

ÉCOLE DOCTORALE
SANTÉ, SCIENCES BIOLOGIQUES, ET CHIMIE DU VIVANT

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301

THÈSE présentée par :
Amandine SERRANO

soutenue le : **11 juillet 2017**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'Université d'Orléans**
Discipline/ Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire

**EXPRESSION DE GALIG, GÈNE INDUCTEUR
DE LA MORT CELLULAIRE, DANS DES
CELLULES NORMALES ET
PATHOLOGIQUES**

THÈSE dirigée par :

Pr. Alain LEGRAND

Professeur, Université d'Orléans

RAPPORTEURS :

Pr. Michaël BOYER-GUITTAUT

Professeur, Université de Franche-Comté

Dr. Mojgan DJAVAHERI-MERGNY

Chargée de Recherche, Institut Bergonié, Bordeaux

EXAMINATEURS :

Pr. Guislaine CARCELAIN

Professeur, Université Paris Diderot

PRESIDENT DU JURY :

Dr. Bertrand CASTAING

Directeur de Recherche, Centre de Biophysique Moléculaire

CO-ENCADRANTE :

Dr. Lucile MOLLET

Maitre de Conférences, Université d'Orléans

Remerciements

Dans un premier temps, merci à Alain Legrand, de m'avoir permis d'intégrer son équipe, de m'avoir fait confiance et de m'avoir poussée à réaliser cette thèse. Je tiens à le remercier également pour la disponibilité dont il a fait preuve tout au long de ma thèse, et son côté très pédagogue.

Je voudrais remercier les rapporteurs de cette thèse M. Michaël Boyer-Guittaut, et Mme Mojgan Djavaheri-Mergny pour l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail. J'associe à ces remerciements Mme. Guislaine CARCELAIN, M. Bertrand CASTAING d'avoir accepté d'examiner mon travail et de participer à mon jury de thèse.

Je tiens également à remercier Eva Jakab-Toth de m'avoir permis d'intégrer son laboratoire pour réaliser cette thèse.

Merci à Lucile Mollet, d'avoir encadré ma thèse, d'avoir été présente, de m'avoir soutenue et poussée dans la réalisation de mes projets. Je pense que tout ce que j'ai à te dire ne tiendrait pas sur cette page, et comme tu le sais je ne suis pas très douée pour exprimer mes sentiments. En bref, tu as été une chef en or, j'ai vraiment apprécié de travailler avec toi pendant ces 3 années ! Maintenant à toi l'HDR, que tu puisses être directrice de thèse, et offrir ce que tu m'as offert à d'autres étudiants. Et oui, je pense que dans la vie, on ne rencontre que très peu de personnes qui croient en nous, et qui font tout leur possible pour nous pousser à progresser, nous dépasser, un grand merci pour tout !!!

Merci Thierry pour ces moments passés, nos discussions série, « Game of Thrones », les petites théories, les pauses Coca, toutes les corrections, les petites anecdotes *etc...*

Martine un grand merci pour tout ce que tu m'as appris tant du point de vue manip, que sur l'organisation du laboratoire. Pour ta disponibilité et toutes tes connaissances partagées.

Je remercie Stéphane et Saïd, mes collègues de bureau, pour toutes nos conversations, commérages *etc...* on a bien rigolé !! Même si quelques cartons rouges, tombés parfois !! Merci également à Stéphane pour les vieilles chansons qui restent dans la tête toute la journée !

Fabienne je tiens à te remercier pour tes conseils ARN, tes cannelés, ton réconfort à certains moments difficiles.

Enfin pour finir avec mon équipe, je remercie Chloé. On n'a malheureusement pas pu passer beaucoup de temps ensemble, mais merci pour ton aide sur les dernières petites manip.

Je n'oublie pas d'adresser mes remerciements à Laurent Hocqueloux, Thierry Prazuck et toute l'équipe du service des Maladies Infectieuses et Tropicales du CHRO. Ainsi que Thomas Guery, Sylvain Briault, Michèle Schoenwald, Éric Legac et toute l'équipe des services de Biologie, d'Hématologie clinique et thérapie cellulaire et de Génétique du CHRO.

Je remercie également Francine Garnache-Ottou et Pierre-Simon Rohrlich du CHU de Besançon.

Je remercie également tous les patients atteints LAM, ou infectés par le VIH et les donneurs sains de l'Etablissement Français du Sang, qui ont contribué à cette étude.

Je remercie Jérôme Delon de l'institut Cochin, de m'avoir accordé du temps, et de m'avoir si bien accueillie pour les quelques manipulations que j'ai effectuées au sein de l'institut.

Merci à Frédéric Moal pour son implication dans l'analyse de nos données et ses explications simplifiées.

Après l'équipe, je remercie le coin café du 1^{er} étage, qui comprend bien sûr mon équipe mais aussi beaucoup d'autres personnes (Shalina, Alexia, Wissem, Jean-Marc, Catherine, Séverine, Simon, Éric, Élodie, Loïck). Merci pour toutes nos conversations très intéressantes par moments ou d'un niveau très bas à d'autres moments. Merci également à tous ces gourmands, je ne sais pas combien j'ai pris de kg au cours de ma thèse mais vous y êtes pour quelque chose !!

Merci à Aline et Simon, présents dès le M2, et à Wissem, Élodie, Shalina, Alexia, et Anthony pour les pauses café, les repas à la cantine et les soirées !!! On a passé de très bons moments.

Merci à Kevin, Aurélia et Geoffrey, pour les moments de discussions, de tests de manips « bizarres », et autres plaintes que j'ai pu avoir.

Je remercie également mes 2 stagiaires Bastien et Florent. Ce n'était pas évident d'encadrer un stage, j'ai beaucoup apprécié cet échange de connaissances et de compétences. Cela a été pour moi un très bon exercice au cours de ma thèse.

Je remercie également David Gosset pour son aide au niveau de la plateforme P@CYFIC, ses conseils sur les manips et son temps.

Merci également Yannick, de m'avoir aidée et d'avoir été disponible pour tous les petits problèmes que j'ai pu rencontrer au cours de ma thèse.

Merci à Justo et Martial pour toute l'aide qu'ils nous ont apportée notamment pour l'organisation du barbecue, de la raclette et du colloque, lorsque je faisais partie de l'ADOC.

Un merci à Germaine pour sa bonne humeur quotidienne, ses discussions, c'était un plaisir de vous voir tous les jours.

Je tiens enfin à remercier ma famille : mes parents, ma sœur, ma belle-famille et Anthony pour m'avoir toujours soutenue dans mes choix et d'avoir été à mes côtés pendant toutes ces années.

Enfin, ce travail n'aurait pu aboutir sans l'aide de nombreuses personnes. Que celles que j'oublie ici me pardonnent.

