le laboratoire du Dr. Jean Bergeron
Membrane plasmique	Annexine 2 (A2) souris monoclonal (IgG1)	36	1 :1000	souris	BD sciences (#610068)
Enveloppe virale HSV-1	gB clone 10B7 souris monoclonal	100	1 :500	souris	Abcam (#ab6506)
Capside virale HSV-1	VP5 H1.4 Souris monoclonal (IgG1)	155	1 :200	souris	Acris Antibodies
Autophagosomes	LC3 I et II souris monoclonal (IgG)	17	1 :500	souris	MBL (#M115-3)
Noyau	PCNA P10 Souris monoclonal	36	1 :1000	souris	Chemicon (#CBL407)

	(IgG 2a)				
Appareil de golgi	GOSR-1 souris monoclonal	28	1 :1000	souris	Lifespan (#LS C1567/10928)
Autophagosomes	APg8b cleaved (MAP1LC3B)	17	1 :100	lapin	Abgent (#Ab-1806)

Après l'exposition des membranes avec les anticorps primaires, les membranes ont été lavées pour 10 minutes à six reprises dans la solution de blocage à la température de la pièce pour éliminer les anticorps non liés. Par la suite, les membranes ont été exposées à l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire à une dilution 1 :3000 dans la solution de blocage contenant PBS 1X, Tween 20 0.2% et 5% de lait écrémé en poudre. Les anticorps secondaires utilisés ont été couplés à la peroxydase de raifort (horse radish peroxydase (HRP)). Subséquemment, les membranes ont été rincées avec la solution de blocage pendant 10 minutes quatre fois avec agitation, suivie de trois lavages pour 5 minutes avec agitation avec le PBS 1X. Par la suite, le signal HRP est révélé en exposant la membrane à une réaction chimiluminescence avec la solution ECL (NEL105, Perkin Elmer life Sciences) pendant une minute à la température de la pièce. Finalement, les membranes ont été exposées sur des films BioMax Kodak. Ces derniers ont été développés avec le développeur 100-plus automic X-Ray après différentes durées d'exposition allant de quelques secondes à trois minutes.

7.2 Microscopie électronique

7.2.1 Fixation des échantillons

Après l'isolation des noyaux, les échantillons des noyaux issus des cellules non infectées et les cellules infectées par HSV-1 WT ont été lavés deux fois par une solution de cacodylate 0.1M, suivi d'une centrifugation à 15000 rpm pendant 5 minutes à 4°C. Après l'élimination du surnageant, les culots de noyaux ont été fixés avec une solution de glutaraldéhyde 2.5%, 0.1M cacodylate durant la nuit à 4°C.

7.2.2 Osmication et imprégnation des membranes

Suite à la fixation, les culots de noyaux ont été resuspendus avec le tampon cacodylate 0.1M et centrifugés pendant 5 minutes à 15000 rpm à 4°C. Ce lavage a été effectué 3 fois. Ainsi, les culots de noyaux obtenus, après le dernier lavage, ont été osmifiés avec une solution d'osmium OsO_4 1%, cyanure férique de potassium 1.5% et cacodylate 0.1M pendant une heure à 4°C. Puis, après la centrifugation des échantillons pendant 5 minutes à 15000 rpm, les culots de noyaux ont été lavés à trois reprises pendant 5 minutes dans la solution Maléate-NaOH 0.05M pH6. Par la suite, les échantillons ont été imprégnés dans de l'acétate d'Uranyl 2%, Maléate 0.125M durant une heure à 4°C.

7.2.3 Déshydratation des échantillons et enrobage avec l'épon

Après l'imprégnation des membranes, les échantillons ont été lavés dans le Maléate-NaOH 0.05M pH6 trois fois pendant 10 minutes à 4°C, suivi d'une déshydratation pendant 10 minutes dans l'éthanol 70% puis dans l'éthanol 90%. Par la suite, les échantillons ont été exposés à l'éthanol 100% trois fois pendant 10 minutes, suivi d'un enrobage à 2 parts/ 3 parts de l'épon/ éthanol 100% pendant une heure avec inversion. Subséquemment, les échantillons ont été enrobés avec 3 parts/ 2 parts d'épon/ éthanol 100% pendant une heure avec inversion à la température de la pièce. Finalement, les échantillons ont été enrobés dans l'épon pur et polymérisés à 60°C pendant 72 heures. Ainsi, les échantillons ont été prêts à découper à raison de 90 nanomètre d'épaisseur et à observer au microscope électronique.

Résultats

1. Étude de la cinétique de la formation des autophagosomes issus des noyaux

L'isolation des noyaux infectés par HSV-1 F WT a nécessité de déterminer la cinétique de la formation des autophagosomes dérivés des noyaux pour spécifier la durée de l'infection pour laquelle la formation des autophagosomes émergés des noyaux était remarquable. Pour ce faire, des anticorps contre les protéines virales (gB et Vp5) et des marqueurs spécifiques aux autophagosomes (LC3b et LC3a) ont été utilisés. Les résultats de la cinétique de la formation des autophagosomes à partir des noyaux RAW kb infectés ont montré un fort signal du marqueur des autophagosomes LC3b et de la protéine virale gB à 8hpi (Figure 17). Toutefois, pour détecter les autophagosomes issus des noyaux, un marquage des macrophages infectés pour 6, 8, et 10 heures avec un marqueur qui semble spécifique à ces autophagosomes, LC3a, a été réalisé. Les résultats de l'immunofluorescence ont montré une induction de l'expression de LC3a et de la protéine virale Vp5 après 6 et 10 heures d'infection (Figure 18). Cependant, aucun signal LC3a et LC3b n'a été détecté en absence d'infection.

Vu que le taux d'infection des cellules BMA C11 est élevé, on a utilisé cette lignée cellulaire qui sera le sujet de l'isolation des noyaux et de l'étude protéomique des protéines impliquées dans la nouvelle forme de l'autophagie issue du noyau. Concernant ces cellules BMA C11, la microscopie à immunofluorescence pour l'expression de LC3b et gB a indiqué un signal remarquable de LC3b et la gB après 8 heures d'infection et aucune expression de ces marqueurs en absence d'infection (Figure 19). En ce qui concerne la visualisation du marqueur spécifique des autophagosomes issus des noyaux, on a pu observer une forte réponse autophagique manifestée par un puissant signal de LC3a après 8 heures d'infection des macrophages BMA C11 (Figure 20). Après 10 heures d'infection, le signal présenté par LC3a a diminué, ce qui peut être dû à une mort cellulaire.

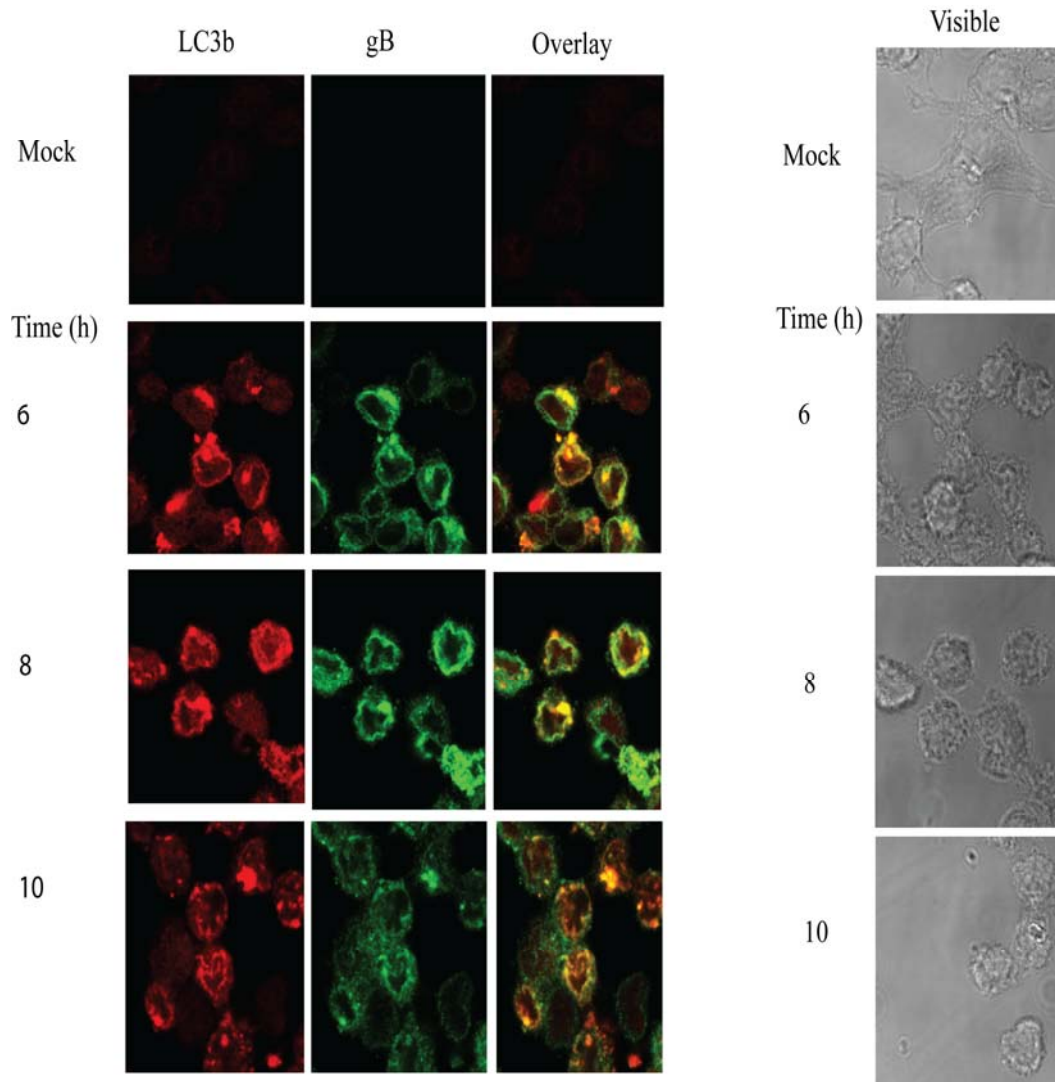


Figure 17 : Microscopie à fluorescence de l'expression de LC3b et de la glycoprotéine virale gB par les cellules macrophages RAW kb infectées par le virus HSV-1 F WT à divers temps d'infection (6, 8 et 10 heures) et par les cellules macrophages non infectées (contrôle).

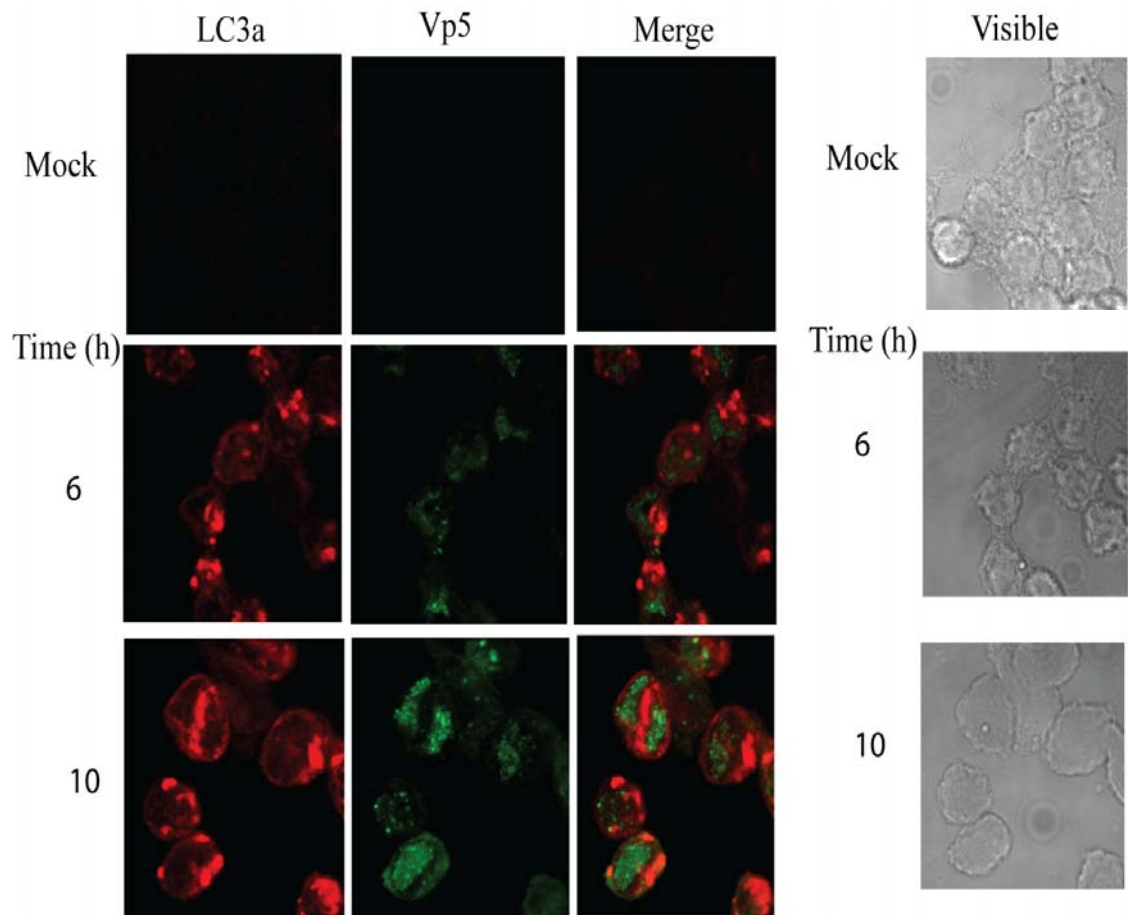


Figure 18 : Analyse par fluorescence de la cinétique de la formation de l'autophagosome issu de noyaux en détectant le signal de LC3a.

Les cellules macrophages RAW kb ont été infectées par HSV-1 F WT pour des intervalles d'incubation de 6 et 10 heures. Des macrophages non infectés sont visibles comme contrôles

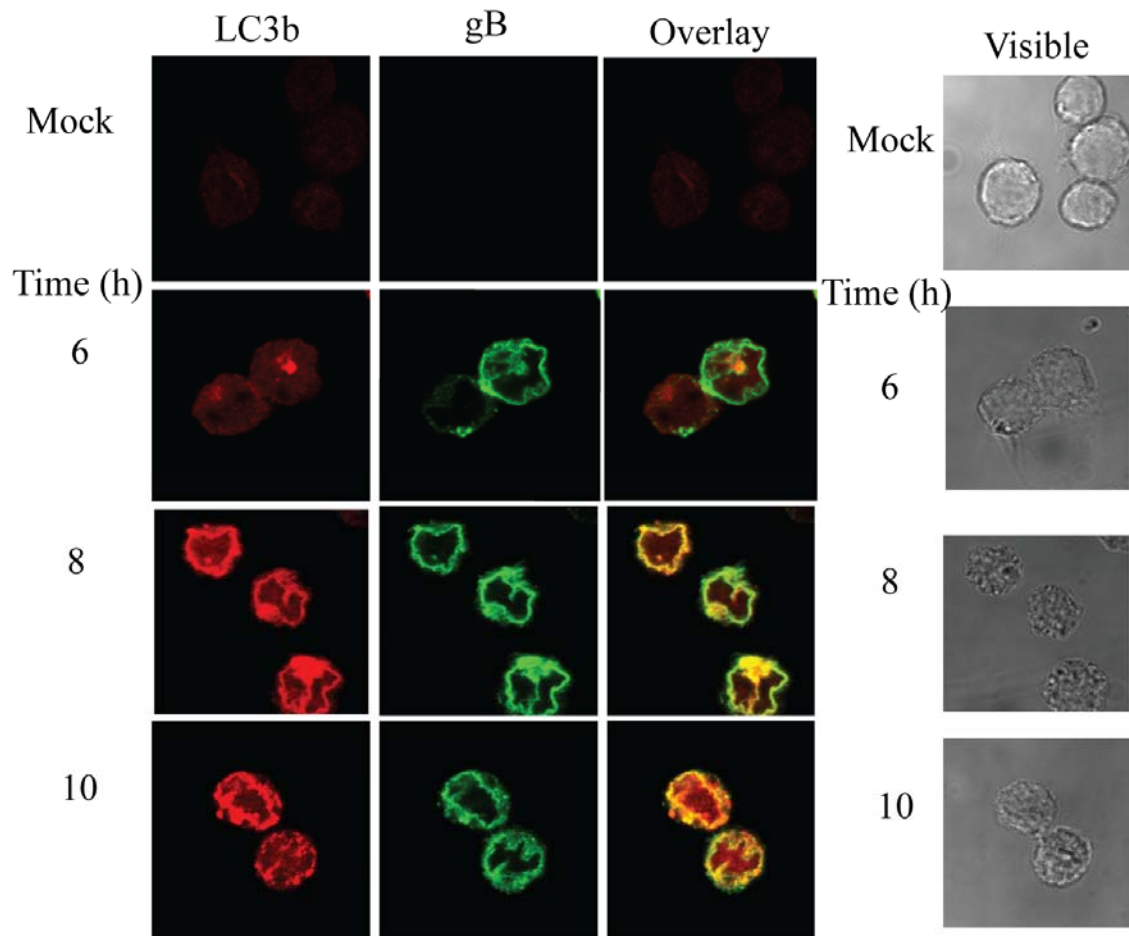


Figure 19 : Immunofluorescence envers les marqueurs LC3b et gB chez les cellules BMA C11 infectées par HSV-1 F WT pour 6, 8, et 10 hpi. Ces images montrent un fort signal du LC3b et de la gB à 8 hpi.