Liste des abréviations

• aa	acides aminés
• ADN	Acide désoxyribonucléique
• Ag	Antigène
• AIF	Apoptosis Inducing Factor
• Apaf-1	Apoptotic Peptidase Activating Factor 1
• APOBEC3	Apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G
• ARNm	Acide ribonucléique messager
• ARV	Anti rétroviraux
• ATG	Autophagy-related gene
• ATP	adenosine triphosphate
• ATRA	All Trans Retinoic Acid
• AZT	Azidothymidine
• Bad	Bcl2-associated agonist of cell death
• Bag1	BCL2 Associated Athanogene 1
• BAK	BCL2 Antagonist/Killer 1
• BAX	BCL2 Associated X
• Bcl-2	B-cell lymphoma 2
• Bcl-w/Bcl2l2	Bcl2-like protein 2
• Bcl-x _L / Bcl2l1	B-cell lymphoma extra large / Bcl2-like protein 1
• BCR-ABL	Breakpoint Cluster Region-Abelson
• BH	Bcl-2 Homology
• Bid	BH3 Interacting Domain Death Agonist
• Bik	Bcl-2-interacting killer
• BNIP3L	BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-Interacting Protein 3-Like
• CAD/DFF40	Caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor 40
• CARD	Caspase Recruitment Domain
• CBF α /AML1/RUNX1	Core-binding factor subunit alpha-2/Acute Myeloid Leukemia 1/Runt-related transcription factor 1
• CBF β /CBF α	Core-binding factor subunit beta / Core-binding factor subunit alpha
• CBM	Centre de Biophysique Moléculaire
• CCR5	CC chemokine receptor type 5
• CD	Cluster de différenciation
• CDC	Centers for Disease Control
• CEBP α	CCAAT/enhancer-binding protein alpha
• CHRO	Centre Hospitalier Régional d'Orléans
• CLP	Progéniteur Lymphoïde Commun
• CMA	Chaperone-mediated autophagy
• CMH	complexe majeur d'histocompatibilité
• CMP	Précurseur Myéloïde Commun
• CPA	Cellules Présentatrices d'Antigènes
• CR	Rémission complète
• Cri	Rémission complète avec rétablissement incomplet
• CSF	Colony Stimulating Factor
• CV	Charge Virale
• CXCR4	CXC chemokine receptor type 4
• cyt c	cytochrome c
• DD	Death Domain
• ddPCR	droplet digital PCR
• DED	Death Effector Domain
• DISC	Death-Inducing Signaling Complex
• DMSO	diméthylsulfoxyde
• DR	Death Receptor
• EDTA	Ethylène diamine tétraacétique

• EFS	Etablissement Français du Sang
• ETO/RUNX1T1/CBFα2T1	Eight twenty one/RUNX1 Translocation Partner 1/CBF- α Translocation Partner 1
• FAB	Franco-Américano-Britannique
• FADD	Fas-Associated Death Domain
• Fas	Apoptosis stimulating fragment
• FIP 200	RB1-inducible coiled-coil protein 1/ FAK family kinase interacting protein of 200 kDa
• FISH	Fluorescent In Situ Hybridization
• FLT3	FMS-like Tyrosine kinase 3
• FLT3-ITD	FMS-like tyrosine kinase 3: Internal Tandem Duplication
• FLT3-TKD	FMS-like tyrosine kinase 3: domaine tyrosine kinase
• GABARAP	GABA type A receptor-associated protein
• GABARAPL1/2/3	GABA type A receptor-associated protein like 1/2/3
• GALIG	GAlectin-3 Internal Gene
• GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
• GAPR-1	Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1
• GATA-1	GATA Binding Protein 1
• GATE-16	GATE-16 : Golgi-Associated ATPase Enhancer of 16 kDa
• G-CSF	Granulocyte Colony Stimulating Factor
• GEC-1	Glandular Epithelial Cell protein 1
• GFP	Green Fluorescent Protein
• GM-CSF	Granulocyte/Macrophage Colony Stimulating Factor
• GMP	Granulocyte Macrophage Précurseur
• gp	Glycoprotéine
• HAART	Highly Active Antiretroviral Therapy
• HECT	Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus
• Hip	Hsc70 interacting protein
• HL-60	Human Leukemia 60
• HLA-DR	Human Leukocyte Antigen - antigen D Related
• Hop	Hsp70-Hsp90 organizing protein
• HPRT1	Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase
• HSC	Hematopoietic Stem Cell , cellule souche hématopoïétique
• Hsc	Heat shock consensus
• Hsp	Heat shock protein
• HUWE1	HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase
• IAP	Inhibitor of Apoptosis Proteins
• ICAD/DDF45	Inhibitor of Caspase-Activated DNase/DNA Fragmentation Factor 45
• ICAM	InterCellular Adhesion Molecule
• Ig	Immunoglobulines
• IL-4	Interleukine 4
• IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
• JNK1/MAPK8	c-Jun N-terminal Kinase 1/ Mitogen-activated protein kinase 8
• kDa	kilodalton
• LA	Leucémies Aiguës
• LAM	Leucémie Aiguë Myéloïde
• LAMP2a	Lysosomal Associated Membrane Protein 2 a
• LAP	Leucémie Aiguë Promyélocytique
• LB	Luria-Bertani
• L_B	lymphocytes B
• LETM1	Leucine zipper-EF-hand-containing Transmembrane protein 1
• LGALS3	Lectin, Galactoside-Binding, Soluble, 3, / Galectine 3
• LIR	LC3-Interacting Region
• L_T	Lymphocytes T
• LTR	Long Terminal Repeat
• Luc-PCA	Luciferase Protein Complementation Assay
• MAM	Membranes associées aux mitochondries

• MAP1LC / LC3	Microtubule associated protein 1 light chain 3
• Mcl-1	Myeloid cell leukemia 1
• MCP	Mort Cellulaire Programmée
• M-CSF	Macrophage – Colony Stimulating Factor
• MEP	Mégacaryocyte Erythrocyte Précurseur
• MGG	May-Grünwald Giemsa
• MLL	Mixed-Lineage Leukemia
• MO	Moelle osseuse
• MRD	Minimal Residual Disease
• mTOR	mammalian Target Of Rapamycin
• mTORC1	mammalian Target Of Rapamycin Complex 1
• MYH11	Myosin Heavy-chain 11
• NBR1	Neighbor of BRCA1 gene 1
• Ncp7	Nucléoprotéine 7
• NIX	NIP3-like protein X
• NK	Natural Killer
• NOXA	NADPH oxidase activator
• NPM1	Nucleophosmine
• ns	non significatif
• OMI/HTRA2	Serine Protease High Temperature Requirement Protein A2 mitochondrial
• Opa1	Optic atrophy type-1
• ORF	Open Reading Frame
• PARP	Poly(ADP-ribose) polymérase
• pb	Paire de bases
• PB1	Phox and Bem 1
• PBL	Peripheral Blood Lymphocytes
• PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
• PBS	Phosphate Buffered Saline
• PE	phosphatidyléthanolamine
• pH	Potential of Hydrogen
• PI3K	Phosphoinositide-3 Kinase
• PMA	Phorbol 12-Myristate 13-Acetate
• PML	Promyelocytic Leukemia
• PR	Rémission partielle
• Pro-B	Pro-lymphocytes B
• Pro-NK	Pro-Natural Killer
• Pro-T	Pro-lymphocytes T
• PS	Phosphatidylsérines
• PS	phosphatidylsérines
• PtdIns(3)P	Phosphatidylinositol-3-phosphate
• PUMA	p53 up-regulated modulator of apoptosis (BCL2 Binding Component 3)
• RARα	Retinoic Acid Receptor alpha
• RD	Maladie résistante
• RING	Really Interesting New Gene
• RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
• RT	Reverse transcriptase, transcriptase inverse
• RT-QPCR	Reverse transcription real-time polymerase chain reaction
• SDF-1	Stromal Cell-Derived Factor 1 -1
• SIDA	Syndrôme de l'Immunodéficience Acquise
• SMAC/DIABLO	Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low pI
• SQSTM1	Sequestosome 1
• SU	sous-unités
• SVF	Sérum de Veau Foetal
• tBID	truncated BID
• TCR	Récepteur des cellules T

• TFEB	Transcription Factor EB
• THEM4	Thioesterase Superfamily Member 4
• Thp-1	Human Monocytic Leukemia
• TNF-R1	Tumor Necrosis Factor Receptor 1
• TPA	12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate
• TRAIL-R1	TNF- Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 1
• UBA	Ubiquitin-Associated
• UBQLN4	Ubiquilin-4
• ULK	UNC-51 like Ser/Thr kinase
• UPS	système ubiquitine protéasome
• Vif	Virion infectivity factor
• VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
• VISCONTI	Viro-Immunological Sustained CONTROL after Treatment Interruption
• VPS15/PIK3R4	Vacuolar Protein Sorting 15/Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4/PI3K p150 subunit
• VPS34/PIK3C3	Vacuolar Protein Sorting 34/Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3
• WT1	Wilm's Tumor 1

Liste des figures :

Figure 1 : Structure génique de la <i>GALECTINE-3</i> et de <i>GALIG</i>	1
Figure 2 : Séquences en acides aminés des Galigines	2
Figure 3 : Principaux membres de la famille Bcl-2	5
Figure 4 : Organisation des pro-caspases	8
Figure 5 : La voie extrinsèque et la voie intrinsèque mitochondriale d'activation de l'apoptose	9
Figure 6 : Formation de l'apoptosome	10
Figure 7 : Formation du complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex)	11
Figure 8 : Développement des cellules souches hématopoïétiques	16
Figure 9 : Myélopoïèse et lignées cellulaires	21
Figure 10 : Ubiquitination des protéines	27
Figure 11 : Structure des protéasomes 20S et 26S	28
Figure 12 : Mécanisme de l'autophagie médiée par les chaperonnes	32
Figure 13 : La macro-autophagie	33
Figure 14 : Formation de la vésicule d'autophagie	34
Figure 15 : Activation et ancrage à la membrane de LC3	36
Figure 16 : Formation du complexe ATG16L1	37
Figure 17 : Becline-1 et les protéines de la famille Bcl-2	39
Figure 18 : Technique Luc-PCA (Luciferase protein complementation assay)	44
Figure 19 : Interactome de la Cytogaligine	46
Figure 20 : Myélopoïèse et LAM type FAB	54
Figure 21 : Le facteur de transcription CBF- α /CBF- β , en situations normale et pathologique.	57
Figure 22 : Fusion PML-RAR α , et traitement à l'acide rétinoïque ou à l'arsenic.	59
Figure 23 : Structure génomique du VIH	68
Figure 24 : Structure de la particule virale du Virus Immunodéficience Humaine	69
Figure 25 : Cycle de réplication virale du virus VIH-1	72
Figure 26 : Les 3 stades de l'infection par le VIH	73
Figure 27 : ARV et cycle viral	76
Figure 28 : Variation d'expression des gènes <i>GALIG</i> et <i>MCL1</i> au cours des premiers temps de la différenciation en monocytes/macrophages de la lignée HL-60	90
Figure 29 : Variation d'expression des ARNm de <i>GALIG</i> et <i>MCL1</i> au cours de la différenciation en monocytes/ macrophages des lignées THP-1 et U937	91
Figure 30 : Variation de l'expression des ARNm <i>GALIG</i> et <i>MCL1</i> , différenciation des monocytes issus de donneurs sains en macrophages	92
Figure 31 : Acquisition de la capacité à phagocyter, lignée HL-60	93
Figure 32 : Pourcentage de cellules capables de phagocyter	94

Figure 33 : Expression de <i>GALIG</i> et des gènes impliqués dans l'autophagie, dans la moelle osseuse du groupe M0-M4	102
Figure 34 : Expression de <i>GALIG</i> et des gènes impliqués dans l'autophagie, dans le sang du groupe M0-M4	103
Figure 35 : Cinétique d'expression de <i>GALIG</i> , pendant la différenciation	107
Figure 36 : Variation d'expression des partenaires de <i>GALIG</i> au cours de la différenciation	109

Liste des tableaux :

Tableau 1 : Classification Franco-Américano-Britannique (FAB) des sous-types de Leucémies Aiguës Myéloïdes	50
Tableau 2 : Classification OMS des Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM)	56
Tableau 3 : Classement pronostique des LAM en fonction des différents paramètres cliniques.	63
Tableau 4 : Récapitulatifs des paramètres étudiés dans différents modèles de différenciation myéloïde.	95
Tableau 5 : Tableau clinique des patients, prélèvements de moelle osseuse	99
Tableau 6 : Tableau clinique des patients, prélèvements sanguins	100
Tableau 7 : Nombre de copies d'ARNm/ng d'ARN totaux dans les cellules de patients atteints de LAM-M5	105
Tableau 8 : Nombre de copies d'ARNm dans les cellules du patient atteint d'une LAM-M6	106

TABLE DES MATIERES

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des figures :

Liste des tableaux :

Introduction 1 ^{re} partie : <i>GALIG</i> en conditions physiologiques « normales »	1
I. Le gène <i>GALIG</i> :	1
II. <i>GALIG</i> , apoptose et différenciation cellulaire :	3
A. Apoptose	3
1) Partenaires moléculaires :	4
a) Les protéines de la famille Bcl-2 :	4
b) Les caspases : bras armé de l'apoptose :	7
2) Les deux voies d'activation de l'apoptose :	9
a) La voie intrinsèque :	9
b) La voie extrinsèque :	10
c) Communication entre les voies :	12
d) Autres formes de mort cellulaire :	12
e) <i>GALIG</i> , un inducteur de mort cellulaire particulière :	13
B. La différenciation cellulaire ; une apoptose incomplète	14
1) Hématopoïèse, Myélopoïèse :	15
2) Les caspases essentielles à la différenciation :	18
3) Etude de la différenciation myéloïde <i>in vitro</i> :	20
4) <i>GALIG</i> et différenciation myéloïde :	24
III. <i>GALIG</i> , Système Ubiquitine Protéasome et Autophagie :	25
A. Le système ubiquitine protéasome (UPS) :	25
1) L'ubiquitination :	26
2) Le protéasome :	27
3) Système Ubiquitine Protéasome et famille Bcl-2 :	28
4) Système Ubiquitine Protéasome et différenciation cellulaire :	29
B. L'autophagie	30
1) La micro-autophagie :	30
2) L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes :	30
3) La macro-autophagie :	32
4) Autophagie et famille Bcl-2 :	39
5) Autophagie et processus de différenciation cellulaire :	40
6) Autophagie et système immunitaire :	42
C. Interactome des produits du gène <i>GALIG</i> :	43
Introduction 2 ^e partie : <i>GALIG</i> en conditions pathologiques	48
I. Défaut de différenciation : cas des leucémies Aiguës Myéloïdes :	48
A. Classification initiale, par stade de différenciation des blastes	48
B. Principaux réarrangements chromosomiques et mutations géniques :	54