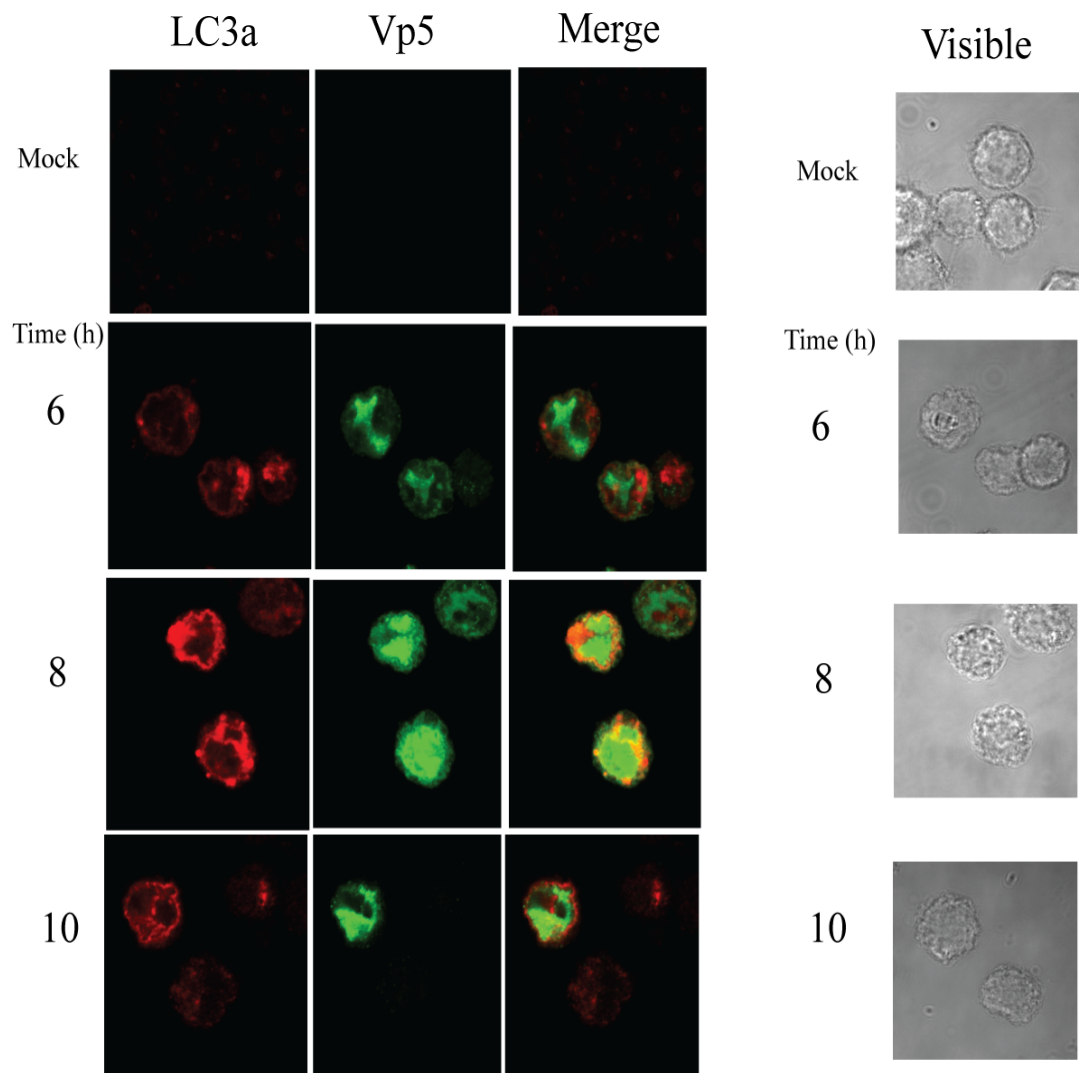


Figure 20 : **Analyse par la microscopie à fluorescence du LC3a et Vp5 dans les cellules macrophages BMA C11 infectées par HSV-1 F WT pour une variété de temps d'infection (6, 8 et 10 hpi).** Ces figures montrent un signal optimal du marqueur spécifique des autophagosomes issus des noyaux, LC3a, à 8 hpi. Une forte expression de l'anticorps anti-VP5 et anti-LC3a a été observée après 8 heures d'infection. Des cellules BMA C11 non infectées (mock) sont visibles comme contrôles. Un très faible signal de LC3a a été visualisé pour les cellules macrophages non infectées.

2. Isolation des noyaux des cellules macrophages

2.1 Comparaison des rendements en noyaux en fonction des différentes méthodes d'isolation appliquées

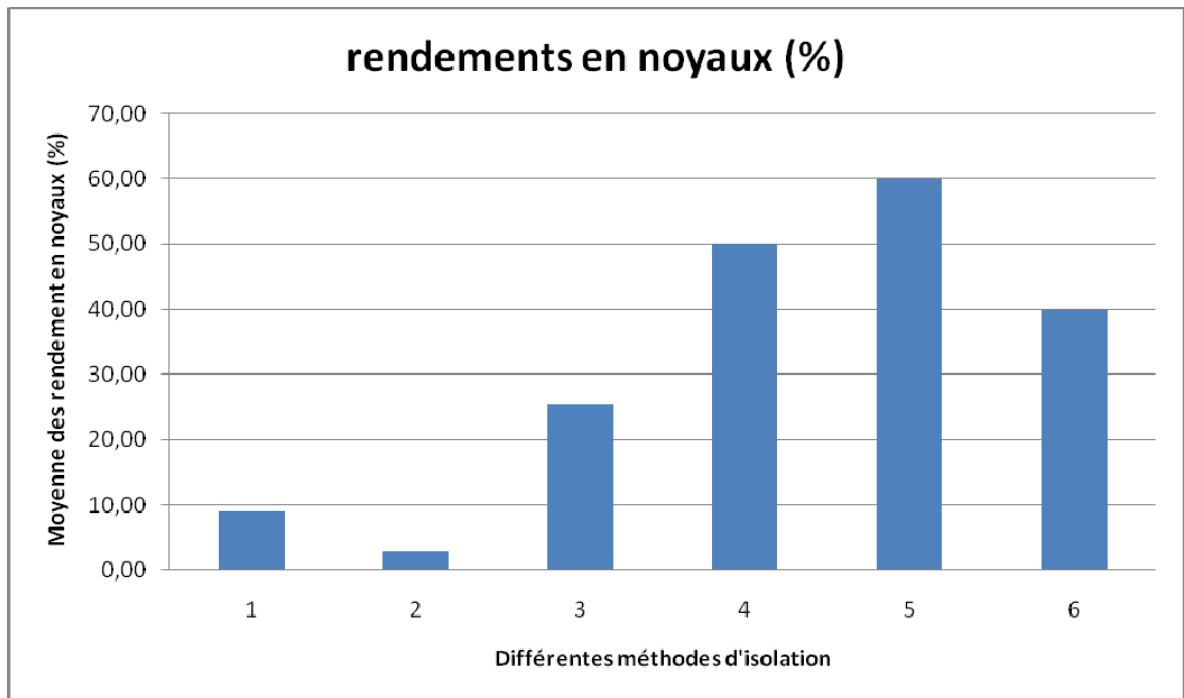
Plusieurs méthodes ont été explorées pour aboutir à l'obtention d'un rendement en noyaux le plus élevé possible tout en préservant la pureté des préparations de noyaux. Dans un premier temps, la méthode d'isolation des noyaux fut adaptée du groupe du laboratoire du Dr Roger Lippé. Cette approche se déroulait en présence d'un milieu hypotonique RSB avec un cassage mécanique par le cell cracker (bille 7.978 mm), et finalement avec une séparation des noyaux d'autres constituants cellulaires sur un gradient discontinu d'optiprep. Cette approche a été réalisée aussi en utilisant un autre milieu d'homogénéisation, HB, et un cassage mécanique à l'aide d'un homogénéisateur Dounce et une aiguille à microémulsion. Dans un second temps, une autre technique a été testée qui consistait à utiliser un tampon de lyse, qui contient un détergent, et la purification des noyaux par un gradient de sucrose. Cette technique a subi des modifications en essayant premièrement d'ajouter une étape de cassage par le cell cracker et par la suite en additionnant une étape de purification supplémentaire par une centrifugation d'un gradient d'optiprep contenant le culot de noyaux obtenu par le gradient de sucrose.

Le rendement en noyaux a été obtenu en comptant par l'hématimètre le nombre de noyaux colorés au bleu de trypan isolés par diverses méthodes par rapport au nombre initial de cellules macrophages utilisées pour l'isolation des noyaux. L'évaluation du rendement en noyaux a démontré qu'un pourcentage élevé (50%) des noyaux a été récolté en employant un tampon de lyse pour briser les cellules et le gradient de sucrose. Également, l'utilisation d'un cell cracker et le tampon de lyse pour casser les cellules et la purification par un gradient de sucrose a permis d'avoir le plus grand pourcentage des noyaux (60%) (Figure 21.A). Aussi la méthode, qui se base aussi bien sur la lyse de cellule avec le cell cracker et le tampon de lyse contenant un détergent et sur un fractionnement cellulaire par un gradient discontinu de sucrose et d'optiprep, constitue une condition favorable pour obtenir un rendement assez important en noyaux (40%) (Figure 21.A). Bien que les techniques mentionnées ci-dessus donnent un haut rendement en noyaux, ces résultats ne sont pas concluants et il a fallu visualiser l'état de pureté des noyaux isolés par chaque méthode.

Le rendement des noyaux obtenus par la lyse des cellules resuspendues dans le milieu HB par l'aiguille à microémulsion ou par Dounce, et purifiés via la centrifugation sur un gradient d'optiprep, était très faible comparativement aux autres techniques essayées (Figure 21.A).

Le rendement en noyaux colorés au bleu de trypan est plus élevé lorsque les cellules ont été homogénéisées avec un cell cracker dans lequel une bille de taille 8.002 mm a été déposée. Il ressort de ces résultats qu'une utilisation d'une bille de taille 8.002 mm est plus efficace (Figure 21.B). Toutefois, il est important d'examiner la pureté des préparations de noyaux isolés par les différentes techniques afin de s'assurer de l'absence des contaminants lors de la séparation des noyaux d'autres organites cellulaires.

A



B

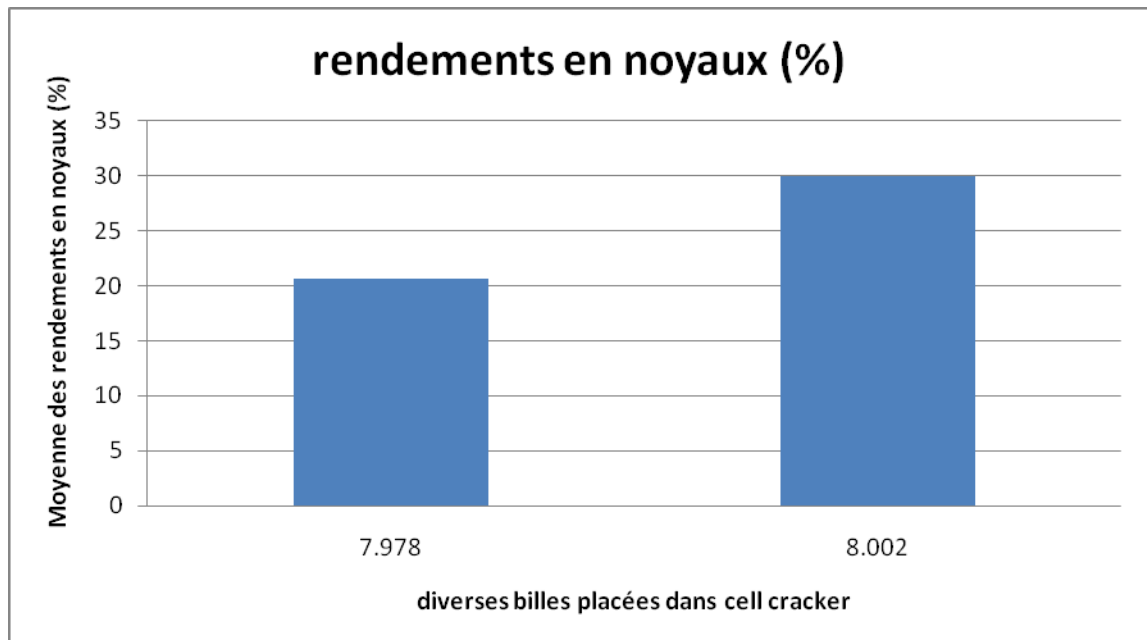


Figure 21 : **Rendements en noyaux des cellules macrophages RAW kb isolés.**

(A) Rendement en noyaux en fonction des différentes méthodes d'isolation des noyaux. 1 : Méthode d'isolation des noyaux utilisant le tampon HB et Dounce effectuée en duplicata. 2 :

Méthode d'isolation des noyaux utilisant le tampon HB et une aiguille à microémulsion, a été réalisée en duplicata. 3 : Méthode d'isolation des noyaux adaptée du groupe du Dr Roger Lippé utilisant le RSB et le cell cracker, réalisée en quadruplicata. 4 : Méthode d'isolation des noyaux utilisant le tampon de lyse et un gradient de sucrose, effectuée en duplicata. 5: Méthode d'isolation des noyaux utilisant le tampon de lyse, cell cracker et gradient de sucrose, réalisée en duplicata. 6 : Méthode d'isolation des noyaux utilisant le tampon de lyse, cell cracker, gradient de sucrose et le gradient d'optiprep, réalisée plusieurs fois. **(B)** Rendements en noyaux en fonction de la taille de la bille utilisée dans le cell cracker pour briser les cellules.

2.2 Étude de la pureté des préparations de noyaux

Le principe d'isolation des organites communément suivi se base sur la lyse cellulaire et la purification par un fractionnement et une centrifugation sur gradient de densité. En premier lieu, on a testé en triplicata l'isolation des noyaux par la lyse des cellules RAW kb non infectées via leur suspension dans un milieu d'homogénéisation HB et l'utilisation de Dounce puis la purification des noyaux a été effectuée par un gradient discontinu d'optiprep. La fraction récoltée à l'interface 29/35% devrait contenir les noyaux selon des études antérieures. On a voulu examiner la pureté des échantillons de noyaux obtenus par cette méthode d'isolation en prenant comme contrôle le lysat cellulaire total (TCL). Les résultats d'immunobuvardage des échantillons de noyaux situés dans la fraction 29/35% ont montré un enrichissement en noyaux (p62) mais malheureusement cette fraction contenait des endosomes et des lysosomes (Lamp-1), des mitochondries (Prohibitin), de la membrane plasmique (Annexine 2), de l'appareil de Golgi (GOSR-1) et du RE (Calnexine) (Figure 22.A). Afin de confirmer ces résultats, on a vérifié l'état de pureté des préparations de noyaux par microscopie électronique en prenant comme contrôle le lysat cellulaire total. En observant la figure 23, on peut remarquer une contamination par les mitochondries et autres structures membranaires. Il est donc clair que cette méthode d'isolation des noyaux n'aboutissait pas à l'obtention des noyaux dépourvus de contaminants. On a tenté d'isoler les noyaux non infectés en lysant les cellules resuspendues dans le milieu HB par l'aiguille à microémulsion et en réalisant un gradient d'optiprep. Cependant, le matériel trouvé à l'interface 29/35% était trop faible pour ne pas être récupéré et analysé.

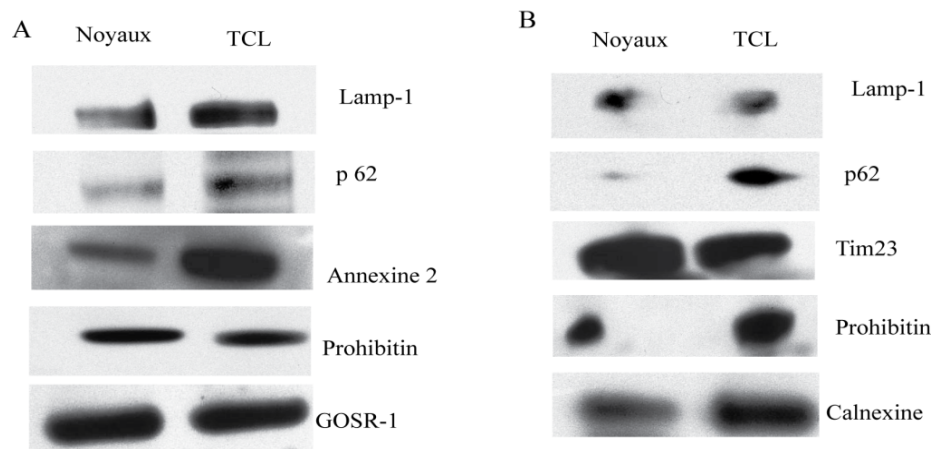


Figure 22 : **Immunobuvardage des noyaux trouvés à la fraction 29/35% d'optiprep.**

Une quantité de 10 μ g de protéines des échantillons de noyau et du TCL a été chargée sur un gel 4-12 % de polyacrylamide et examinée par immunobuvardage contre les différents marqueurs des organites cellulaires. (A) Les noyaux non infectés ont été isolés par la lyse des cellules RAW kb par HB et Dounce et la purification par le gradient de densité d'optiprep. (B) Les noyaux non-infectés ont été obtenus après la lyse des cellules RAW kb non infectées, par le milieu RSB et par l'homogénéisateur Dounce, et un fractionnement cellulaire sur un gradient discontinu d'optiprep. Ces résultats constituent un exemple représentatif de trois expériences indépendantes.

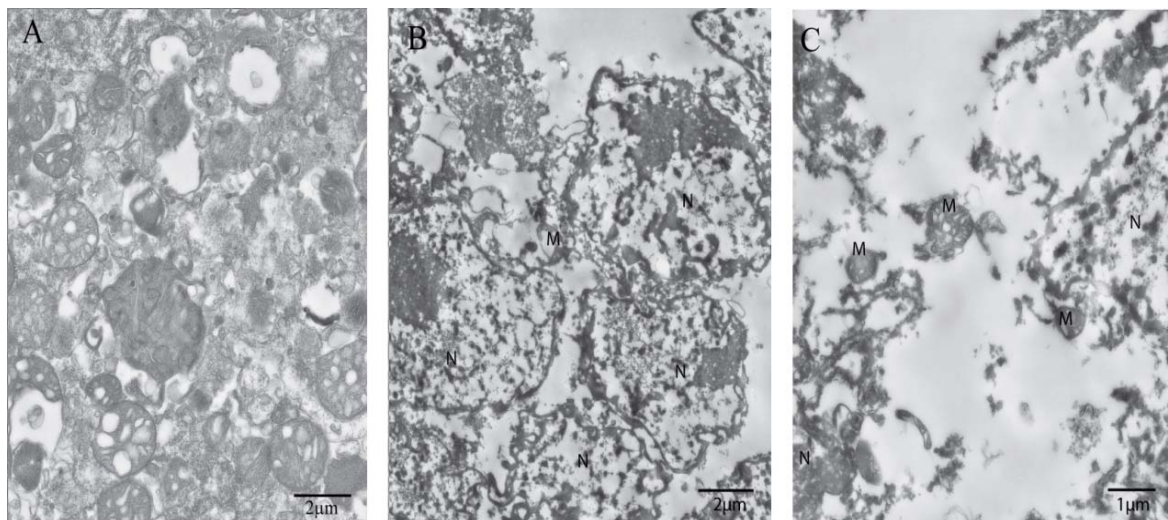


Figure 23 : **Images par la microscopie électronique des noyaux RAW kb isolés par différentes méthodes.**

(A) Lysat cellulaire. (B.C) noyaux non infectés isolés par une lyse avec HB et Dounce et par la purification par centrifugation à basse vitesse et centrifugation sur gradient optiprep. Le grossissement original de ces images est 11,500X (A), 5,200X(B) et 9,200X (C). N : noyau; M : mitochondrie. Ces résultats de microscopie électronique sur les noyaux isolés par cette méthode sont un exemple représentatif de trois expériences indépendantes.

On a aussi essayé une autre méthode d'isolation des noyaux en utilisant une lyse cellulaire en condition hypotonique par le RSB et mécaniquement par Dounce. Il était nécessaire de faire plus de 30 coups avec Dounce pour avoir une grande portion des cellules lysées. Puis, le lysat cellulaire résultant a été mis dans un gradient discontinu d'optiprep. L'analyse d'immunobuvardage de la fraction 29/35% obtenue en comparaison avec le TCL a permis de déduire un enrichissement en lysosomes (Lamp-1) et endosomes, en mitochondries (Tim23 et prohibition), en RE (Calnexine) et un appauvrissement important en noyaux (p62) (Figure 22.B). Ces résultats de l'immunobuvardage ont été confirmés par la microscopie électronique de ces préparations de noyaux obtenus par cette technique en détectant la présence de mitochondries et autres structures adjacentes aux noyaux (Figure 24).

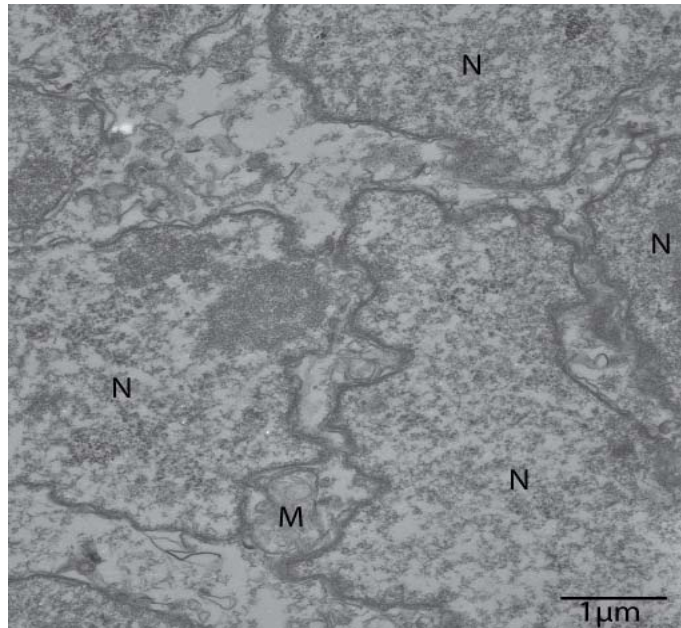


Figure 24 : **Visualisation par la microscopie électronique de la pureté des noyaux isolés.**

Les cellules macrophages RAW kb resuspendues dans un tampon hypotonique RSB ont été cassées par un homogénéisateur Dounce, suivi d'une purification des noyaux par un gradient discontinu d'optiprep. Le matériel récolté à l'interface 29/35% a été fixé à la glutaraldéhyde 2.5% puis a été enrobé par une résine d'épon et visualisé par la microscopie électronique (11,500X). N : noyau; M : mitochondrie. Ce résultat est représentatif d'un des échantillons obtenus par une expérience indépendante réalisée en triplicata.

En outre, on a tenté, à plusieurs reprises, d'adapter la méthode d'isolation des noyaux appliquée par le groupe du Dr Roger Lippé sur les cellules Hela en suspension aux cellules macrophages RAW kb. En effet, les cellules ont été lysées mécaniquement en utilisant un autre outil, le cell cracker, dans lequel une bille de taille 7.978 mm a été déposée. L'homogénat obtenu par le cassage des cellules a subi une centrifugation à basse vitesse sur un coussin d'optiprep 40%, puis le matériel prélevé au-dessus du coussin d'optiprep a été dilué, comme mentionné dans le chapitre précédent, et a été mis dans un gradient d'optiprep. La fraction récoltée à l'interface 29/35% a été évaluée par immunobuvardage et par la microscopie électronique pour vérifier l'état de pureté des préparations de noyaux obtenues. Il ressort des résultats d'immunobuvardage pour les noyaux non infectés l'observation d'un enrichissement en noyaux (Lamine et p62) et l'abondance des

contaminants notamment : les mitochondries (Prohibitin), les endosomes et les lysosomes (Lamp-1) et le RE (Calnexine) (Figure 25.A). De même, on a appliqué cette technique d'isolation des noyaux aux cellules RAW kb infectées par le virus HSV-1. La détection des anticorps spécifiques aux organites cellulaires a mis en évidence la présence des noyaux, une forte contamination par les mitochondries et le RE et une diminution de la contamination par la membrane plasmique par rapport aux techniques notées ci-dessus. Aussi, on a pu déceler la présence d'autophagosomes (APg8b) dans ces préparations de noyaux (Figure 25.B). De plus, la microscopie électronique a prouvé les résultats qui découlaient de l'analyse par l'immunobuvardage en distinguant la présence de mitochondries et des structures qui entouraient les noyaux (Figure 26). Aussi, la microscopie électronique des noyaux infectés isolés par cette méthode a permis d'observer des noyaux intacts et des structures qui émergeaient de l'enveloppe nucléaire et englobaient des particules virales (Figure 26). Malgré l'observation des noyaux et des autophagosomes issus de l'enveloppe nucléaire par l'application de cette méthode, la présence d'un enrichissement considérable en organites contaminantes n'est pas souhaitable dans le cadre d'une étude protéomique de protéines composantes les autophagosomes issus des noyaux. Pour cette raison, on a tâché d'établir une autre méthode d'isolation des noyaux en jouant sur des facteurs clés de la séparation des noyaux des autres organites cellulaires, particulièrement, au niveau de la lyse cellulaire et la purification des noyaux. D'abord, on a tenté de lyser les cellules en utilisant un tampon de lyse contenant un détergent pour différents temps d'incubation (3, 5, 7 et 10 minutes), puis la purification des noyaux a été effectuée par un gradient discontinu de sucrose. Selon des études antérieures, les noyaux devraient culotter dans le tube de gradient de sucrose. L'évaluation de l'enrichissement en noyaux et le degré de pureté des noyaux a montré une absence complète de contamination avec les lysosomes et les endosomes (Lamp-1) et en enrichissement en noyaux (Lamine A/C) pour les différents temps d'incubation. Toutefois, un enrichissement en mitochondrie (Prohibitin) et en membrane plasmique (Annexine 2) a été observé (Figure 27). Quant à la microscopie électronique des noyaux non infectés isolés par cette technique, on n'a pas pu percevoir la présence de mitochondries, mais on a observé plusieurs structures membranaires probablement résultantes de débris de mitochondries endommagées, d'appareil de golgi ou du RE (Figure 28). Donc, on a pu

conclure que cette méthode n'est pas adéquate pour le type cellulaire utilisé dans ce projet en raison de l'existence d'une énorme contamination. Toutefois il aurait été intéressant d'appliquer cette technique sur les cellules HeLa pour la valider.

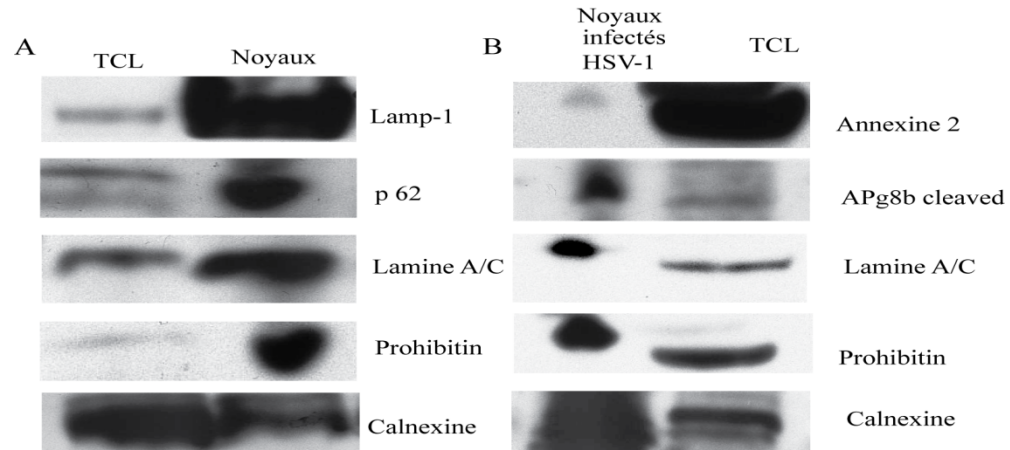


Figure 25 : **Visualisation par immunobuvardage de l'état de pureté des noyaux.**

(A) Les noyaux des cellules RAW kb non infectées récoltés à l'interface 29/35% ont été isolés par la lyse mécanique des cellules resuspendues en RSB avec le cell cracker, par la centrifugation à basse vitesse et par suite par la centrifugation dans un gradient d'optiprep. (B) L'isolation des noyaux infectés par HSV-1 WT a été effectuée par un cassage mécanique en condition hypotonique (RSB) des cellules par le cell cracker et la centrifugation dans un gradient de densité d'optiprep après la dilution du matériel trouvé au-dessus du coussin d'optiprep 40%. Le résultat est représentatif des quatre expériences indépendantes (A) et deux expériences indépendantes (B).

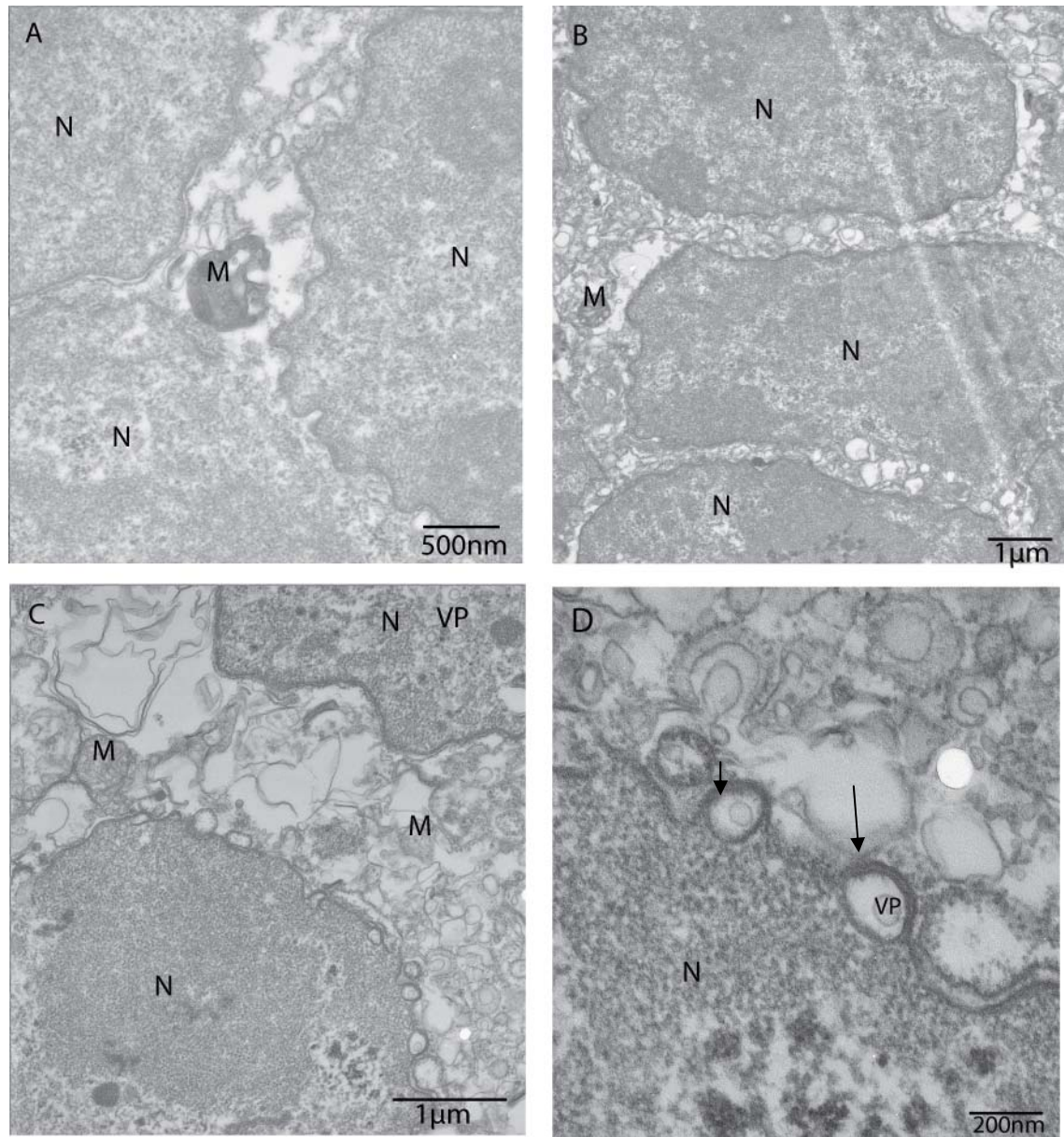


Figure 26 : Images par la microscopie électronique des noyaux isolés de cellules macrophages RAW kb par la méthode d'isolation des noyaux adaptée du groupe du Dr Roger Lippé (Rémillard-Labrosse et al., 2006).

(A.B) Noyaux non infectés visualisées par la microscopie électronique respectivement à 21,000X et 8,900X. (C.D) Noyaux infectés par le virus HSV-1 WT observés par la microscopie électronique à un grossissement de 15,500X pour C et 52,000X pour D. Il est possible d'observer des noyaux non endommagés et beaucoup de contaminants en particulier des mitochondries qui accompagnent les noyaux isolés. La pointe de la flèche indique des structures qui dérivent de l'enveloppe nucléaire

comportant de particule virale. N : noyaux; M : mitochondrie; VP : particule virale. Les résultats obtenus constituent un des quatre résultats représentatifs des expériences indépendantes d'isolation des noyaux (A). L'expérience B a été faite une seule fois.

On a appliqué cette technique avec quelques modifications en améliorant l'efficacité de la lyse de cellule avec la combinaison du cassage mécanique par le cell cracker à la lyse par le détergent et en optimisant la purification des noyaux par l'ajout d'une étape d'ultracentrifugation dans le PBS 1X du culot de noyaux, obtenu par le gradient de sucrose, pour limiter davantage la contamination mitochondriale. On a remarqué, par le microscope optique, que la lyse des cellules par l'incubation dans un tampon de lyse pendant 7 minutes et par le cell cracker a entraîné un très bon cassage des cellules, donnant ainsi une grande proportion des noyaux intacts colorés au bleu de trypan.

L'évaluation de la pureté des préparations de noyaux par l'immunobuvardage a dévoilé une diminution remarquable de la contamination par les mitochondries et une absence de la membrane plasmique (Figure 29). Également, l'analyse par l'immunobuvardage de ces préparations de noyaux a montré un contenu protéique dénué des endosomes et des lysosomes et riche en noyaux (Lamine A/C) comparativement au lysat cellulaire total, ce qui était trouvé par la technique précédente utilisant le tampon de lyse et le gradient de sucrose (Figure 27). On peut donc remarquer une nette amélioration de l'état de pureté des noyaux isolés par cette technique relativement aux autres techniques essayées (Figure 29).

Aussi, on a tenté de faire la technique d'isolation des noyaux pratiquée par le groupe du Dr Roger Lippé en additionnant une étape de centrifugation sur un gradient de sucrose de l'interface 29/35% d'optiprep contenant des noyaux selon les résultats précédents (Figure 25) et une étape finale d'ultracentrifugation dans le PBS 1X. Toutefois, l'étude de la pureté des préparations de noyaux obtenus par cette méthode a révélé encore une forte contamination par les endosomes et les lysosomes et une faible présence de contaminants provenant de mitochondries et de la membrane plasmique (Figure 29). Bien que cette technique semble conduire à un enrichissement en noyaux et à une diminution de la contamination par les mitochondries, beaucoup de contamination par les endosomes et les lysosomes et la persistance de la présence de la membrane plasmique rendent cette technique indésirable.

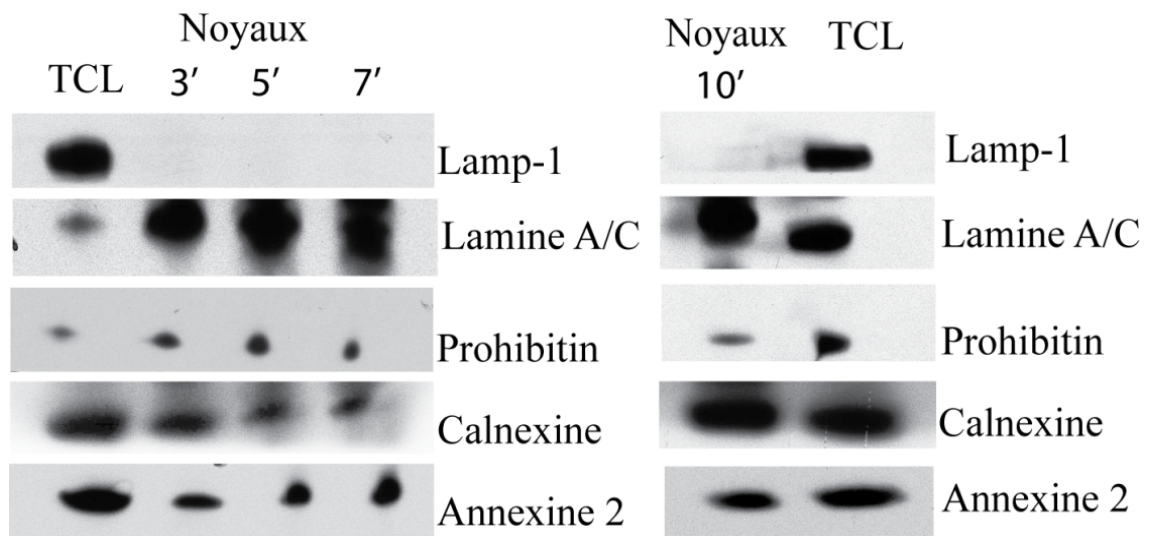


Figure 27 : Immunobuvardages des noyaux obtenus par le cassage des cellules RAW kb avec un tampon de lyse incluant le détergent Triton X-100 0.1% et la purification sur un gradient de sucrose.

7 μ g de protéines de chaque échantillon de noyaux et de TCL a été analysé après l'électrophorèse par immunobuvardage contre différents marqueurs spécifiques aux organites cellulaires. Ce résultat est représentatif de deux expériences indépendantes.

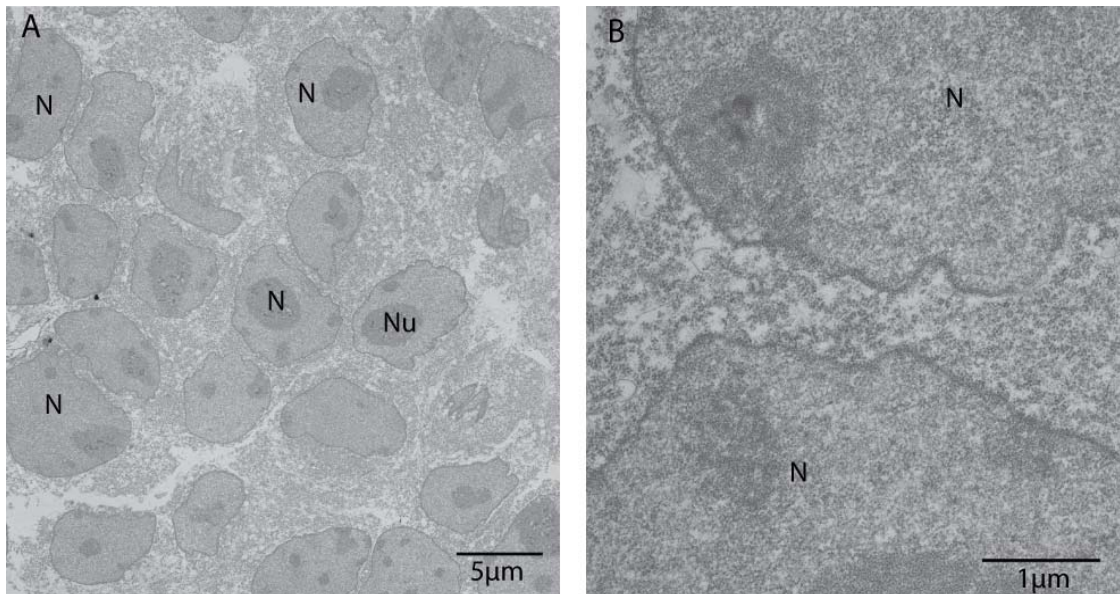


Figure 28 : Analyse par la microscopie électronique des noyaux non infectés isolés par la lyse avec un tampon de lyse et le cell cracker et la purification par la centrifugation sur un gradient de sucrose.