1) Réarrangements chromosomiques principaux	56
a) LAM avec réarrangement impliquant le facteur de transcription CBF α -CBF β :	56
b) Leucémie Aiguë Promyélocytique (LAP) avec PML-RAR α	58
c) Autres mutations géniques	59
2) Facteurs pronostiques des Leucémies Aiguës Myéloïdes	61
C. Traitement et évaluation de la réponse au traitement	63
1) Traitement :	63
2) Critères d'évaluation de la rémission :	64
D. Réinduction de la différenciation des cellules de patients atteints de LAM :	65
II. Dérégulation d'apoptose et de l'autophagie : cas de l'infection au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) :	67
A. Infection par le VIH :	67
1) Structure du VIH :	68
2) Tropisme :	70
3) Cycle viral :	70
4) Infection à VIH avec et sans traitement :	72
a) Evolution de l'infection sans antirétroviraux :	72
b) Mise sous traitement Anti Rétroviral (ARV) :	75
c) Traitement et réservoir VIH :	77
B. Inhibition de l'autophagie par le VIH :	78
1) Contact avec les glycoprotéines de l'enveloppe virale :	79
2) Les protéines virales Tat, Vif et Nef :	79
a) La protéine Tat (Trans Activating Factor) :	79
b) La protéine Vif (Viral Infectivity Factor) :	80
c) La protéine Nef (Negative Regulatory Factor) :	81
Objectifs de ma thèse :	83
Résultats : 1 ^{re} partie : GALIG en conditions physiologiques « normales »	82
I. Introduction :	82
II. Article et données complémentaires :	82
A. Article :	83
B. Données complémentaires :	87
1) Matériels et méthodes :	87
a) Lignées THP-1 et U937 :	87
b) Monocytes issus de donneurs sains après tri par déplétion sur billes magnétiques	88
c) Induction de la différenciation myéloïde vers les monocytes/macrophages :	88
d) Acquisition de la capacité à phagocyter :	88
e) Extraction des ARN et dosage par RTqPCR :	89
2) Résultats :	89
a) Expression de GALIG et MCL1 par RTqPCR :	89
b) Acquisition de la capacité à phagocyter :	92
III. Conclusion :	94
Résultats : 2 ^e partie : GALIG en conditions pathologiques	98
Défaut de différenciation : cas des leucémies Aiguës Myéloïdes :	98

I.	Introduction :	98
II.	Matériel et méthode :	98
A.	Les patients :	98
B.	Comité d'éthique CHRO :	101
C.	Différenciation cellulaire, extraction des ARN totaux et dosage par ddPCR	101
III.	Résultats :	101
A.	Groupe M0-M4 :	101
1)	Expression du gène <i>GALIG</i> et des gènes impliqués dans l'autophagie :	101
a)	Au niveau de la moelle osseuse	101
b)	Au niveau du sang :	103
B.	Groupe M5 :	104
C.	Groupe M6 :	105
D.	Réinduction de la différenciation :	106
1)	Variation d'expression du gène <i>GALIG</i> :	106
2)	Variation d'expression des partenaires de <i>GALIG</i> :	108
IV.	Conclusion :	109
	Dérégulation d'apoptose et de l'autophagie : cas de l'infection au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) :	111
I.	Introduction	111
II.	Article :	111
III.	Conclusion :	127
	Discussions-Perspectives	139
I.	<i>GALIG</i> et différenciation myéloïde :	139
A.	Blocage de la différenciation myéloïde : les LAM	139
B.	Induction et réinduction de la différenciation myéloïde :	143
1)	Différenciation en macrophages :	143
2)	Différenciation en polynucléaire neutrophile :	147
3)	En résumé :	148
II.	Expression du gène <i>GALIG</i> et des gènes impliqués dans l'autophagie : cas de l'infection au VIH :	149
1)	Expression du gène <i>GALIG</i>	149
2)	Expression des gènes impliqués dans l'autophagie :	152
III.	<i>GALIG</i> et mécanisme d'action :	154
	Références bibliographiques :	158
	Annexe :	

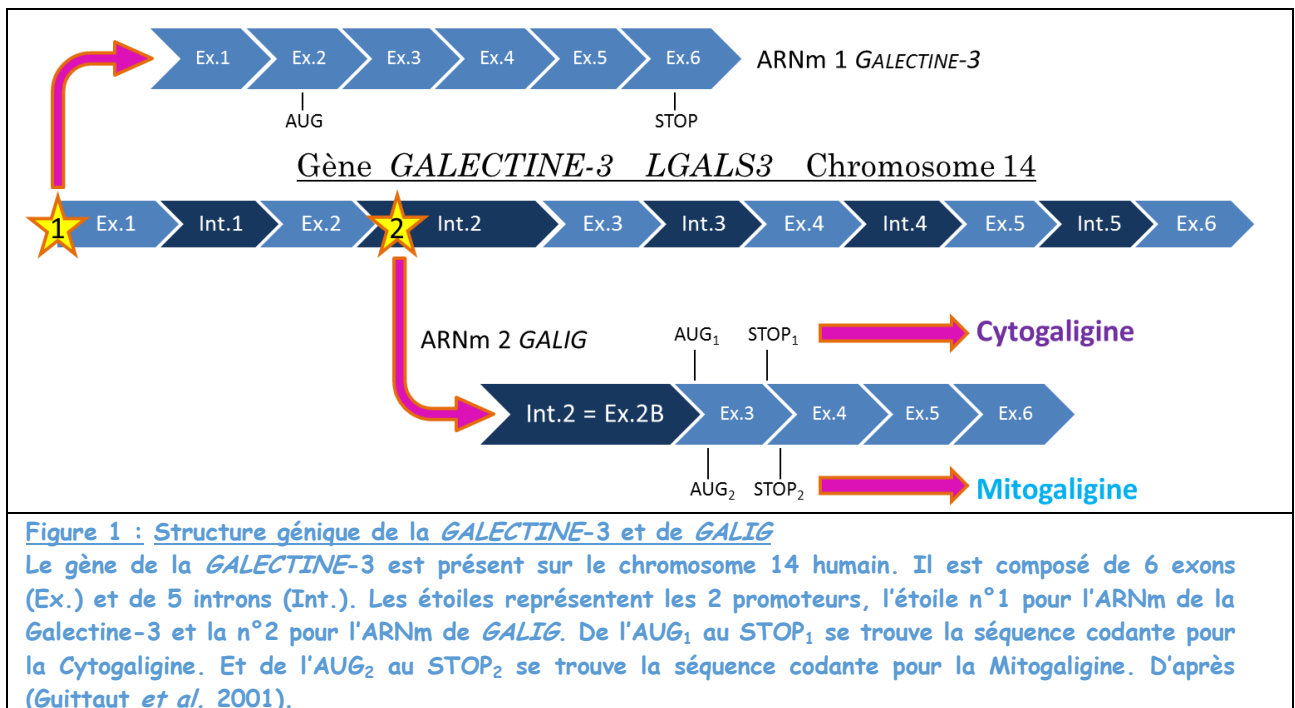
Introduction

Introduction 1^{re} partie : *GALIG* en conditions physiologiques

« normales »