(A,B) Sur ces images, il est possible d'observer que les noyaux ne sont pas endommagés et que plusieurs débris cellulaires accompagnent les noyaux isolés. Les figures ont été prises à un grossissement 2,200X (A) et 15,500X (B). Ces figures de microscopie électronique représentent un résultat représentatif des quatre expériences indépendantes. N : noyau; Nu : nucléole.

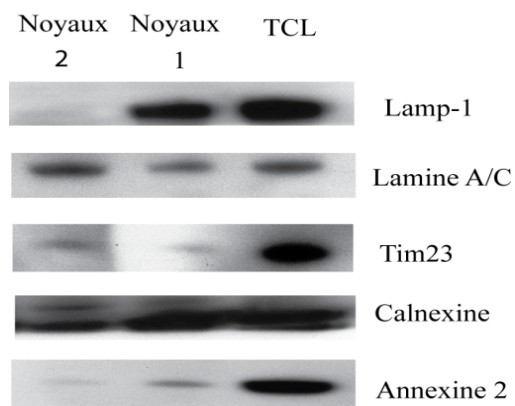


Figure 29 : Visualisation par immunobuvardage des noyaux isolés.

Noyaux 1 : l'isolation des noyaux des cellules RAW kb a été faite selon le protocole adapté du groupe du Dr Roger Lippé avec une étape additionnelle de centrifugation dans un gradient de

sucrose et une ultracentrifugation dans le PBS 1X du matériel culotté au fond du tube du gradient de sucrose. Noyaux 2 : Noyaux des cellules RAW kb ont été isolés par la lyse cellulaire par le biais d'un tampon de lyse avec détergent et le cell cracker et par la purification dans un gradient de sucrose et une ultracentrifugation dans le PBS 1X du culot résultant du gradient de sucrose. 7 µg de protéines des échantillons de noyaux et du TCL ont été chargés sur un gel de polyacrylamide 4-12 % et analysés par immunobuvardage contre des anticorps propres à l'endosomes et lysosomes (Lamp-1), noyaux (Lamine A/C), mitochondries (Tim23), RE (Calnexine) et la membrane plasmique (Annexine 2). Ce résultat est représentatif d'une expérience d'isolation des noyaux indépendante effectuée en duplicata.

On a voulu maximiser la technique d'isolation des noyaux qui emploie le cassage des cellules, par le biais d'un détergent et par cavitation avec le cell cracker, et la purification par un gradient de densité discontinu de sucrose et par une ultracentrifugation dans le PBS 1X. Pour ce faire, le culot de noyaux de cellules RAW kb non infectées obtenu par le gradient de sucrose a été purifié par un autre gradient d'optiprep. On a remarqué par la réalisation de cette opération en quadruplicata qu'aucun matériel n'était présent à l'interface 30/35 % d'optiprep comme c'était supposé et qu'il existait un culot. Ce dernier a été resuspendu dans le PBS 1X et ultracentrifugé. L'analyse du contenu de ce culot a été faite par l'immunobuvardage. Les résultats d'immunobuvardage ont démontré une absence complète de contamination par les endosomes et les lysosomes, des mitochondries et des membranes plasmiques et une faible intensité de la bande de Calnexine vis-à-vis du TCL (Figure 30). Aussi, un enrichissement en noyaux en regard du TCL a été noté (Figure 30). On peut en déduire que le culot obtenu par cette méthode d'isolation des noyaux contenait tel que désiré un enrichissement en noyaux et un excellent degré de pureté marqué par l'absence de contamination (les mitochondries, endosomes et lysosomes et membrane plasmique) et un appauvrissement en RE. Par conséquent, on a pu mettre en marche un protocole d'isolation des noyaux approprié aux cellules macrophages RAW kb. Cette méthode a été envisagée pour l'isolation des noyaux.

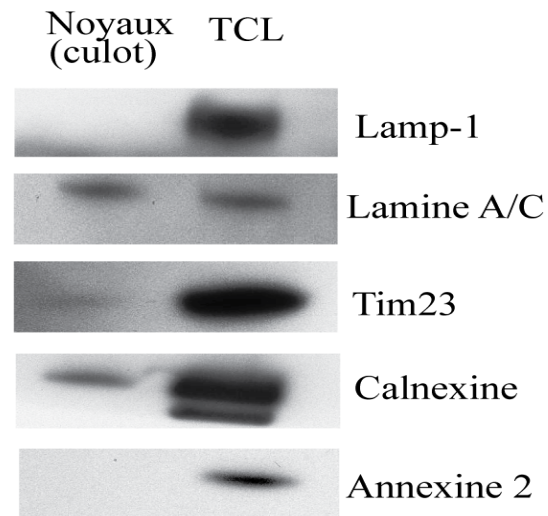


Figure 30 : **Analyse par immunobuvardage du matériel obtenu dans le culot.**

Les noyaux ont été isolés par l'utilisation d'un tampon de lyse et le cell cracker pour briser les cellules et d'un gradient de sucrose et d'optiprep pour la purification des noyaux. 5 μ g de l'échantillon et du TCL ayant subi une électrophorèse ont été testés par immunobuvardage contre les anticorps anti Lamp-1, Lamine A/C, Tim23, Calnexine et Annexine 2. Ce résultat présente un exemple représentatif des résultats d'immunobuvardage des expériences d'isolation des noyaux indépendantes faites quatre fois.

Étant donné que cette technique d'isolation des noyaux fonctionnait très bien, on a voulu la valider pour les noyaux de la lignée cellulaire BMA, puisque ces cellules montraient précédemment un très grand intérêt en termes de taux d'infection par HSV-1 et de formation des autophagosomes issus du noyau. L'isolation des noyaux des cellules BMA C11 par ce protocole en utilisant un nombre croissant de cellules au départ de l'expérimentation (1×10^7 , 2×10^7 et 3×10^7 cellules) a montré la présence d'un matériel culotté dans le gradient d'optiprep et d'une faible quantité de matériel dans la fraction d'optiprep 30/35%. Cependant, concernant l'isolation des noyaux des cellules RAW kb, aucun matériel n'a été observé à l'interface 30/35% d'optiprep. Les analyses d'immunobuvardage ont confirmé les résultats précédents obtenus pour les cellules RAW kb en notant dans le culot pour les différentes quantités de cellules initiales utilisées un enrichissement en noyaux (p62), une absence totale de contamination par les mitochondries, les endosomes et les lysosomes et la membrane plasmique et un désenrichissement en RE (Figure 31). En

outre, on a pu remarquer que plus le nombre initial des cellules était élevé, plus il y avait un enrichissement en noyau sans affecter négativement le degré de pureté des préparations de noyaux (Figure 31). Pour l'interface 30/35% d'optiprep, le contenu était dénudé de noyaux, pourtant, la quantité des cellules initiales était de plus en plus élevée (Figure 31). Aussi, on a constaté que le matériel trouvé à l'interface 30/35% était pauvre en contaminants en fonction du nombre initial de cellules (Figure 31), mais cela a été accompagné par une absence de noyaux, ce qui n'était pas l'objectif visé. Pour s'assurer que le matériel récolté au culot contenait principalement des noyaux et était dépourvu au maximum de contaminants cellulaires, on a réalisé des tests de microscopie électronique sur des préparations de noyaux isolés en duplicata par cette technique. Il est possible d'observer, dans la figure 32, que le matériel trouvé au fond du gradient d'optiprep contenait des noyaux intègres et était désenrichi en contamination, notamment par les mitochondries. Par conséquent, on peut inférer que le culot obtenu après la centrifugation du gradient d'optiprep présente l'échantillon typique de noyaux non infectés isolés tout en préservant un idéal degré de pureté des préparations de noyaux .

Aussi pour optimiser les résultats ultérieurs à obtenir pour l'étude protéomique des protéines impliqués dans la formation des autophagosomes par spectrométrie de masse des préparations de noyaux, on a pensé d'éliminer davantage des contaminants nucléaires provenant de noyaux non infectés et infectés en incubant les noyaux isolés dans un Tampon TP (10mM Tris-HCl pH7.4, 10mM Na_2HPO_4 et un cocktail d'inhibiteur de protéase) contenant 250 $\mu\text{g/ml}$ d'héparine, 1 mM de Na_3VO_4 , 10 mM de NaF et 400 unités de benzonase nucléase. Les résultats d'immunobuvardage ont confirmé les analyses précédentes en ce qui concerne l'enrichissement en noyau et le bon degré de la pureté des noyaux trouvé dans le culot du gradient d'optiprep (Figure 33). Par contre, pour les culots de noyaux non infectés et traités avec le tampon TP, on a remarqué une importante baisse d'enrichissement en noyaux (PCNA) (Figure 33). Cela était dans nos attentes, mais il existe un grand risque de perdre une grande quantité des noyaux et d'endommager la membrane nucléaire et ainsi perdre les autophagosomes dérivés de l'enveloppe nucléaire.

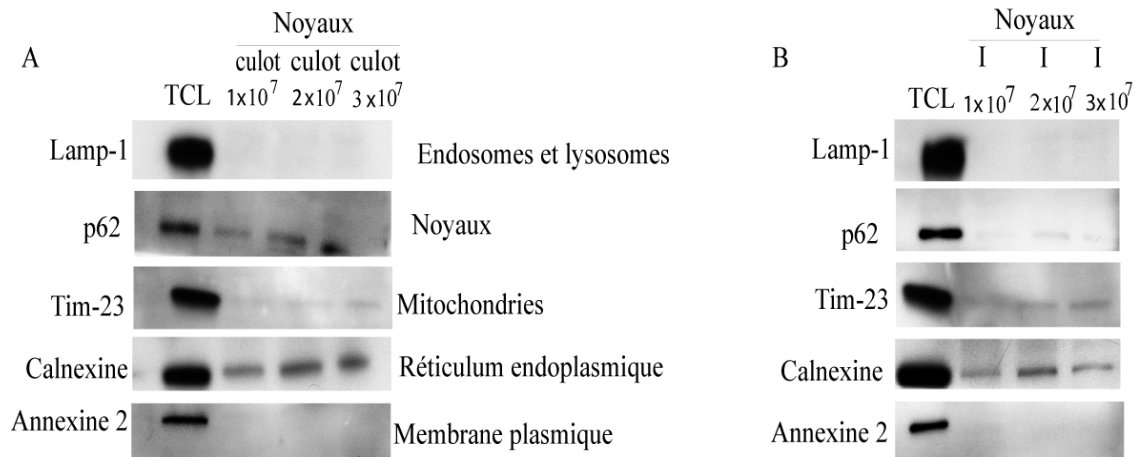


Figure 31 : **Analyse par immunobuvardage du culot et de la fraction à l'interface 30/35% des préparations de noyaux isolés à partir de différentes quantités initiales de cellules BMA C11 non infectées.**

A. Culot 1x10⁷, culot 2x10⁷ et culot 3x10⁷ : Noyaux récoltés dans le culot trouvé dans le gradient d'optiprep respectivement à partir de l'isolation de noyaux de diverses quantités de cellules BMA C11 1x10⁷, 2x10⁷ et 3x10⁷. **B.** I 1x10⁷, I 2x10⁷ et I 3x10⁷ : Préparations de noyaux prélevées à l'interface 30/35% d'optiprep respectivement lors de l'isolation des noyaux non infectés à partir d'un nombre de cellule 1x10⁷, 2x10⁷ et 3x10⁷. 5 µg de protéines de chaque échantillon de noyaux et de TCL ont été analysés par le western blot contre des marqueurs spécifiques des organites cellulaires. Cette expérience a été réalisée une seule fois.

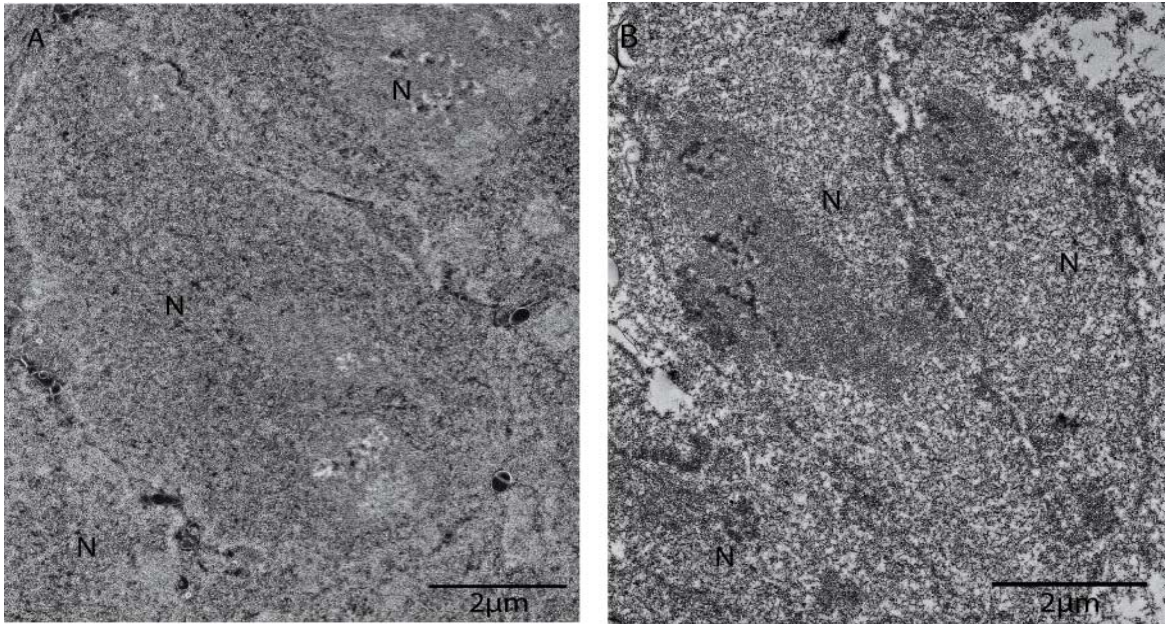


Figure 32 : **Microscopie électronique des noyaux des cellules BMA C11 isolés.**

(A,B) Les noyaux ont été isolés par le biais d'un cassage des cellules par un tampon de lyse et le cell cracker, où une bille de taille 8.002 a été mise. La purification des noyaux a été effectuée par la centrifugation d'un gradient discontinu de sucrose et d'optiprep. Le culot obtenu par le gradient d'optiprep a été resuspendu dans PBS 1X et ultracentrifugé. Il paraissait que les noyaux étaient intacts et qu'aucune structure mitochondriale n'a été présente. N : noyaux. Les images ont été prises à un grossissement 6,610X (A,B). Ces images correspondent à un résultat représentatif de deux expériences réalisées de manière indépendante.

Pour vérifier et valider si la technique d'isolation des noyaux non infectés testée (Figure 16) fonctionne très bien en cas de l'isolation des noyaux infectés par HSV-1, on a réalisé des immunobuvardages du culot obtenu du gradient d'optiprep non traité et traité avec le tampon TP. Cependant, l'isolation des noyaux infectés a révélé la présence d'une quantité considérable de matériel à l'interface 30/35% d'optiprep. Pareillement, on a réalisé l'immunobuvardage de ce matériel (traité et non traité avec le tampon TP) pour s'assurer que les noyaux sont présents essentiellement au niveau du culot du gradient d'optiprep tel qu'observait lors de l'isolation des noyaux non infectés. La figure 34 d'immunobuvardage a confirmé les résultats trouvés par les analyses d'immunobuvardage des noyaux non infectés présentés par les figures 31 et 33. Les culots des préparations de noyaux non

infectés et infectés par HSV-1 (incubés et non incubés avec TP) ont été enrichis en noyaux (PCNA) et dépourvus de contamination par les endosomes, les lysosomes et la membrane plasmique.

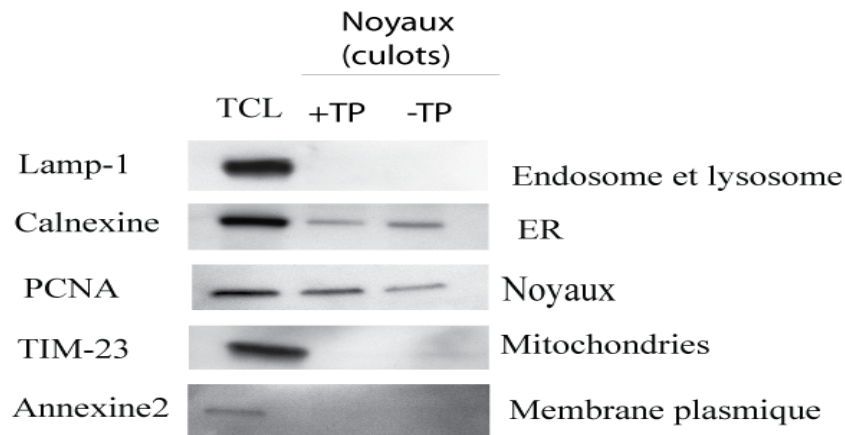


Figure 33 : **Analyse par western blot des préparations de noyaux isolés non infectés présents dans le culot et traités avec le tampon TP.**

5 µg de chaque échantillon et du TCL ont été chargés sur un gel de polyacrylamide 4-12 % et analysés par immunobuvardage contre les protéines Lamp-1, Calnexine, Tim23, PCNA et Annexine 2. Ce résultat présente un exemple de trois expériences indépendantes.

Il est intéressant de remarquer pour les culots des noyaux infectés qu'il en reste une minime contamination avec les mitochondries (Tim23) et une absence totale des lysosomes et des endosomes. Aussi, il existait un enrichissement de la LC3 (I et II) spécifique aux autophagosomes et en protéines virales (VP5 et gB) (Figure 34). Ces résultats sont en concordance avec ceux de la microscopie électronique qui permettent d'observer la présence de structures qui accompagnent les noyaux infectés isolés (Figure 35). D'ailleurs, on a observé au microscope photonique pour les cellules infectées brisées la présence de beaucoup de structures qui peuvent être d'origine cellulaire ou virale en comparaison avec les cellules non infectés brisées. De plus, pour les noyaux BMA C11 infectés isolés par cette méthode, la microscopie électronique a mis en évidence la présence des structures membranaires qui entourent les noyaux et la présence, à fort grossissement, d'une structure à quatre membranes qui correspond à la morphologie typique des autophagosomes issus du

noyau (Figure 35). D'autre part, on a pu détecter le processus d'enroulement de l'enveloppe nucléaire aboutissant à la formation des autophagosomes émergés du noyau (Figure 35). Il nous était difficile d'avoir une préparation de noyaux infectés par HSV-1 sans le moindre contaminant.