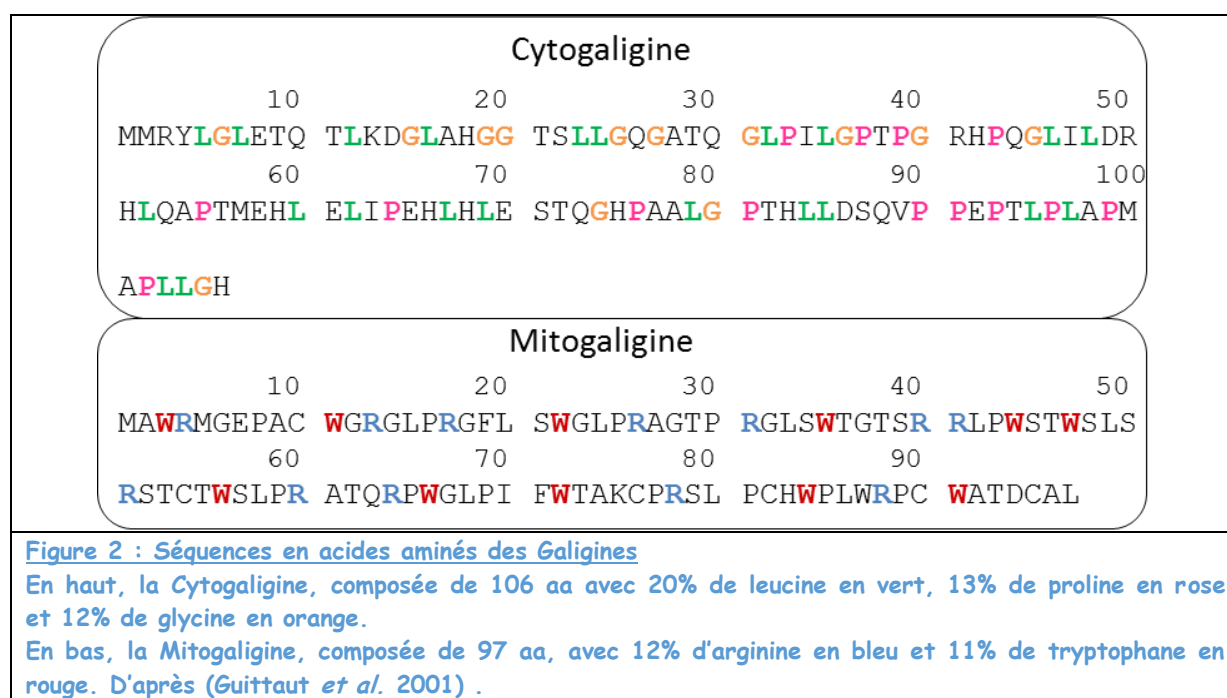
I. Le gène *GALIG* :

Un des thèmes de recherche de l'équipe Biologie Cellulaire, Cible Moléculaire, et Thérapie Innovante du Centre de Biophysique Moléculaire concerne un gène particulier, le gène *GALIG*, pour *GALECTIN-3 Internal Gene*. Le gène de la *GALECTINE-3* (*LGALS3*) localisé sur le chromosome 14 humain, possède, dans son **deuxième intron**, des séquences consensus spécifiques de facteurs de transcription de cellules eucaryotes, dont un site de liaison de la protéine p53. La transfection d'un plasmide contenant cette séquence promotrice potentielle, en amont de la séquence de la luciférase, a permis de montrer que ce **promoteur était actif**, permettant donc la transcription d'un ARNm. C'est cet ARNm qui a été appelé *GALIG*. L'activité de ce promoteur peut être drastiquement diminuée lorsque le gène p53 est cotransfecté, (Raimond *et al.* 1995). Ce **promoteur interne à l'intron 2** permet donc la transcription d'un **second ARNm**, l'ARNm de *GALIG* (Figure 1).



Cet ARNm de *GALIG* va pouvoir être traduit en **deux protéines distinctes**, les **Galigines**, via 2 cadres de lecture différents et chevauchants. Cette structure génique particulière permet donc de produire 3 protéines de structures distinctes, en utilisant 3

cadres de lecture différents et chevauchants (Guittaut *et al.* 2001). A cette date, très peu de gènes ayant une telle structure étaient connus, on en connaît beaucoup plus à l'heure actuelle et la question de l'expression d'ORF alternatifs à « grande échelle » est posée (Mouilleron, Delcourt, et Roucou 2016). Les Galigines ne présentent aucune homologie de séquence avec des protéines connues. La **Cytogaligine** est une protéine de **106 acides aminés** (aa), très riche en leucines (20%), prolines (13%) et glycines (12%) (Figure 2). Sa localisation cellulaire principale est le **cytosol**, mais elle est également retrouvée dans le noyau et la mitochondrie. La **Mitogaligine** est une protéine, de **97 aa**. Elle est très hydrophobe du fait de la présence des résidus tryptophane (11%) et elle est chargée positivement (12 résidus arginine contenus dans sa séquence soit 12% des acides aminés) (Guittaut *et al.* 2001).



Les études d'expression de l'ARNm *GALIG* ont montré qu'il était exprimé faiblement dans l'estomac, les testicules et plus fortement dans le cœur, le muscle et le placenta. Il a aussi été montré que son **expression est plus élevée dans les leucocytes du sang périphérique** que dans les **cellules immatures de la moelle osseuse (MO)**, suggérant une implication de *GALIG* dans la **différenciation cellulaire hématopoïétique** (cf. 1^{re} partie II.B, p. 14). Ces différences d'expressions tissulaires montrent que le gène *GALIG* est **hautement régulé** (Guittaut *et al.* 2001). De plus, il a été montré que les **protéines issues du gène *GALIG*** induisaient une **mort cellulaire** (Mollet *et al.* 2013) (cf.

1^{re} partie II.A.2.e, p. 13), et interagissaient avec plusieurs **protéines impliquées dans les systèmes de recyclage cellulaire** (cf. 1^{re} partie III.C, p. 43).

II. GALIG, apoptose et différenciation cellulaire :

A. Apoptose

Le terme d'**apoptose** (Kerr, Wyllie, et Currie 1972) a été défini pour la première fois en 1972. L'apoptose est définie comme étant une **mort cellulaire dite « silencieuse »**, par opposition à la mort par nécrose, car elle induit une mort cellulaire sans inflammation. La cellule apoptotique peut être caractérisée par divers **changements morphologiques** (contraction cellulaire, formation de corps apoptotiques, condensation de la chromatine) **et moléculaires** (activation de cascades enzymatiques conduisant à la fragmentation de l'ADN, à la dégradation de protéines intracellulaires, à l'exposition extracellulaire de phosphatidylsérines...). C'est d'ailleurs en partie grâce à cette redistribution de phosphatidylsérines (PS) du feuillet interne vers le feuillet externe de la membrane plasmique (Martin *et al.* 1995) que les cellules phagocytaires, telles que les macrophages, peuvent reconnaître les cellules apoptotiques, et ainsi les phagocyter avant toutes ruptures membranaires qui conduiraient à une inflammation locale, suite à un déversement du contenu cellulaire dans le milieu extracellulaire (Kerr, Wyllie, et Currie 1972; Marchetti 2005). Ces résidus PS exposés à la surface des cellules apoptotiques sont utilisés comme marqueurs d'apoptose. Leur présence peut être révélée par l'utilisation d'Annexine V qui se lie avec une forte affinité à ces PS.

L'apoptose est un processus très conservé, tant du point de vue biologique que génétique, du ver aux mammifères. C'est un phénomène biologique essentiel à l'organisme, notamment lors du développement embryonnaire (Ellis et Horvitz 1986) (Hengartner et Robert Horvitz 1994) ainsi que pour le contrôle de l'homéostasie cellulaire. L'étude de l'apoptose pendant le développement du ver *Caenorhabditis elegans* a permis de mettre en évidence à ce jour 11 gènes qui définissent ce programme de mort cellulaire. Trois de ces 11 gènes jouent un rôle crucial au cours de cette mort cellulaire programmée (MCP) : les gènes *ced-3* et *ced-4* sont essentiels à la mort des 131 cellules qui doivent mourir pendant le développement embryonnaire de *C.elegans*. Le gène *ced-9* est requis pour empêcher la MCP. En effet, une surexpression de ce gène ou une

mutation de type gain de fonction entraîne une survie de la cellule (Hengartner et Robert Horvitz 1994).

1) Partenaires moléculaires :

L'apoptose peut être **activée par 2 voies** : la **voie intrinsèque mitochondriale** et la **voie extrinsèque** (cf. 1^{re} partie II.2, p. 8). L'activation de ces 2 voies va conduire à l'activation d'une **cascade d'enzymes spécifiques, les caspases** (cf. 1^{re} partie II.A.2, p. 7). Ces protéases vont activer ou dégrader par clivage protéolytique plus d'une centaine de substrats impliqués dans le contrôle de la survie cellulaire (Thornberry et Lazebnik 1998). L'apoptose doit donc être, de ce fait, une fonction très étroitement **régulée** : c'est notamment le rôle d'une famille de protéines, les **protéines de la famille Bcl-2** (cf. 1^{re} partie II.A.a, p. 4), qui comprend aussi bien des membres favorisant la survie cellulaire (anti-apoptotique) que des membres favorisant la mort (pro-apoptotique). Tout déséquilibre d'expression de ces protéines va donc entraîner une survie ou une mort non souhaitée de la cellule (Adams et Cory 1998). L'apoptose étant un des mécanismes en lien avec mon sujet de thèse, je vais donc vous en présenter les principaux points.

a) Les protéines de la famille Bcl-2 :

La protéine **Bcl-2**, pour B-cell lymphoma 2, a été nommée ainsi car il s'agit de la **deuxième** molécule découverte dans le **lymphome** folliculaire à **cellules B**. Ces cellules B ou lymphocytes B (L_B) sont les cellules immunitaires responsables de la production des immunoglobulines (Ig). La grande diversité du répertoire d'anticorps produits par les cellules B repose sur des réarrangements chromosomiques obtenus notamment par recombinaison génique (Hozumi et Tonegawa 1976). Ce fort taux de recombinaison génique engendre parfois des **aberrations chromosomiques**, comme des **translocations**. C'est ainsi qu'une translocation entre les chromosomes 14 et 18 t(14;18) est retrouvée dans environ **90% des lymphomes folliculaires** à cellules B. Elle fusionne le gène *BCL-2* au gène des Ig, engendrant la production d'une protéine chimère (Tsujimoto *et al.* 1984; Cleary, Smith, et Sklar 1986). Le gène ***BCL-2-Ig*** est transcrit à des taux très élevés, ce qui s'explique par le fait que le gène *BCL-2* se retrouve placé sous le contrôle de la zone de régulation d'expression des Ig. Et ce nouvel environnement chromosomique permet de passer outre les phénomènes de **régulation propre à Bcl-2**, en lui imposant une expression constitutive, initialement propre aux Ig dans les L_B . Ce taux élevé de Bcl-

2-Ig, sans mécanisme possible de régulation, ainsi que d'autres facteurs permettent donc une **survie cellulaire accrue** et favorisent la **prolifération de ces cellules tumorales** (Cory et Adams 2002).

La famille des protéines Bcl-2 regroupe un ensemble de protéines présentant des homologies de séquences avec Bcl-2, des **domaines BH** (Bcl-2 homology) (Figure 3). On peut les classer en 3 groupes : les membres anti-apoptotiques, les membres pro-apoptotiques et les membres « **BH3 seulement** » (**BH3 only**). Les membres **pro-apoptotiques** et **anti-apoptotiques** de la famille Bcl-2 peuvent s'hétérodimériser, notamment via leurs domaines BH1, BH2, et BH3. Toutes ces protéines contiennent au moins un **domaine BH**, et certaines possèdent également un **domaine d'ancrage à la membrane**, qui leur permet de s'insérer dans toutes les membranes cellulaires (Adams et Cory 1998).

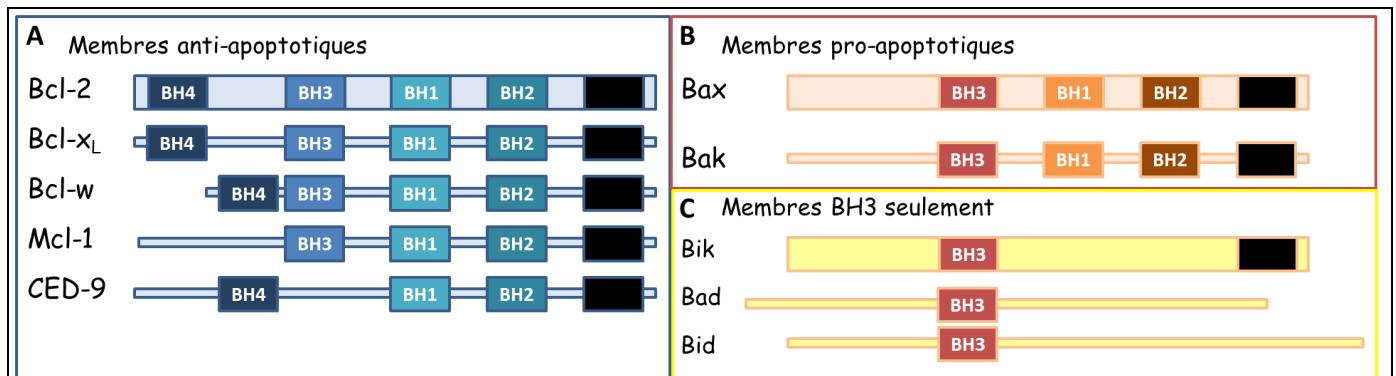


Figure 3 : Principaux membres de la famille Bcl-2

Les 3 groupes de la famille Bcl-2 : A, les membres anti-apoptotiques (qui conservent les domaines BH1 à BH4). B, les membres pro-apoptotiques (qui conservent les domaines BH1 à BH3). C, les membres BH3 seulement (qui ne contiennent que le domaine BH3). Les rectangles BH1 à BH4 représentent les domaines BH conservés entre les différents membres et les rectangles noirs indiquent le domaine d'ancrage à la membrane. Adapté d'après (Cory et Adams 2002).