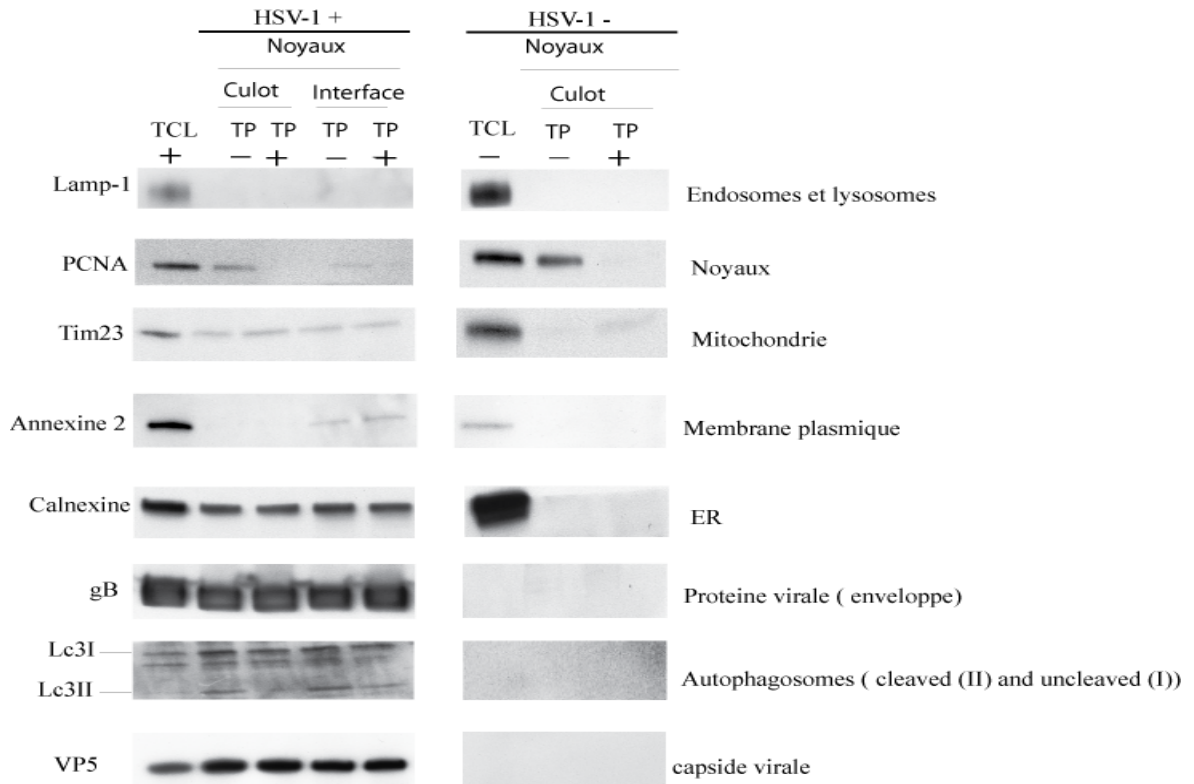


Figure 34 : **Analyse par immunobuvardage des préparations de noyaux infectés par HSV-1 et non infectés.**

Les noyaux non infectés et infectés ont été isolés en utilisant deux modes de cassage de cellules (tampon de lyse et cell cracker) et deux matrices différentes de gradient. Pour l'isolation des noyaux infectés, une quantité de 5 µg du matériel récupéré à l'interface 30/35% d'optiprep traité et non traité par la solution TP, de culot obtenu par le gradient d'optiprep et ultracentrifugé dans le PBS 1X et du TCL infecté ont été examinés par l'immunobuvardage contre Lamp-1, PCNA, Tim23, Annexine 2, Calnexine, des protéines virales (gB et VP5) et LC3 (I et II). Concernant la préparation des noyaux non infectés, le culot obtenu du gradient d'optiprep puis ultracentrifugé dans le PBS 1X et le TCL non infecté ont migré à raison de 5 µg de protéines dans un gel de polyacrylamide 4-12 % puis ont été analysés par immunobuvardage. Ce résultat est représentatif de deux expériences indépendantes.

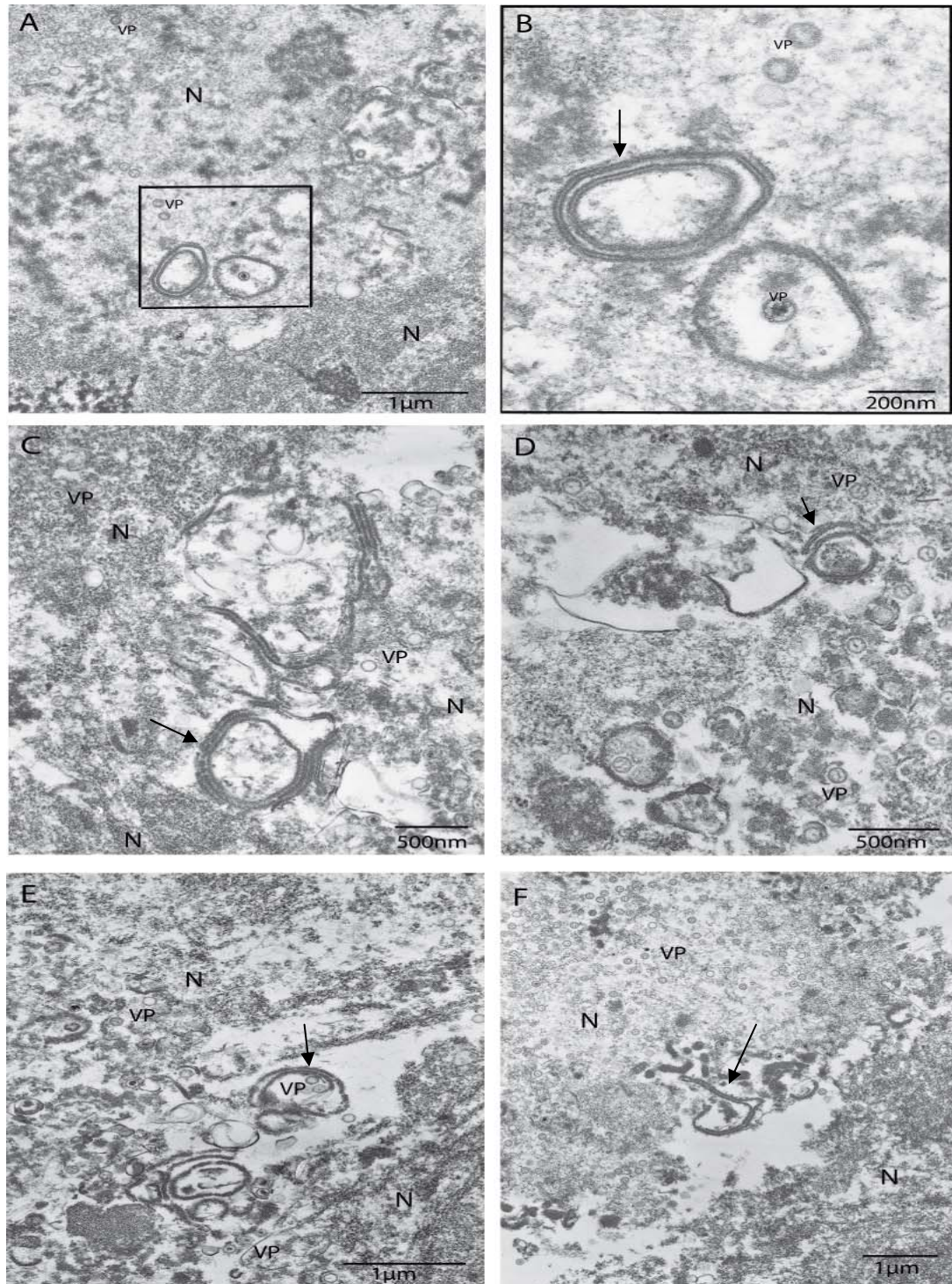


Figure 35 : Observation par la microscopie électronique des autophagosomes issus des noyaux BMA C11 infectés par HSV-1 WT isolés à partir des cellules macrophages infectés pour 8 hpi.

Les noyaux ont été isolés par la méthode utilisant le tampon de lyse et le cell cracker pour le cassage et la séparation des noyaux d'autres organites cellulaires par le gradient discontinu de sucrose et d'optiprep. **(A.B)** Une structure à quatre membranes, qui émerge de l'enveloppe nucléaire, a été localisée dans les préparations de noyaux isolés. **(C.D.E.F)**. L'induction du mécanisme d'enroulement de l'enveloppe nucléaire par l'infection des macrophages par HSV-1 a été détectée dans les noyaux infectés isolés. Il est possible d'observer des structures membranaires avoisinantes des noyaux isolés. Le grossissement des images est 15,500X (A), 39,000X (B), 21,000X (C), 28,500X (D), 15,500X (E) et 11,500X (F). N : noyau; VP : particule virale. Les pointes de flèches indiquent des structures membranaires formées par l'enroulement de l'enveloppe nucléaire. Ces figures sont représentatives de deux expériences indépendantes d'isolation des noyaux infectés.

Discussion

L'autophagie est un processus biologique fondamental par lequel une portion du cytoplasme et des organites endommagés sont internalisés dans l'autophagosome pour être dégradés par les hydrolases lysosomales après la fusion de l'autophagosome et du lysosome. De point de vue évolutif, ce processus a été conservé de la levure à l'homme.

Tel qu'évoqué précédemment, l'autophagie est impliquée dans la réponse immunitaire innée et adaptative en luttant contre les pathogènes envahisseurs, notamment les bactéries et les virus. Bien que l'autophagie joue un rôle prépondérant dans la défense immunitaire, la fonction de l'autophagie a englobé d'autres fonctions. En effet, l'autophagie joue un rôle critique dans l'enclenchement de la mort cellulaire. Cette dernière est caractérisée par une abondance des vacuoles autophagiques dans le cytoplasme (Knecht et al., 2009). L'observation de la mort cellulaire autophagique a été documentée par des études récentes qui utilisent des fibroblastes génétiquement modifiés. En plus, un dérèglement du fonctionnement de l'autophagie est associé à plusieurs maladies, notamment les pathologies neurodégénératives, le cancer et les maladies infectieuses (Hara et al., 2006; Degenhardt et al., 2006; Komatsu et al., 2006). La détermination de la machinerie moléculaire de l'autophagie a essentiellement contribué à définir les diverses fonctions de l'autophagie, en particulier l'élimination des agents pathogènes.

Récemment, des travaux faits dans notre laboratoire ont permis de découvrir un nouvel aspect morphologique de l'autophagie lors d'une infection des cellules macrophages par le HSV-1. Une nouvelle structure autophagique à quatre membranes dérivées de l'enveloppe nucléaire a été détectée durant la phase tardive de l'infection. Cette structure possède une nature autophagique puisqu'on y détecte le marqueur de l'autophagosome LC3. Également, cette nouvelle structure peut, éventuellement, participer à atténuer l'infection virale, vu qu'elle n'a pas été décelée chez les cellules non infectées par HSV-1 et les cellules traitées à la rapamycine, et elle participe ainsi à l'apprêtement autophagique des particules virales endogènes (English et al., 2009).

La présente étude porte sur le développement d'une méthode d'isolation des noyaux des macrophages non infectés et infectés par HSV-1. Ce protocole sert un outil nécessaire qui va être utilisé pour l'étude à long terme du protéome des autophagosomes issus du noyau,

par la spectrométrie de masse, pour mieux comprendre la composition des molécules impliquées dans la formation des autophagosomes issus de l'enveloppe nucléaire interne et externe durant une infection par HSV-1.

1. Étude de la cinétique de la formation des autophagosomes issus des noyaux chez les cellules macrophages durant une infection par le virus HSV-1

Il est très important de faire le suivi de l'infection pour différents temps d'infection pour déterminer la cinétique de la formation des autophagosomes dérivés du noyau en évaluant le signal du marqueur autophagique LC3 obtenu par immunofluorescence lors d'infection des cellules RAW kb et BMA C11 par la souche virale HSV-1 F.

L'ensemble de nos résultats, pour l'infection virale des cellules RAW kb et BMA C11, montre un très faible signal pour LC3b dans les macrophages non infectés et une forte colocalisation du marqueur non spécifique LC3b des autophagosomes et de la glycoprotéine virale gB entre 8 hpi et 10 hpi (Figure 17 et 19). Cette colocalisation mène à hypothétiser que ces autophagosomes ont séquestré des protéines virales durant une phase tardive de l'infection. Toutefois, cette accumulation du marqueur LC3b ne précise pas s'il s'agissait des autophagosomes issus de la voie classique de l'autophagie et/ou d'autophagosomes dérivés des noyaux. Pour s'assurer de la présence des autophagosomes issus des noyaux au cours de l'infection par HSV-1 WT, selon des résultats obtenus dans notre laboratoire, on a utilisé un marqueur qui semble spécifique à ces autophagosomes qui sont connectés à l'enveloppe nucléaire, LC3a. Les résultats d'immunofluorescence appliquée sur les cellules BMA C11 ont démontré une intense accumulation du marqueur LC3a autour des noyaux après 8 heures d'infection (Figure 20). Également, pendant cet intervalle, un fort signal de la protéine virale Vp5 a été détecté proche des noyaux, suggérant que cette nouvelle forme des autophagosomes issus des noyaux cible les protéines virales pour entraîner leur dégradation par les hydrolases lysosomales. Après 10 heures d'infection, on a noté une baisse du signal LC3a, ce qui peut être interprété comme une dégradation du marqueur LC3a après la fusion des autophagosomes avec les lysosomes.

Avant la réalisation du protocole d'isolation des noyaux, il était essentiel d'effectuer en parallèle des analyses d'immunofluorescence sur les cellules BMA C11 infectées par HSV-1 WT. Cette étape est vitale pour s'assurer de la formation des autophagosomes issus des noyaux et de leur présence dans les préparations de noyaux afin de déceler la composition protéique par spectrométrie de masse. Nos résultats d'immunofluorescence, d'immunobuvardage et de microscopie électronique sont en concordance et mettent en évidence la formation et la présence des autophagosomes émergés de l'enveloppe nucléaire dans les échantillons de noyaux isolés (Figure 20, 34 et 35).

2. Isolation des noyaux de macrophages

Comme ce fut mentionnée précédemment, les différents protocoles d'isolation ont été principalement élaborés pour isoler les noyaux de cellules de foie. Le principe de ces protocoles consiste en cassage des cellules, soit mécanique ou par détergent, suivi d'une centrifugation sur un gradient de sucrose ou d'optiprep. On a essayé d'appliquer ces techniques pour les noyaux de macrophages. Toutefois, ils n'ont pas permis d'obtenir un rendement élevé et un échantillonnage pur en noyaux. Par conséquent, il était impératif de développer un protocole d'isolation adapté aux macrophages afin de parfaire la purification des noyaux et d'augmenter davantage le rendement en noyaux.

2.1 Rendements en noyaux obtenus par les différentes techniques testées

Les techniques d'isolation des noyaux testées, qui se basent sur le cassage de macrophages par la resuspension dans un milieu hypotonique HB dépourvu de détergent et ensuite l'homogénéisation par Dounce ou une aiguille à microémulsion, et la purification des noyaux par un gradient d'optiprep, ont abouti à un rendement très faible en noyaux. Ce résultat s'explique par une inefficacité d'homogénéisation des cellules qui peut affecter l'étape de purification des noyaux. Quant à la technique d'isolation des noyaux adaptée du groupe du Dr Roger Lippé appliquée sur les cellules Hela, le nombre de noyaux de macrophage récoltés par rapport au nombre des cellules utilisées au départ était acceptable (Figure 21). Cela peut être interprété par le fait que le milieu hypotonique RSB confère un gonflement aux cellules, ce qui facilite leur cassage par le cell cracker en restreignant probablement la rigidité du cytosquelette. Toutefois, en observant les cellules cassées par ce biais, on détecte au microscope photonique beaucoup de matériels cellulaires collés aux

membranes nucléaires. Cette observation confirme les résultats de la microscopie électronique et d'immunobuvardage, dont la présence de plusieurs contaminants dans les préparations de noyaux de macrophages obtenues par cette approche expérimentale (Figure 25 et 26).

Les résultats du rendement en noyaux isolés par plusieurs techniques ont mis en évidence trois modèles d'isolation des noyaux qui génèrent un haut pourcentage de noyaux. L'utilisation d'un tampon de lyse contenant un détergent a permis de visualiser, par la microscopie optique, un nombre considérable de noyaux colorés au bleu de trypan (50%). Ces derniers ont été séparés des autres organites cellulaires en fonction de leur densité par une centrifugation sur un gradient discontinu de sucrose. Cependant, une augmentation très importante du rendement en noyaux, qui ont sédimenté au fond du tube de gradient de sucrose, a été notée lors de l'utilisation d'un cassage des cellules par un tampon de lyse comportant un détergent et par cavitation en utilisant un cell cracker dans le quel une bille de taille 8.002 mm a été placée. Le grand pourcentage en noyaux isolés (60%) obtenu par cette technique peut être expliqué par le fait que le cassage des macrophages par ce moyen était plus efficace. En fait, les cellules ont subi un premier cassage en les exposant à un tampon de lyse hypotonique incluant un détergent Triton X-100 0.1 % puis en brisant davantage les cellules gonflées non cassées en les serrant dans la chambre de cassage du cell cracker. Par conséquent, la lyse des cellules par le biais d'un cassage mécanique par cell cracker et par un tampon de lyse pourvu de détergent est mieux adaptée pour l'isolation des noyaux du type cellulaire employé pour cette présente étude.

De même, un rendement acceptable en noyaux (40%) a été obtenu en explorant une autre technique d'isolation des noyaux. Cette dernière emploie un tampon de lyse pourvu d'un détergent, le cell cracker pour briser les cellules, et deux matrices de gradient discontinu de densité, soit le sucrose et l'optiprep, pour purifier les noyaux. Cette diminution du rendement en noyaux obtenu par ce protocole comparativement aux rendements en noyaux résultant des deux techniques mentionnées ci-dessus peut avoir été causée par la perte des noyaux lors de l'étape supplémentaire de centrifugation (un gradient de densité discontinu d'optiprep). Bien qu'il y ait une possibilité de perdre des noyaux lors de l'utilisation du gradient d'optiprep, plusieurs contaminants cellulaires seraient mieux séparés des noyaux.

2.2 Étude de la pureté des préparations de noyaux isolés de cellules macrophages

Lorsqu'on a effectué les essais d'isolation des noyaux en utilisant un cassage mécanique avec Dounce, des macrophages resuspendus dans le milieu HB ou le milieu RSB dépourvu de détergent et une purification par un gradient d'optiprep, on s'est rendu compte qu'il est difficile de séparer les noyaux des cellules RAW kb récolté à l'interface 29/35% des autres organites cellulaires. En effet, en microscopie électronique, on a détecté plusieurs structures présentes autour des noyaux, essentiellement des mitochondries (Figure 23 et 24).