Le groupe des protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2 inclut Bak (Bcl-2 homologous antagonist killer) et Bax (Bcl-2 associated protein X), contenant les domaines BH1 à BH3. Ces protéines peuvent former un **pore de transition de perméabilité mitochondriale** qui induira le **relargage du cytochrome c** (cf. 1^{re} partie II.2.a, p. 9), ainsi que d'autres molécules mitochondriales telles que SMAC/DIABLO (Second Mitochondrial Activator of Caspases/Direct IAP Binding Protein with Low pI), AIF (Apoptosis Inducing Factor), endonucléase G, OMI/HTRA2 (Serine protease HTRA2, mitochondrial) favorisant ainsi la mort cellulaire.

La famille des protéines « BH3 seulement » regroupe plusieurs protéines (Figure 3) comme Bik, Bad, Bid, (Noxa et Puma non représentées). Ces protéines peuvent **renforcer l'activité de Bax ou Bak**, en contribuant à la formation du pore de transition de perméabilité mitochondriale (Martinou et Green 2001), ou en rentrant en **compétition avec l'hétérodimère Mcl-1/(Bak ou Bax)**. En effet, en s'associant à Mcl-1, elles dissocient cet hétérodimère et bloquent son activité anti-apoptotique qui était due à la séquestration de Bax ou Bak par Mcl-1 (Thomas, Lam, et Edwards 2010).

Le groupe des protéines anti-apoptotiques comprend la protéine Bcl-2 ainsi que les protéines Bcl-x_L (B-cell lymphoma extra large), Bcl-W/Bcl2-l2 (Bcl2-like protein 2), Mcl-1 (Myeloid cell leukemia 1) présents chez les mammifères et la protéine ced-9 chez *C.elegans*. Ces protéines conduisent indirectement ou directement à la survie de la cellule, notamment en permettant le **maintien de l'intégrité de la membrane mitochondriale**. Bcl-2 et Bcl-x_L préviennent notamment la mort cellulaire par séquestration des membres « BH3 seulement » (Cheng *et al.* 2001).

La protéine **Mcl-1**, membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2, comprend 3 domaines BH. Cette protéine diffère des autres membres Bcl-2 par son long fragment N-terminal : sa taille totale, 350 aa, est plus grande que celle des autres membres anti-apoptotiques comme Bcl-x_L et Bcl-2 qui ont une taille de 233 aa et 239 aa, respectivement. Ce fragment comprend plusieurs sites de modifications post-traductionnelles comme des sites d'ubiquitination, de phosphorylation et de clivage par les caspases. Cette protéine a été initialement décrite comme étant très rapidement exprimée au cours de la différenciation de la lignée myéloïde ML-1 (Myeloid Leukemia 1) en macrophage (Thomas, Lam, et Edwards 2010). Sa surexpression a été rapportée dans plusieurs types de cancers dont les cancers hématologiques. Elle est également impliquée dans la chimiorésistance des composés ciblant la famille Bcl-2 (Thomas, Lam, et Edwards 2010). Mcl-1 inhibe l'apoptose par le ciblage et la séquestration des protéines pro-apoptotiques Bax et Bak, (Thomas, Lam, et Edwards 2010).

En conclusion, les **protéines de la famille Bcl-2** permettent de **favoriser soit la mort cellulaire, soit la survie cellulaire**, et cet équilibre entre mort et survie est donc extrêmement régulé. C'est pourquoi toute dérégulation d'expression de ces protéines peut avoir pour conséquences diverses pathologies, par exemple de type

dégénératif si trop de mort cellulaire est initiée, ou de type cancer si la survie cellulaire devient irrépressible (Marchetti 2005; Green et Evan 2002; Cory et Adams 2002; Adams et Cory 1998). En conséquence, **toute molécule capable d'influer cet équilibre** est susceptible d'être une **cible thérapeutique**.

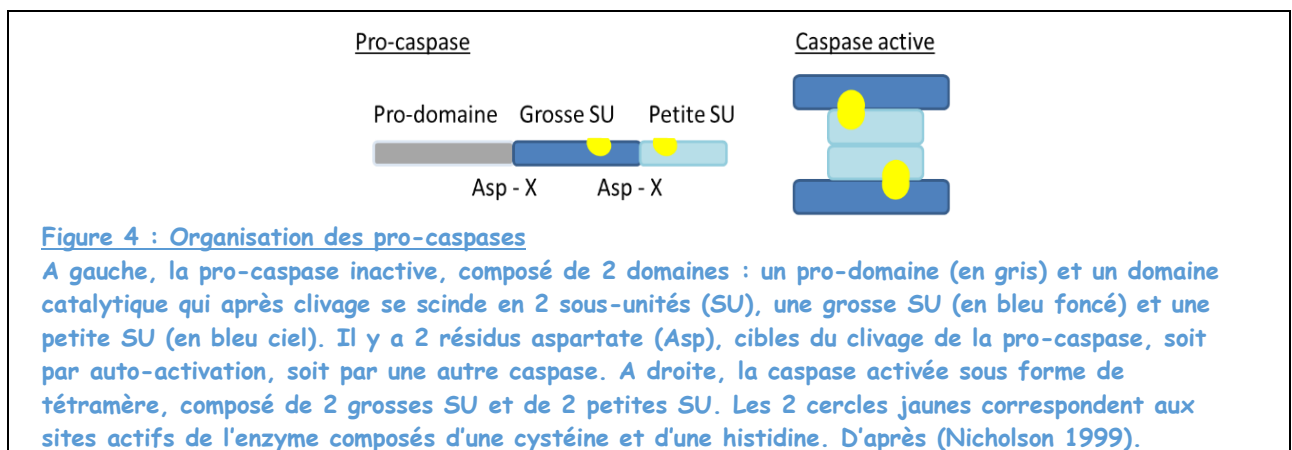
b) Les caspases : bras armé de l'apoptose :