Ces évidences morphologiques ont été confirmées par l'immunobuvardage contre les marqueurs de différents organites cellulaires contaminants. Ces tests d'immunobuvardage montrent, en plus des noyaux (p62), un enrichissement en contaminants cellulaires dont les endosomes et les lysosomes (Lamp-1), l'appareil de Golgi (GOSR-1), les mitochondries (Prohibitin et Tim 23), la membrane plasmique (Annexine 2) et le RE (Calnexine). La présence du RE peut être expliquée par sa continuité avec la membrane nucléaire externe. Il était aussi possible de trouver des mitochondries et des lysosomes dans les préparations de noyaux prélevées à l'interface 29/35 % d'optiprep, puisque la densité des mitochondries ($1.15-1.20\text{g/cm}^3$) et des lysosomes ($1.10-1.15\text{g/cm}^3$) dans un milieu de faible osmolarité est similaire aux noyaux ($1.21-1.24\text{g/cm}^3$) (Spector et Leinwand, 1998).

On a aussi tenté à plusieurs reprises d'adapter la méthode d'isolation des noyaux appliquée sur les cellules Hela par le groupe du laboratoire du Dr Roger Lippé sur les macrophages RAW kb. Il était clair que le degré de contamination des noyaux non infectés et infectés par HSV-1 par les organites cellulaires était très élevé. Nos résultats d'immunobuvardage démontrent un enrichissement important en lysosomes et endosomes, en mitochondries et en RE. L'immunobuvardage des noyaux infectés par HSV-1 a montré aussi un signal de l'anticorps LC3 contre les autophagosomes. Par conséquent, cette approche semble maintenir les membranes nucléaires intactes, et ainsi préserver les autophagosomes dérivés de l'enveloppe nucléaire. En outre, ces résultats sont en concordance avec les résultats obtenus par la microscopie électronique des préparations de noyaux (Figure 26).

Cependant, cette technique d'isolation des noyaux n'assure pas un faible degré de contamination des noyaux isolés. Il est à noter qu'il est indispensable d'avoir un excellent degré de pureté de noyaux afin de faire une caractérisation protéique des autophagosomes issus des noyaux avec la spectrométrie de masse.

Pour pallier à ces contraintes, il était nécessaire d'établir une autre technique d'isolation. D'abord, on a utilisé un tampon de lyse qui contient un détergent afin de casser les cellules. Après l'incubation des cellules RAW kb à divers intervalles d'exposition, le lysat cellulaire a été mis dans un gradient de sucrose. Le sucrose est une matrice fréquemment utilisée pour le fractionnement des organites cellulaires y compris le noyau (Fleischer et Kervina, 1974; Berezney et Coffey, 1977; Florens et al., 2008). Une amélioration de la pureté des noyaux a été remarquée par l'immunobuvardage et la microscopie électronique. En effet, un enrichissement en noyaux (Lamine A/C) a été observé et aucune trace de lysosomes et d'endosomes (Lamp-1) n'a été détectée dans les préparations (Figure 27). Cela peut être justifié par le fait que la densité des noyaux ($>1.30\text{g/cm}^3$) et la densité des lysosomes ($1.19-1.21\text{g/cm}^3$) et des endosomes ($1.06-1.16\text{g/cm}^3$) sont considérablement différentes dans un milieu caractérisé par une hyperosmolarité comme le sucrose. Toutefois, on a noté un fort degré de contamination par la membrane plasmique et les mitochondries. Le RE demeure encore présent dans les préparations de noyaux vu sa densité ($1.18-1.26\text{g/cm}^3$), qui est très proche de celle des noyaux dans le sucrose, et du fait qu'il est attaché à la membrane nucléaire. Il ressort de ces résultats que cette technique d'isolation des noyaux n'est pas convenable pour les noyaux des macrophages bien que son rendement fût important. Il apparaît que le cassage des cellules seulement par le tampon de lyse contenant le détergent et l'utilisation d'un fractionnement subcellulaire par un gradient de sucrose sont inadaptés pour briser les cellules et séparer les noyaux sans avoir une contamination par les organites. Afin d'améliorer la pureté des préparations de noyaux, on a entrepris de casser les cellules en conditions hypotoniques dans un tampon de lyse comportant un détergent non ionique (Triton X-100) et avec cavitation par le cell cracker contenant la bille de taille 8.002 mm. Cette technique peut engendrer un meilleur cassage des cellules, tout en gardant les noyaux intacts et en les mettant en suspension avec les autres organites. Par la suite, la purification des noyaux est réalisée par une centrifugation en un gradient de sucrose. En observant les résultats obtenus par l'immunobuvardage sur des préparations de noyaux contre les

marqueurs de différents organites, on a remarqué une régression de la contamination par les mitochondries, par la membrane plasmique et par le RE (Figure 29). De plus, ces résultats indiquent un enrichissement en noyaux et une absence totale de contaminants d'origine lysosomale et endosomale. En parallèle, un autre test d'isolation des noyaux consistant à utiliser la méthode adaptée du groupe du Dr Roger Lippée (Rémillard-Labrosse et al., 2006), à laquelle a été ajoutée une étape de centrifugation d'un gradient discontinu de sucrose contenant la fraction de noyaux à l'interface 29/35 % d'optiprep, a été effectué. Bien que cette méthode présente deux étapes de purification, un enrichissement en endosomes et lysosomes dans les préparations de noyaux par rapport au TCL a été repéré par immunobuvardage (Figure 29). D'autre part, une baisse du degré de contamination par les mitochondries, les membranes plasmiques et le RE a été notée. Malgré l'enrichissement en noyaux obtenus par ces diverses méthodes, on était face au défi d'éliminer la persistance remarquable des contaminants. Par conséquent, on a tenté de développer une autre technique d'isolation.

En se basant sur les essais précédents et les résultats attribués à ces tests, on a réalisé qu'une homogénéisation des cellules par un tampon de lyse hypotonique renfermant un détergent, combinée à un cassage mécanique avec le cell cracker, et suivie d'une purification des noyaux par un gradient discontinu de sucrose confère une énorme amélioration de l'isolation des noyaux des macrophages au niveau du rendement (60%) et au niveau d'appauvrissement en contaminants cellulaires.

Toutefois, il a fallu optimiser cette technique pour éliminer au maximum les contaminants. Conséquemment, des étapes de purification supplémentaire à la centrifugation du gradient de sucrose ont été effectuées par une centrifugation d'un gradient de densité d'optiprep et une centrifugation dans le PBS 1X du matériel pour minimiser davantage la contamination mitochondriale. Contrairement à une autre étude qui montre que les noyaux devraient être trouvés au-dessus de la couche 35 % d'optiprep (Graham et al, 1994), les noyaux des cellules RAW kb ont sédimenté au fond du gradient dans plusieurs expériences indépendantes.

Pour vérifier l'enrichissement en noyaux et la pureté du matériel récolté, des tests d'immunobuvardage ont été effectués. En outre, pour s'assurer que le matériel sédimenté

au fond du gradient comporte réellement des noyaux, la microscopie électronique a été faite sur ces préparations de noyaux.

Les résultats d'immunobuvardage et de microscopie électronique des préparations de noyaux de macrophages RAW kb isolés plusieurs fois par ce protocole étaient très convaincants. En effet, aucune bande immunoréactive de Tim23, d'Annexine 2 et de Lamp-1 n'a été révélée par l'immunobuvardage contre ces marqueurs spécifiques des organites contaminantes. D'ailleurs, une diminution notable de la présence du RE et un enrichissement en noyaux ont été dévoilés par l'immunobuvardage (Figure 30). Il s'avère donc qu'il est nécessaire pour atteindre une purification maximale des noyaux d'effectuer deux centrifugations isopycniques sur deux différentes matrices qui séparent les noyaux d'autres organites cellulaires en fonction des différences de densité. Il est clair que notre technique d'isolation des noyaux est appropriée pour le type de cellule RAW kb employé dans la présente étude. Ainsi, on a décidé d'utiliser cette technique d'isolation avec des macrophages.

Selon des études antérieures, le taux d'infectiosité et le signal de formation des autophagosomes induits par l'infection par HSV-1 sont plus élevés chez la lignée cellulaire de macrophage BMA que chez les macrophages RAW kb. C'est pour cette raison qu'on a choisi d'utiliser la lignée BMA C11 pour l'isolation des noyaux afin d'analyser la composition protéique des autophagosomes issus des noyaux isolés. Il était inévitable de tester la technique d'isolation des noyaux adaptée aux macrophages RAW kb, décrite ci-dessus, sur les cellules BMA C11. L'isolation des noyaux de BMA C11 a montré la présence d'une quantité minime de matériel à l'interface 30/35% et d'une très grande quantité de matériel qui a sédimenté au fond du gradient d'optiprep. On a tenté d'analyser par immunobuvardage la composition du matériel récolté à l'interface de deux couches d'optiprep. Les analyses d'immunobuvardage contre les marqueurs spécifiques de noyau et des organites cellulaires ont témoigné de la présence d'une bande imperceptible du marqueur des noyaux (p62) comparativement à la bande de p62 détectée dans le lysat cellulaire (TCL), ainsi que la présence d'une contamination par les mitochondries et le RE (Figure 31). Toutefois, aucune contamination par la membrane plasmique, les endosomes et les lysosomes n'était présente. Il est, donc, clair que l'interface 30/35% est pleinement exemptée des noyaux et contenait plutôt des mitochondries.

L'essai du protocole d'isolation des noyaux validé pour les cellules RAW kb et BMA C11 a soutenu l'efficacité de cette méthode d'isolation des noyaux pour les cellules BMA C11 non infectées et infectées par HSV-1. Les immunobuvardages du matériel non infecté récolté au fond du tube de gradient d'optiprep montrent un enrichissement considérable en noyaux (PCNA) et une absence complète d'une contamination par les mitochondries, les lysosomes, les endosomes et la membrane plasmique (Figure 33 et 34). Néanmoins, une faible quantité protéique du RE par rapport au TCL a été trouvée dans ces préparations. Il faut prendre en considération qu'il est presque impossible d'avoir un degré de pureté des noyaux de 100 % pour des raisons physiques et biologiques. Le RE est en continuité avec la membrane nucléaire et l'élimination absolue d'une contamination par RE va risquer la perte de l'intégrité des noyaux. La figure 32 démontre également l'absence de structures contaminantes telles que les mitochondries. Toutefois, en microscopie électronique, on a retrouvé des débris qui entourent les noyaux, ce qui peut être probablement de l'ADN des noyaux brisés. Concernant l'isolation des noyaux infectés, on a constaté un enrichissement en noyaux et une absence entière des contaminants provenant de la membrane plasmique, des lysosomes et des endosomes. Cependant, il reste une très faible contamination par les mitochondries et le RE. Cette faible contamination peut être détectée par des techniques quantitatives protéomiques qui permettent la distinction entre les contaminants et les protéines propres de l'organelle en question et qui aident à l'évaluation de la localisation cellulaire des protéines identifiées (Foster et al., 2003; Marelli et al., 2004; Dunkley et al., 2006). Les résultats d'immunobuvardage ont été confirmés par la microscopie électronique. Il est possible que cette contamination provenant essentiellement des membranes du RE et des mitochondries, puisqu'on n'a pas détecté la présence de mitochondries entières en microscopie électronique. Cette contamination peut être expliquée par le fait que l'infection par le virus peut affecter la structure des noyaux en les rendant plus fragiles et sensibles (Schwartz et Roizman, 1969).

Il est très intéressant de signaler que l'infection des cellules BMA C11 par HSV-1 a provoqué une formation des autophagosomes dérivés du noyau visualisés par les tests d'immunofluorescence (Figure 20). Cet événement a été démontré par la détection du marqueur des autophagosomes dans les préparations de noyaux par immunobuvardage (Figure 34). En outre, cette évidence a été accentuée par les résultats de microscopie

électronique qui montrent des structures à plusieurs membranes qui émergeaient de l'enveloppe nucléaire selon un processus d'enroulement de l'enveloppe nucléaire. Ces structures deviendraient par la suite des autophagosomes issus du noyau à quatre membranes (Figure 35). De toute évidence, notre méthode d'isolation des noyaux a contribué à obtenir, principalement, dans le matériel récupéré au fond du tube de gradient d'optiprep, un enrichissement en noyaux infectés et non infectés, un maintien de l'intégrité de l'enveloppe nucléaire et ainsi que la présence des autophagosomes issus de l'enveloppe nucléaire. Par conséquent, des échantillons de noyaux isolés par cette méthode seront utilisables pour l'étude protéomique des protéines impliquées dans la formation des autophagosomes issus des noyaux. Dans une perspective future, il sera intéressant d'établir un outil d'isolation des membranes nucléaires adapté aux cellules BMA C11 afin d'avoir une caractérisation plus spécifique de la constitution protéique des autophagosomes issus du noyau.

Conclusion

Durant une infection par HSV-1, la découverte d'une nouvelle forme de l'autophagie caractérisée par la formation des autophagosomes à quatre membranes issus de l'enveloppe nucléaire pousse au questionnement et à l'interrogation concernant la machinerie moléculaire responsable de leur formation. Dans le but d'identifier les protéines impliquées dans ce mécanisme par une approche protéomique, il était nécessaire de développer un outil d'isolation des noyaux de macrophages. L'objectif principal de cette étude était d'établir un protocole d'isolation des noyaux de macrophages infectés et non infectés par HSV-1 tout en préservant l'intégrité de la membrane nucléaire et la pureté des préparations de noyaux.

Les résultats présentés dans cette recherche suggèrent notre réussite à établir un nouveau protocole d'isolation des noyaux adapté aux macrophages qui assure à la fois un enrichissement en noyaux non endommagés et un degré négligeable de contamination par les organites cellulaires. Notre méthode sera un outil indispensable pour des études futures nécessitant des échantillons de noyaux.

Quoique ce protocole forme une base solide pour la caractérisation des protéines impliquées dans l'induction et la formation des autophagosomes dérivés des noyaux par spectrométrie de masse, il est important de développer un outil d'isolation des membranes nucléaires à partir des échantillons de noyaux isolés afin de déterminer, d'une façon très spécifique et concluante, l'identité protéique des autophagosomes. La détermination de ces protéines impliquées dans ce type de l'autophagie mènera à une meilleure compréhension de cette nouvelle voie de l'autophagie et possiblement au développement de thérapies nouvelles contre les souches virales résistantes aux médicaments.

Bibliographie

- Agarraberes, F. A., et Dice, J. F.** (2001). A molecular chaperone complex at the lysosomal membrane is required for protein translocation. *J. Cell. Sci.* 114: 2491- 2499.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., et Watson, J. D.** (1989). How cells are studied. *Molecular biology of the cell* (Second edition). Chap 4:135-198.
- Alexander, D. E., et Leib, D. A.** (2008). Xenophagy in herpes simplex virus replication and pathogenesis. *Autophagy.* 4(1): 101-103.
- Andersen, J. S., Lyon, C. E., Fox, A. H., Leung, A. K., Lam, Y. W., Steen, H., Mann, M., et Lamond, A. I.** (2002). Directed proteomic analysis of the human nucleolus. *Curr. Biol.* 12 (1): 1-11.
- Andrade, R. M., Wessendarp, M., Gubbels, M. J., Striepen, B., et Subauste, C. S.** (2006). CD40 induces macrophage anti-Toxoplasma gondii activity by triggering autophagy-dependent fusion of pathogen-containing vacuoles and lysosomes. *J. Clin. Investig.* 116(9): 2366-2377.
- Arico, S., Petiot, A., Bauvy, C., Dubbelhuis, P. F., Meijer, A. J., Codogno, P., et Ogier-Denis, E.** (2001). The tumor suppressor PTEN positively regulates macroautophagy by inhibiting the phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B pathway. *J. Biol. Chem.* 276 (38): 35243- 35246.
- Axe, E. L., Walker, S. A., Manifava, M., Chandra, P., Roderick, H. L., Habermann, A., Griffiths, G., et ktistakis, N. T.** (2008). Autophagosome formation from membrane compartments enriched in phosphatidylinositol 3-phosphate and dynamically connected to the endoplasmic reticulum. *J. Cell. Biol.* 182(4): 685-701.
- Baba, M., Takeshige, K., Baba, N., et Ohsumi, Y.** (1994). Ultrastructural analysis of the autophagic process in yeast: Detection of autophagosomes and their characterization. *J. Cell. Biol.* 124(6): 903-913.
- Bampton, E. T., Goemans, C. G., Niranjana, D., Mizushima, N., et Tolkovsky, A. M.** (2005). The Dynamics of Autophagy Visualized in Live Cells: From Autophagosome Formation to Fusion with Endo/Lysosomes. *Autophagy.* 1(1): 23-36.
- Berezney, R., et Coffey, D. S.** (1977). Nuclear Matrix: Isolation and Characterization of a Framework Structure from rat liver nuclei. *J. Cell. Biol.* 73(3): 616-637.
- Bernales, S., Schuck, S., et Walter, P.** (2007). ER-Phagy: Selective Autophagy of the Endoplasmic Reticulum. *Autophagy.* 3(3): 285-287.
- Blobel, G., et Potter, V. R.** (1966). Nuclei from rat liver: isolation method that combines purity with high yield. *Science.* 154(757): 1662-1665.
- Bolovan, C. A., Sawtell, N. M., et Thompson, R. L.** (1994). ICP34.5 mutants of herpes simplex virus type 1 strain 17syn+ are attenuated for neurovirulence in mice and for replication in confluent primary mouse embryo cell cultures. *J. Virol.* 68(1): 48-55.

- Boya, P., Gonzalez-Polo, R. A., Casares, N., Perfettini, J. L., Dessen, P., Larochette, N., Metivier, D., Meley, D., Souquere, S., Yoshimori, T., Pierron, G., Codogno, P., et Kroemer, G.** (2005). Inhibition of macroautophagy triggers apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 25 (3): 1025-1040.
- Byfield, M. P., Murray, J. T., et Backer, J. M.** (2005). hVps34 is a nutrient-regulated lipid kinase required for activation of p70 S6 kinase. *J. Biol. Chem.* 280(38): 33076-33082.
- Chan, E. Y., Longatti, A., McKnight, N. C., et Tooze, S. A.** (2009). Kinase-inactivated ULK proteins inhibit autophagy via their conserved C-terminal domains using an Atg13-independent mechanism. *Mol. Cell. Biol.* 29(1): 157-171.
- Chaturvedi, A., Dorward, D., et Pierce, S. K.** (2008). The B cell receptor governs the subcellular location of Toll-like receptor 9 leading to hyper-responses to DNA-containing antigens. *Immunity.* 28(6): 799-809.
- Chen, M. H., Liu, L. F., Chen, Y. R., Wu, H. K., et Yu, S. M.** (1994). Expression of alpha-amylases, carbohydrate metabolism, et autophagy in cultured rice cells is coordinately regulated by sugar nutrient. *Plant. J.* 6(5): 625-636.
- Chiang, H. L., Terlecky, S. R., Plant, C. P., et Dice, J. F.** (1989). A role for a 70-kilodalton heat shock protein in lysosomal degradation of intracellular proteins. *Science.* 246(4928): 382-385.
- Clark, S. L. Jr.** (1957). Cellular differentiation in the kidneys of newborn mice studies with the electron microscope. *J. Biophys, Biochem. Cytol.* 3(3): 349-362.
- Corcelle, E., Djerbi, N., Mari, M., Nebout, M., Fiorini, C., Fenichel, P., Hofman, P., Poujeol, P., et Mograbi, B.** (2007). Control of the autophagy maturation step by the MAPK ERK and p38: lessons from environmental carcinogens. *Autophagy.* 3(1): 57-59.
- Crotzer, V. L., et Blum, J. S.** (2005). Autophagy and intracellular surveillance: modulating CMH class II antigen presentation with stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102(22): 7779-7780.
- Crotzer, V. L., et Blum, J. S.** (2010). Autophagy and adaptive immunity. *Immunology.* 131(1): 9-17.
- Cuervo, A. M, Knecht, E., Terlecky, S., et Dice, J. F.** (1995). Activation of a selective pathway of lysosomal proteolysis in rat liver by prolonged starvation. *Am. J. Physiol.* 269: C1200-C1208.
- Cuervo, A. M, Mann, L., Bonten, E., d'Azzo, A., et Dice, J. F.** (2003). Cathepsin A regulates chaperone-mediated autophagy through cleavage of the lysosomal receptor. *EMBO. J.* 22 (1): 47-59.
- Cuervo, A. M.** (2004). Autophagy: In sickness and in health. *Trends. Cell. Biol.* 14 (2): 70-77.

- Cuervo, A. M., Dice, J. F., et Knecht, E.** (1997). A population of rat liver lysosomes responsible for the selective uptake and degradation of cytosolic proteins. *J. Biol. Chem.* 272(9): 5606-5615.
- Cuervo, A. M., et Dice, J. F.** (1996). A receptor for the selective uptake and degradation of proteins by lysosomes. *Science.* 273(5274): 501-503.
- Cuervo, A. M., et Dice, J. F.** (2000a). Regulation of lamp2a levels in the lysosomal membrane. *Traffic.* 1(7): 570-583
- Cuervo, A. M., et Dice, J. F.** (2000b). Unique properties of lamp2a compared to other lamp2 isoforms. *J. Cell. Sci.* 113: 4441-4450.
- Darnell, J., Lodish, H., et Baltimore, D.** (1990). Principles of cellular organization and function. In *Molecular cell biology* (Second edition). W. H. Freeman, New York. pp.131-186.
- Darsow, T., Rieder, S. E., et Emr, S. D.** (1997). A multispecificity syntaxin homologue, Vam3p, essential for autophagic and biosynthetic protein transport to the vacuole. *J. Cell. Biol.* 138(3): 517-529.
- De Duve, C., et Wattiaux, R.** (1966). Functions of lysosomes. *Annu. Rev. Physiol.* 28: 435-492.
- Degenhardt, k., Mathew, R., Beaudoin, B., Bray, K., Anderson, D., Chen, G., Mukherjee, C., Shi, Y., Gelinas, C., Fan, Y., Nelson, D. A., Jin, S., et White, E.** (2006). Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, et tumorigenesis. *Cancer. Cell.* 10(1): 51-64.
- Delgado, M. A., Elmaoued, R. A., Davis, A. S, Kyei, G., et Deretic V.** (2008). Toll like receptors control autophagy. *Embo. J.* 27(7): 1110-1121.
- Dengjel, J., Schoor, O., Fischer, R., Reich, M., Kraus, M., Muller, M., Kreymborg, K., Altenberend, F., Brandenburg, J., Kalbacher, H., Brock, R., Driessen, C., Rammensee, H. G., et Stevanovic, S.** (2005). Autophagy promotes CMH class II presentation of peptides from intracellular source proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102(22): 7922-7927.
- Deretic, V.** (2005). Autophagy in innate and adaptive immunity. (2005). *Trends. Immunol.* 26(10): 523-528.
- Deretic, V.** (2008). Autophagosome and phagosome. *Methods. Mol. Biol.* 445: 1-10.
- Dice, J. F.** (1990). Peptide sequences that target cytosolic proteins for lysosomal proteolysis. *Trends. Biochem. Sci.* 15(8): 305-309.
- Dimmer, K. S., et Scorrano, L.** (2006). (De) constructing mitochondria: what for? *Physiology (Bethesda).* 21: 233-241.

Dunkley, T. P., Hester, S., Shadforth, I. P., Runions, J., Weimar, T., Hanton, S. L., Griffin, J. L., Bessant, C., Brandizzi, F., Hawes, C., Watson, R. B., Dupree, P., et Lilley, K.S. (2006). Mapping the Arabidopsis organelle proteome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 103(17): 6518-6523.

Dunn, W. A. Jr. (1994). Autophagy and related of lysosomal-mediated protein degradation. *Trends. Cell. Biol.* 4(4): 139-143.

Dunn, W. A. Jr., Cregg, J. M., Kiel, J. A., van der Klei, I. J., Oku, M., Sakai, Y., Sibirny, A. A., Stasyk, O.V., et Veenhuis, M. (2005). Pexophagy: the selective autophagy of peroxisomes. *Autophagy.* 1(2): 75-83.

Egner, R., Thumm M., Straub M., Simeon A., Schuller H. J., et Wolf, D.H. (1993). Tracing intracellular proteolytic pathways: Proteolysis of fatty acid synthase and other cytoplasmic proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 268(36): 27269-27276.

English L., Chemali, M., Duron, J., Rondeau, C., Laplante, A., Gingras, D., Alexander, D., Leib, D., Norbury, C., Lippé, R., et Desjardins, M. (2009). Autophagy enhances the presentation of endogenous viral antigens on CMH class I molecules during HSV-1 infection. *Nat. Immunol.* 10(5): 480-487.

Esteban, I., Aguado, C., Sanchez, M., et Knecht, E. (2007). Regulation of various proteolytic pathways by insulin and amino acids in human fibroblasts. *FEBS. Lett.* 581 (18): 3415-3421.

Farré, J. C., et Subramani, S. (2004). Peroxisome turnover by micropexophagy: an autophagy-related process. *Trends. Cell. Biol.* 14 (9): 515-523.

Farrell, J. R., et Robert, E. (1998). Analysis in nuclear RNA. In *RNA Methodologies: A Laboratory Guide for Isolation and Characterization*, Farrell, Jr., R. E. (ed.), pp. 406-437 (Academic Press, San Diego).

Feng, Z., Zhang, H., Levine, A. J., et Jin, S. (2005). The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102(23): 8204-8209.

Fimia, G. M., Stoykova, A., Romagnoli, A., Giunta, L., Di Bartolomeo, S., Nardacci, R., Corazzari, M., Fuoco, C., Ucar, A., Schwartz, P., Gruss, P., Piacentini, M., Chowdhury, K., et Cecconi, F. (2007). Ambra1 regulates autophagy and development of the nervous system. *Nature.* 447(7148): 1121-1125.

Fleischer, S., et Kervina, M. (1974). Subcellular fractionation of rat liver. *Methods. Enzymol.* 31: 6-41.

Florens, L., Korfali, N., et Schirmer, E. C. (2008). Subcellular Fractionation and Proteomics of Nuclear Envelopes. *Methods. Mol. Biol.* 432: 117-137.

- Foster, L. J., De Hoog, C. L., et Mann, M.** (2003). Unbiased quantitative proteomics of lipid rafts reveals high specificity for signaling factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 100 (10): 5813-5818.
- Frezza, C., Cipolat, S., et Scorrano, L.** (2007). Organelle isolation: functional mitochondria from mouse liver, muscle and cultured fibroblasts. *Nat. Protoc.* 2(2): 287-295.
- Georgescu, S. P., et Goruppi, S.** (2009). Autophagy as a defense mechanism against pathogens. *RRBI. XII* (2): 94-97.
- Glickman, M. H., et Ciechanover, A.** (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* 82(2): 373-428.
- Goldsmith, K., Chen, W., Johnson, D. C., et Hendricks, R. L.** (1998). Infected cell protein (ICP)47 enhances herpes simplex virus neurovirulence by blocking the CD8+ T cell response. *J. Exp. Med.* 187(3): 341-348.
- Graham, J. M.** (2001). Subcellular Fractionation and Isolation of Organelles. In *Current Protocols in Cell Biology*. Juan. S. Bonifacino, Mary. Dasso, Joe. B. Harford, Jennifer. Lippincott-Schwartz, et Kenneth. M. Yamada. (ed.), pp. 3.10.1-3.10.19.
- Graham, J., Ford, T., et Rickwood, D.** (1994). The preparation of subcellular organelles from mouse liver in self generated gradients of iodixanol. *Anal. Biochem.* 220(2): 367-373.
- Greenberg, M. E., et Bender, T. P.** (1997). Identification of Newly Transcribed RNA. In *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel, F.M., et al. (ed.), pp. 4.10.1-4.10.11 (John Wiley and Sons, New York).
- Hailey, D. W., Rambold, A. S., Satpute-Krishnan, P., Mitra, K., Sougrat, R., Kim, P. K., et Lippincott-Schwartz, J.** (2010). Mitochondria supply membranes for autophagosome biogenesis during starvation. *Cell.* 141(4): 656- 667.
- Hara, T., Nakamura, K., Matsui, M., Yamamoto, A., Nakahara, Y., Suzuki-Migishima, R., Yokoyama, M., Mishima, K., Saito, I., Okano, H., et Mizushima, N.** (2006). Suppression of basal autophagy in neural cells causes neurodegenerative disease in mice. *Nature.* 441 (7095): 885-889.
- Hayashi-Nishino, M., Fujita, N., Noda, T., Yamaguchi, A., Toshimori, T., et Yamamoto, A.** (2009). A subdomain of the endoplasmic reticulum forms a cradle for autophagosome formation. *Nat. Cell. Biol.* 11(12): 1433-1437.
- He, B., Gross, M., et Roizman, B.** (1997). The gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1 complexes with protein phosphatase 1a to dephosphorylate the alpha subunit of the eukaryotic translation initiation factor 2 and preclude the shutoff of protein synthesis by double-stranded RNA-activated protein kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 94(3): 843-848.

- He, C., et Klionsky, D. J.** (2009). Regulation Mechanisms and Signaling Pathways of Autophagy. *Annu. Rev. Genet.* 43: 67-93.
- Henell, F., Berkenstam, A., Ahlberg, J., et Glaumann, H.** (1987). Degradation of short- and long-lived proteins in perfused liver and in isolated autophagic vacuoles-lysosomes. *Exp. Mol. Pathol.* 46(1): 1-14.
- Hicox, J. A., Whitehouse, A., et Matthews, D. A.** (2010). Nucleolar proteomics and viral infection. *Proteomics.* 10(22): 4077-4086.
- Howell, K. E., Devaney, E., et Gruenberg, J.** (1989). Subcellular fractionation of tissue culture cells. *Trends. Biochem. Sci.* 14(2): 44-47.
- Hoyer-Hansen, M., Bastholm, L., Szyniarowski, P., Campanella, M., Szabadkai, G., Farkas, T., Bianchi, K., Ferhrenbacher, N., Elling, F., Rizzuto, R., Mathiasen, I. S., et Jäättelä, M.** (2007). Control of macroautophagy by calcium, calmodulin-dependent kinase kinase- β , et Bcl-2. *Mol. Cell.* 25(2): 193-205.
- Huang, J., et Klionsky, D. J.** (2007). Autophagy and human disease. *Cell. Cycle.* 6(15): 1837-1849.
- Huber, L. A., Pfaller, K., et Vietor, I.** (2003). Organelle proteomics: Implications for subcellular fractionation in proteomics. *Circ. Res.* 92(9): 962-968.
- Inadome, H., Noda, Y., Adachi, H., et Yoda, K.** (2005). Immunolocalization of the yeast Golgi subcompartments and characterization of a novel membrane protein, Svp26, discovered in the Sed5-containing compartments. *Mol. Cell. Biol.* 25(17): 7696-7710.
- Inoki, K., Zhu, T., et Guan, K. L.** (2003). TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell.* 115(5): 577-590.
- Inoue, Y., Suzuki, T., Hattori, M., Yoshimoto, K., Ohsumi, Y., et Moriyasu, Y.** (2006). AtATG Genes, Homologs of Yeast Autophagy Genes, are Involved in Constitutive Autophagy in Arabidopsis Root Tip Cells. *Plant. Cell. Physiol.* 47(12): 1641-1652.
- Ishihara, N., Hamasaki, M., Yokota, S., Suzuki, K., Kamada, Y., Kihara, A., Yoshimori, T., Noda, T., et Ohsumi, Y.** (2001). Autophagosome requires specific early Sec proteins for its formation and NSF/SNARE for vacuolar fusion. *Mol. Biol. Cell.* 12(11): 3690-3702.
- Iwata, A., Christianson, J. C., Bucci, M., Ellerby, L. M., Nukina, N., Forno, L. S., et Kopito, R. R.** (2005). Increased susceptibility of cytoplasmic over nuclear polyglutamine aggregates to autophagic degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102(37): 13135-13140.
- Jager, S., Bucci, C., Tanida, I., Ueno, T., Kominani, E., Saftig, P., et Eskelinen, E. L.** (2004). Role for Rab7 in maturation of late autophagic vacuole. *J. Cell. Sci.* 117: 4837-4848.

- Jones, E. W., Webb, G. C., et Hiller, M. A.** (1997). Biogenesis and function of the yeast vacuole. In the *Molecular and Cellular Biology of the Yeast Saccharomyces: Cell Cycle and Cell Biology*. Pringle, J.R, Broach, J.R, et Jones, E.W. (ed.), pp. 363-470. (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S. H., Kim, Y. M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M., et Kim, D. H.** (2009). ULK-Atg13-FIP200 Complexes Mediate mTOR Signaling to the Autophagy Machinery. *Mol. Biol. Cell.* 20(7): 1992-2003.
- Jung, C. H., Jun, C. B., Ro, S. H., Kim, Y. M., Otto, N. M., Cao, J., Kundu, M., et Kim, D.H.** (2009). ULK-Atg13-FIP200 complexes mediate mTOR signaling to the autophagy machinery. *Mol. Biol. Cell.* 20(7): 1992-2003.
- Kabeya, Y., Kawamata, T., Suzuki, K., et Ohsumi, Y.** (2007). Cis1/Atg31 is required for autophagosome formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 356(2): 405-410.
- Kanki, T., et Klionsky, D. J.** (2010). The molecular mechanism of mitochondria autophagy in yeast. *Mol. Microbiol.* 75(4): 795-800.
- Kanki, T., et Klionsky, D. J.** (2008). Mitophagy in Yeast Occurs through a Selective Mechanism. *J. Biol. Chem.* 283(47): 32386-32393.
- Kaushik, S., Massey, A. C., Mizushima, N., et Cuervo, A. M.** (2008). Constitutive Activation of Chaperone-mediated Autophagy in Cells with Impaired Macroautophagy. *Mol. Biol. Cell.* 19(5): 2179-2192.
- Kiffin, R., Christian, C., Knecht, E., et Cuervo, A. M.** (2004). Activation of chaperone-mediated autophagy during oxidative stress. *Mol. Biol. Cell.* 15(11): 4829-4840.
- Kim, E., Goraksha-Hicks, P., Li, L., Neufeld, T. P., et Guan, K. L.** (2008). Regulation of TORC1 by Rag GTPases in nutrient response. *Nat. Cell. Biol.* 10(8):935-945.
- Kim, J., Huang, W. P., Stromhaug, P. E., et Klionsky, D. J.** (2002). Convergence of multiple autophagy and cytoplasm to vacuole targeting components to a perivacuolar membrane compartment prior to de novo vesicle formation. *J. Biol. Chem.* 277(1): 763-773.
- Kissova, I., Deffieu, M., Manon, S., et Camougrand, N.** (2004). Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279(37): 39068-39074.
- Klionsky, D. J.** (2005). The molecular machinery of autophagy: Unanswered questions. *J. Cell. Sci.* 118: 7-18.
- Klionsky, D. J., Cregg, J. M., Dunn, W. A. Jr., Emr, S. D., Sakai, Y., Sandoval, I. V., Sibirny, A., Subramani, S., Thumm, M., Veenhuis, M., et Ohsumi, Y.** (2003). A unified nomenclature for yeast autophagy-related genes. *Dev. Cell.* 5(4): 539-545.

- Klionsky, D. J., et Emr, S. D.** (2000). Autophagy as a regulated pathway of a cellular degradation. *Science*. 290(5497): 1717-1721.
- Knecht, E., Aguado, C., Carcel, J., Esteban, I., Esteve, J. M., Ghislat, G., Moruno, J. F., Vidal, J. M., et Saez, R.** (2009). Intracellular protein degradation in mammalian cells: recent developments. *Cell. Mol. Life Sci.* 66(15): 2427-2443.
- Knipe, D. M., et Howley, P. M.** (2007). *Fields Virology*, 5th Edition. pp. 2503-2504.
- Komatsu, M., Waguri, S., Chiba, T., Murata, S., Iwata, J., Tanida, I., Ueno, T., Koike, M., Uchiyama, Y., Kominami, E., et Tanaka, K.** (2006). Loss of autophagy in the central nervous system causes neurodegeneration in mice. *Nature*. 441(7095): 880-884.
- Kouroku, Y., Fujita, E., Tanida, I., Ueno, T., Isoai, A., Kumagai, H., Ogawa, S., Kaufman, R. J., Kominami, E., et Momoi, T.** (2007). ER stress (PERK/eIF2 α phosphorylation) mediates the polyglutamine-induced LC3 conversion, an essential step for autophagy formation. *Cell. Death. Differ.* 14(2): 230- 239.
- Kovacs, A. L., Reith, A., et Seglen, P. O.** (1982). Accumulation of autophagosomes after inhibition of hepatocytic protein degradation by vinblastine, leupetin or a lysosomotropic amine. *Exp. Cell. Res.* 137(1): 191-201.
- Kovacsovics-Bankowski, M., et Rock, K. L.** (1995). A phagosome-to-cytosol pathway for exogenous antigens presented on CMH class I molecules. *Science*. 267(5195): 243-246.
- Krick, R., Muehe, Y., Prick, T., Bremer, S., Schlotterhose, P., Eskelinen, E. L., Millen, J. I., Goldfarb, D. S., et Thumm, M.** (2008). Piecemeal microautophagy of the nucleus requires the core macroautophagy genes. *Mol. Biol. Cell.* 19(10): 4492-4505.
- Kudchodkar, S. B., et Levine, B.** (2009). Viruses and autophagy. *Rev. Med. Virol.* 19(6): 359-378.
- Kundu, M., et Thompson, C. B.** (2005). Macroautophagy versus mitochondrial autophagy: a question of fate? *Cell. Death. Differ.* 12: 1484-1489.
- Kunz, J. B., Schwarz, H., et Mayer, A.** (2004). Determination of four sequential stages during microautophagy *in vitro*. *J. Biol. Chem.* 279(11): 9987-9996.
- Lee, D. Y., Lee, J., et Sugden, B.** (2009). The unfolded protein response and autophagy: herpes viruses rule! *J. Virol.* 83(3): 1168-1172.
- Lee, H. K., Lund, J. M., Ramanathan, B., Mizushima, N., et Iwasaki, A.** (2007). Autophagy- dependent viral recognition by plasmacytoid dendritic cells. *Science*. 315 (5817):1398-1401.
- Leib, D. A., Alexander, D. E., Cox, D., Yin, J., et Ferguson, T. A.** (2009). Interaction of ICP34.5 with Beclin 1 Modulates Herpes Simplex Virus Type 1 Pathogenesis through Control of CD4 T-Cell Responses. *J. Virol.* 83(23): 12164-1217.

- Levine, B., et Klionsky, D. J.** (2004). Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell.* 6(4): 463-477.
- Levine, B., et Kroemer, G.** (2008). Autophagy in the pathogenesis of disease. *Cell.* 132(1): 27-42.
- Levine, B., Yoshimori, T., et Deretic, V.** (2009). Autophagy in infection and immunity. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 335: 71-84.
- Liang, C., Feng, P., Ku, B., Dotan, I., Canaani, D., Oh, B. H., et Jung, J. U.** (2006). Autophagic and tumour suppressor activity of a novel Beclin1-binding protein UVRAG. *Nat. Cell. Biol.* 8(7): 688-699.
- Liu, B. L., Robinson, M., Han, Z. Q., Branston, R. H., English, C., Reay, P., McGrath, Y., Thomas, S. K., Thornton, M., Bullock, P., Love, C. A., et Coffin, R. S.** (2003). ICP34.5 deleted herpes simplex virus with enhanced oncolytic, immune stimulating, and anti-tumour properties. *Gene. Ther.* 10(4): 292-303.
- Liu, Y., Schiff, M., Czymmek, K., Talloczy, Z., Levine, B., et DineshKumar, S. P.** (2005). Autophagy regulates programmed cell death during the plant innate immune response. *Cell.* 121(4): 567-577.
- Longatti, A., et Tooze S. A.** (2009). Vesicular trafficking and autophagosome formation. *Cell. Death. Differ.* 16(7): 956-965.
- Maiuri, M.C., Tasmemir, E., Criollo, A., Morselli, E., Vicencio, J. M., Carnuccio, R., et Kroemer, G.** (2009). Control of autophagy by oncogenes and tumor suppressor genes. *Cell. Death. Differ.* 16(1): 87-93.
- Majeski, A. E., et Dice, J. F.** (2004). Mechanisms of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36(12): 2435-2444.
- Manning, B. D., Tee, A. R., Logsdon, M. N., Blenis, J., et Cantley, L. C.** (2002). Identification of the tuberous sclerosis complex-2 tumor suppressor gene product tuberlin as a target of the phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway. *Mol. Cell.* 10(1): 151-162.
- Marelli, M., Smith, J. J., Jung, S., Yi, E., Nesvizhskii, A. I., Christmas, R. H., Saleem, R. A., Tam, Y. Y., Fagarasanu, A., Goodlett, D. R., Aebersold, R., Rachubinski, R. A., et Aitchison, J. D.** (2004). Quantitative mass spec-trometry reveals a role for the GTPase Rho1p in actin organization on the peroxisome membrane. *J. Cell. Biol.* 167(6): 1099-1112.
- Mariño, G., et López-Otín, C.** (2004). Autophagy: molecular mechanisms, physiological functions and relevance in human pathology. *Cell. Mol. Life. Sci.* 61(12): 1439-1454.
- Massey, A. C., Zhang, C., et Cuervo, A. M.** (2006). Chaperone-mediated autophagy in aging and disease. *Curr. Top. Dev. Biol.* 73: 205-35.
- Massey, A., Kiffin, R., et Cuervo, A. M.** (2004). Pathophysiology of chaperone-mediated autophagy. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 36(12): 2420-2434.

- Mayer A., et Wickner, W.** (1997). Docking of yeast vacuoles is catalyzed by the Ras-like GTPase Ypt7p after symmetric priming by Sec18p (NSF). *J. Cell. Biol.* 136(2): 307-317.
- McEwan, D. G., et Dikic, I.** (2010). Not All Autophagy Membranes Are Created Equal. *Cell.* 141(4): 564-566.
- Meijer, A. J., et Codogno, P.** (2006). Signalling and autophagy regulation in health, aging and disease. *Mol. Aspects. Med.* 27: 411-425.
- Meley, D., Pattingre, S., et Codogno, P.** (2006). PI3 kinases and the control of autophagy. *Bull. Cancer.* 93(5): 439-444.
- Mesa, R., Salomon, C., Roggero, M., Stahl, P. D., et Mayorga, L. S.** (2001). Rab22a affects the morphology and function of the endocytic pathway. *J. Cell. Sci.* 114: 4041-4049.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Hatano, M., Kobayashi, Y., Kabeya, Y., Suzuki, K., Tokuhisa, T., Ohsumi, Y., et Yoshimori, T.** (2001). Dissection of autophagosome formation using Apg5-deficient mouse embryonic stem cells. *J. Cell. Biol.* 152(4): 657-668.
- Mizushima, N., Yamamoto, A., Matsui, M., Yoshimori, T., et Ohsumi, Y.** (2004). In vivo analysis of autophagy in response to nutrient starvation using transgenic mice expressing a fluorescent autophagosome marker. *Mol. Biol. Cell.* 15(3): 1101-1111.
- Monastyrska, I., et Klionsky, D. J.** (2006). Autophagy in organelle homeostasis: peroxisome turnover. *Mol. Aspects. Med.* 27: 483-494.
- Moriyasu, Y., et Ohsumi, Y.** (1996). Autophagy in tobacco suspension cultured cells in response to sucrose starvation. *Plant. Physiol.* 111(4): 1233-1241.
- Mosley, A. L., Florens, L., Wen, Z., et Washburn, M. P.** (2009). A label free quantitative proteomic analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* nucleus. *J. Proteomics.* 72(1): 110-120.
- Mulvey, M., Arias, C., et Mohr, I.** (2007). Maintenance of endoplasmic reticulum (ER) homeostasis in herpes simplex virus type 1-infected cells through the association of a viral glycoprotein with PERK, a cellular ER stress sensor. *J. Virol.* 81(7): 3377-3390.
- Munafò, D. B., et Colombo, M. I.** (2002). Induction of autophagy causes dramatic changes in the subcellular distribution of GFP-Rab24. *Traffic.* 3(7): 472-482.
- Munz, C.** (2009). Enhancing immunity through autophagy. *Annu. Rev. Immunol.* 27: 423-449.
- Nara, A., Mizushima, N., Yamamoto, A., Kabeya, Y., Ohsumi, Y., et Yoshimori, T.** (2002). SKD1 AAA ATPase-dependent endosomal transport is involved in autolysosome formation. *Cell. Struct. Funct.* 27(1): 29-37.
- Nimmerjahn, F., Milosevic, S., Behrends, U., Jaffee, E. M., Pardoll, D. M., Bornkamm, G. W., et Mautner, J.** (2003). Major histocompatibility complex class II-

restricted presentation of a cytosolic antigen by autophagy. *Eur. J. Immunol.* 33(5): 1250-1259.

Nobukuni, T., Joaquin, M., Roccio, M., Dann, S. G., Kim, S. Y., Gulati, P., Byfield, M. P., Backer, J. M., Natt, F., Bos, J. L., Zwartkruis F. J., Thomas, G. (2005). Amino acids mediate mTOR/raptor signaling through activation of class 3 phosphatidylinositol 3OH-kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 102(40): 14238-14243.

Noda, T., et Yoshimori, T. (2009). Molecular basis of canonical and bactericidal autophagy. *Int. immunol.* 21(11): 1199-11204.

Novikoff, A. B., et Holtzman, E. (1976). Cell fractionation. In *Cells and organelles* (Second edition). Holt, R., et Winston, New York. pp. 28-31.

Obara, K., Sekito, T., Niimi, K., et Ohsumi, Y. (2008). The Atg18-Atg2 complex is recruited to autophagic membranes via phosphatidylinositol 3-phosphate and exerts an essential function. *J. Biol. Chem.* 283(35): 23972-23980.

Orr, M. T., Edelman, K. H., Vieira, J., Corey, L., Raulet, D. H., et Wilson, C. B. (2005). Inhibition of CMH class I is a virulence factor in herpes simplex virus infection of mice. *PLoS. Pathog.* 1(1): e7

Orvedahl, A., Alexander, D., Tallozy, Z., Sun, Q., Wei, Y., Zhang, W., Burns, D., Leib, D. A., et Levine, B. (2007). HSV-1 ICP34.5 confers neurovirulence by targeting the Béclin 1 autophagy protein. *Cell. Host. Microbe.* 1(1): 23-35.

Orvedahl, A., et Levine, B. (2008). Viral evasion of autophagy. *Autophagy.* 4(3):280-285.

Orvedahl, A., et Levine, B. (2009). Eating the enemy within: autophagy in infectious diseases. *Cell. Death. Differ.* 16(1): 57- 69.

Otto, G. P., Wu, M. Y., Kazgan, N., Anderson, O. R., et Kessin, R. H. (2003). Macroautophagy is required for multicellular development of the social amoeba *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 278(20): 17636-17645.

Paludan, C., Schmid, D., Landthaler, M., Vockerodt, M., Kube, D., Tuschl, T., et Munz, C. (2005). Endogenous CMH class II processing of a viral nuclear antigen after autophagy. *Science.* 307(5709): 593-596.

Pandey, A., Choudhary, M. K., Bhushan, D., Chattopadhyay, A., Chakraborty, S., Datta, A., et Chakraborty, N. (2006). The nuclear proteome of shikpea (*cicer arietinum*L) reveals predicted and unexpected proteins. *J. Proteome. Res.* 5(12): 3301-3311.

Park, Y. E., Hayashi, Y. K., Bonne, G., Arimura, T., Noguchi, S., Nonaka, I., et Nishino, I. (2009). Autophagic degradation of nuclear components in mammalian cells. *Autophagy.* 5(6): 795-804.

- Pasieka, T. J., Baas, T., Carter, V. S., Proll, K. C., Katze, M. G., et Leib, D. A.** (2006). Functional genomic analysis of herpes simplex virus type 1 counteraction of the host innate response. *J. Virol.* 80 (15): 7600-7612.
- Penman, S.** (1966). RNA metabolism in the HeLa cell nucleus. *J. Mol. Biol.* 17(1): 117-130.
- Periyasamy-Thandavan, S., Jiang, M., Schoenlein, P., et Dong, Z.** (2009). Autophagy: molecular machinery, regulation, et implications for renal pathophysiology. *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 297(2): 244-256.
- Petiot, A., Ogier-Denis, E., Blommaert, E. F., Meijer, A. J., et Codogno, P.** (2000). Distinct classes of phosphatidylinositol-3-kinases are involved in signalling pathways that control macroautophagy in HT-29 cells. *J. Biol. Chem.* 275(2): 992-998.
- Priault, M., Salin, B., Schaeffer, J., Vallette, F. M., di Rago, J. P., et Martinou, J. C.** (2005). Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell. Death. Differ.* 12(12): 1613-1621.
- Ravikumar, B., Vacher, C., Berger, Z., Davies, J. E., Luo, S., Oroz, L. G., Scaravilli, F., Easton, D. F., Duden, R., O’Kane, C. J., et Rubinsztein, D. C.** (2004). Inhibition of mTOR induces autophagy and reduces toxicity of polyglutamine expansions in fly and mouse models of Huntington disease. *Nat. Genet.* 36(6): 585-595.
- Reggiori, F., et Klionsky, D. J.** (2002). Autophagy in the eukaryotic cell. *Eukaryot. Cell* 1(1): 11-21.
- Reggiori, F., et Tooze, S. A.** (2009). The emergence of autophagosomes. *Dev. Cell.* 17(6): 747-748.
- Rémillard-Labrosse, G., Guay, G., et Lippé, R.** (2006). Reconstitution of Herpes simplex virus type 1 nuclear capsid egress *in vitro*. *J. Virol.* 80(19): 9741-9753
- Rich, K. A., Burkett, C., et Webster, P.** (2003). Cytoplasmic bacteria can be targets for autophagy. *Cell. Microbiol.* 5(7): 455-468.
- Roberts, P., Moshitch-Moshkovitz, S., Kvam, E., O’Toole, E., Winey, M., et Goldfarb, D. S.** (2003). Piecemeal Microautophagy of Nucleus in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biol. Cell.* 14(1): 129-141.
- Sakai, Y., Oku, M., van der Klei, I. J., et Kiel, J. A.** (2006). Pexophagy: autophagic degradation of peroxisomes. *Biochim. Biophys. Acta.* 1763(12): 1767-1775.
- Sarry, J. E., Chen, S., Collum, R. P., Liang, S., Peng, M., Lang, A., Naumann, B., Dzierszinski, F., Yuan, C. X., Hippler, M., et Rea, P. A.** (2007). Analysis of the vacuolar luminal proteome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS. J.* 274(16): 4287-4305.

- Sato, T. K., Darsow, T., et Emr, S. D.** (1998). Vam7p, a SNAP-25-like molecule, et Vam3p, a syntaxin homolog, function together in yeast vacuolar protein trafficking. *Mol. Cell. Biol.* 18(9): 5308-5319.
- Scherz-Shouval, R., Shvets, E., Fass, E., Shorer, H., Gil, L., et Elazar, Z.** (2007). Reactive oxygen species are essential for autophagy and specifically regulate the activity of Atg4. *EMBO. J.* 26(7): 1749-1760.
- Schmid, D., et Munz, C.** (2007). Innate and Adaptive Immunity through Autophagy. *Immunity.* 27(1): 11-21.
- Schmid, D., Pypaert, M., et Munz, C.** (2007). Antigen-loading compartments for major histocompatibility complex class II molecules continuously receive input from autophagosomes. *Immunity.* 26(1): 79-92.
- Schwartz, J., et Roizman, B.** (1969). Concerning the egress of herpes simplex virus from infected cells: electron and light microscope observations. *Virology.* 38(1): 42-49.
- Scott, R. C., Schuldiner, O., et Neufeld, T. P.** (2004). Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. *Dev. Cell.* 7(2): 167-178.
- Seglen, P. O., et Gordon, P. B.** (1982). 3-Methyladenine: specific inhibitor of autophagic/lysosomal protein degradation in isolated rat hepatocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 79(6): 1889-1892
- Seglen, P. O., Gordon, P. B., et Holen, I.** (1990). Nonselective autophagy. *Semin. Cell. Biol.* 1(6): 441-448.
- Shi, C. S., et Kehrl, J. H.** (2008). MyD88 and Trif target Beclin1 to trigger autophagy in macrophages. *J. Biol. Chem.* 283(48): 33175-33182.
- Shintani, T., et Klionsky, D. J.** (2004). Autophagy in health and disease: a double-edged sword. *Science.* 306(5698): 990-995.
- Suzuki, K., et Ohsumi, Y.** (2007). Molecular machinery of autophagosome formation in yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS. Lett.* 581(11): 2156-2161.
- Suzuki, K., Kirisako, T., Kamada, Y., Mizushima, N., Noda, T., et Ohsumi, Y.** (2001). The pre-autophagosomal structure organized by concerted functions of APG genes is essential for autophagosome formation. *EMBO. J.* 20(21): 5971-5981.
- Sweetlove, L. J.** (2006). The use of proteomic in the study of metabolic control. *Annu. Plant. Rev.* 22: 24-59.
- Takehige, K., Baba, M., Tsuboi, S., Noda, T., et Ohsumi, Y.** (1992). Autophagy in yeast demonstrated with proteinase-deficient mutants and conditions for its induction. *J. Cell Biol.* 119(2): 301-311.
- Taloczy, Z., Jiang, W., Virgin, H. W. 4th., Leib, D. A., Scheuner, D., Kaufman, R. J., Eskelinen, E. L., et Levine, B.** (2002). Regulation of starvation and virus-induced

autophagy by the eIF2 α kinase signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99(1): 190-195.

Thiede, B., Siejak, F., Dimmler, C., et Rudel, T. (2002). Prediction of translocation and cleavage of heterozygous ribonuclear proteins and Rho guanine nucleotide dissociation inhibitor 2 during apoptosis by subcellular proteome analysis. *Proteomics.* 2(8): 996-1006.

Todde, V., Veenhuis, M., et van der Klei, I. J. (2009). Autophagy: Principles and significance in health and disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1792 (1): 3-13.

Tortorella, D., Gewurz, B. E., Furman, M. H., Schust, D. J., et Ploegh, H. L. (2000). Viral subversion of the immune system. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 861-926.

Tsukada, M., et Ohsumi, Y. (1993). Isolation and characterization of autophagy-defective mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS. Lett.* 333: 169-174.

Uttenweiler, A., Schwarz, H., et Mayer, A. (2005). Microautophagic Vacuole Invagination Requires Calmodulin in a Ca²⁺-independent Function. *J. Biol. Chem* 280(39): 33289-33297.

Virgin, H. W., et Levine, B. (2009). Autophagy genes in immunity. *Nat. Immunol.* 10(5): 461-470.

Wang, C. W., et Klionsky, D. J. (2003). The molecular mechanism of autophagy. *Mol. Med.* 9: 65-76.

Wei, Y., Sinha, S., et Levine, B. (2008). Dual role of JNK-mediated phosphorylation of Bcl-2 in autophagy and apoptosis regulation. *Autophagy.* 4(7): 949-951.

Wiederhold, E., Gandhi, T., Permentier, H. P., Breitling, R., Poolman, B., et Slotboom, D. J. (2009). The yeast vacuolar membrane proteome. *Mol. Cell. Proteomics.* 8(2): 380-392.

Wiederhold, L., Veenhoff, L. M., Poolman, B., et Slotboom, D. J. (2010). Proteomics of *Saccharomyces cerevisiae* Organites. *Mol. Cell. Proteomics.* 9(3): 431-445.

Xie, Z., et Klionsky, D. J. (2007). Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat. Cell. Biol.* 9(10): 1102-1109.

Yamamoto, A., Tagawa, Y., Yoshimori, T., Moriyama, Y., Masaki, R., et Toshiro, Y. (1998). Bafilomycin A1 prevents maturation of autophagic vacuole by inhibition fusion between autophagosomes and lysosomes in rat hypothalamus cell line, H-4-II E cells. *Cell. Struct. Funct.* 23(1): 33-42.

Yano, T., Mita, S., Ohmori, H., Oshima, Y., Fujimoto, Y., Ueda, R., Takada, H., Goldman, W. E., Fukase, K., Silverman, N., Yoshimori, T., et Kurata, S. (2008). Autophagic control of listeria through intracellular innate immune recognition in *Drosophila*. *Nat. Immunol.* 9(8): 908-916.

Yin, Q. Y., de Groot, P. W., Dekker, H. L., de Jong, L., Klis, F. M., et de Koster, C. G. (2005). Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via glycosylphosphatidylinositol remnants or mild alkali-sensitive linkages. *J. Biol. Chem.* 280(21): 20894-20901.

Yla-Anttila, P., Vihinen, H., Jokitalo, E., et Eskelinen, E. L. (2009). 3D tomography reveals connections between the phagophore and endoplasmic reticulum. *Autophagy.* 5(8): 1180-1185.

Zhang, Y., Qi, H., Taylor, R., Xu, W., Liu, L. F., et Jin, S. (2007). The role of autophagy in mitochondria maintenance: characterization of mitochondrial functions in autophagy-deficient *S. cerevisiae* strains. *Autophagy.* 3(4): 337-346.

Zhou, D., Li, P., Lin, Y., Lott, J. M., Hislop, A. D., Canaday, D. H., Brutkiewicz, R. R., et Blum, J. S. (2005). Lamp-2a facilitates CMH class II presentation of cytoplasmic antigens. *Immunity.* 22(5): 571-581.