Les **caspases** ou Cysteinyl **aspartate** **proteases**, regroupent une famille de protéases au nombre de 13 à ce jour chez l'homme (Shalini *et al.* 2015). Elles reconnaissent des séquences peptidiques consensus, qu'elles **hydrolysent** en C-terminal d'un résidu **aspartate**. Les sites actifs des caspases sont typiques des cystéine protéases, avec une **cystéine** et une histidine qui sont conservées chez toutes les caspases (Nicholson 1999). Les caspases sont exprimées constitutivement dans le cytosol sous forme de **pro-enzymes ou zymogènes**, précurseurs inactifs de hauts poids moléculaires (30 à 50 kDa), **appelés pro-caspases** qui sont activées par coupure protéolytique (Figure 4). Ces caspases sont divisées en **2 groupes** : les caspases **inflammatoires** (caspases -1, -4, -5 et -12) et les caspases **apoptotiques** (-2, -3, -6, -7, -8, -9 et -10). On retrouve également les caspases-14 et -16 qui sont dites « hors groupe » (Shalini *et al.* 2015). Les caspases apoptotiques sont également classées selon leur positionnement dans la transduction du signal apoptotique: on distingue ainsi les **caspases initiatrices** de celles dites **effectrices**. Alors que les premières contribuent à l'initiation de la cascade apoptotique, les secondes conduisent au démantèlement final de la cellule par clivage de divers substrats essentiels à la survie cellulaire, comme les protéines impliquées dans l'architecture cellulaire, l'actine, la gelsoline et les lamines nucléaires (Marchetti 2005). Une autre cible majeure des caspases effectrices est la protéine de réparation de l'ADN, PARP (Poly(ADP-ribose) polymérase). Une autre conséquence de l'activation de ces caspases est le clivage de protéines inhibitrices de l'apoptose, comme la protéine ICAD/DDF45 (Inhibitor of Caspase-Activated DNase/DNA Fragmentation Factor 45), qui se lie dans le cytosol à l'endonucléase CAD/DFF40 (caspase-activated DNase/DNA fragmentation factor 40), responsable d'une fragmentation oligonucléosomique de stade II, de l'ADN (Marchetti 2005).

Les caspases sont composées de **2 domaines** (Figure 4) : a) un **pro-domaine** peu conservé qui contient uniquement pour les caspases initiatrices un domaine **CARD** (Caspase

Recruitment Domain) ou un domaine **DED** (Death Effector Domain) permettant leur recrutement et leur activation. Ce pro-domaine est éliminé lors de la maturation protéolytique, b) un domaine catalytique qui génèrera après clivage, une **grosse** et une **petite sous-unités** (SU) ayant des séquences très conservées au sein des caspases. Les clivages par la caspase elle-même ou par une autre caspase s'effectuent en C-terminal de résidus aspartate. Les sous-unités libérées s'assembleront sous forme de **tétramère** pour former une **caspase active** possédant **2 sites actifs catalytiques** (Nicholson 1999).

L'activation des caspases initiateuses se fait par agrégation et auto-activation via différents complexes (cf. 1^{re} partie I.A.2, p. 8).



L'activation des caspases peut être **inhibée** par une famille de molécules, les **IAP** (inhibitor of apoptosis proteins) : ces protéines cytosoliques permettent d'empêcher l'**activation accidentelle ou spontanée des caspases**. Ces molécules peuvent inhiber l'activation des caspases de façon directe, en induisant la dégradation du complexe d'activation, ou de façon indirecte en augmentant les voies de survie cellulaire (Marchetti 2005). Mais ces IAP peuvent être neutralisées, levant donc l'inhibition des caspases, par le relargage depuis la mitochondrie de **SMAC/DIABLO** et/ou **OMI/HTRA2** (Serine protease HTRA2, mitochondrial), dans le cytosol (Marchetti 2005). Ces protéines vont pouvoir interagir avec les IAP et les empêcher, par inhibition compétitive, d'interagir avec les caspases. Ces dernières vont donc pouvoir être activées, ce qui va conduire la cellule à la mort (Salvesen et Duckett 2002).

2) Les deux voies d'activation de l'apoptose :

L'apoptose peut être activée par 2 voies distinctes, la **voie intrinsèque mitochondriale** et la **voie extrinsèque** (Marchetti 2005). Mais, même si le mode d'initiation est différent, l'issue sera la même puisque, dans les 2 cas, le processus conduit à l'activation des caspases effectrices. De plus, ces 2 voies distinctes peuvent communiquer entre elles (Figure 5).

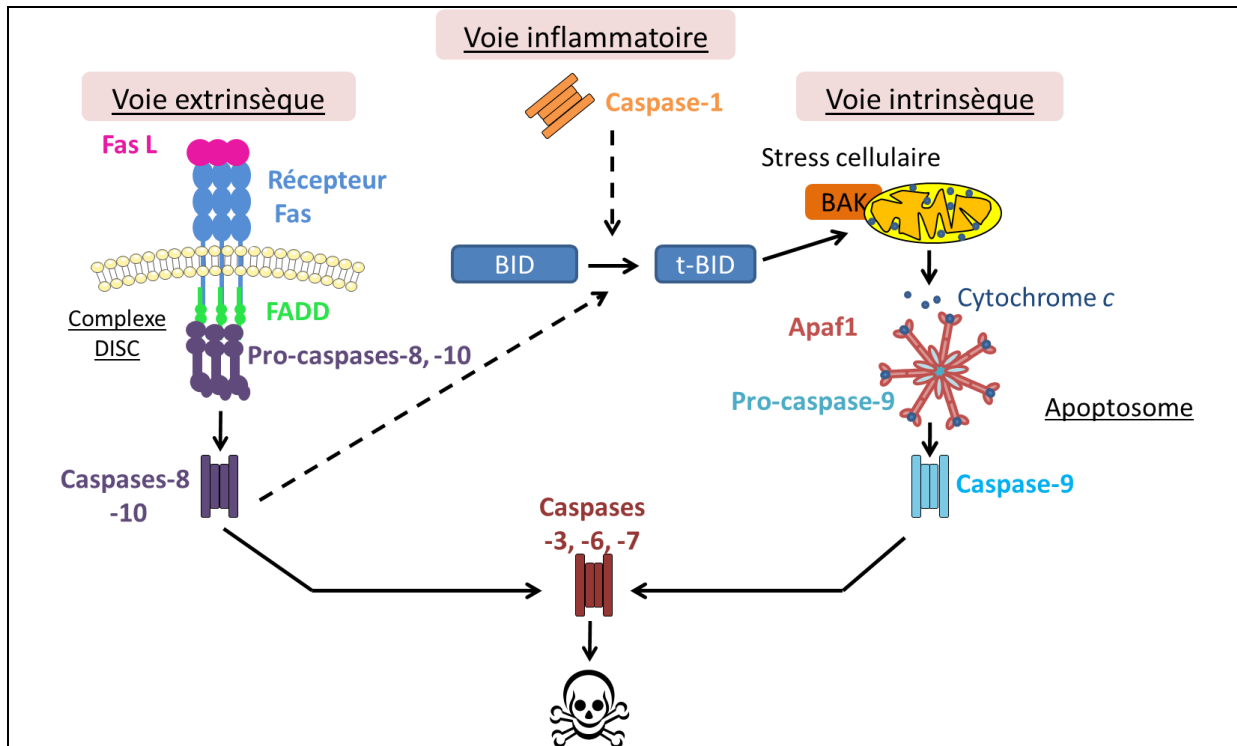
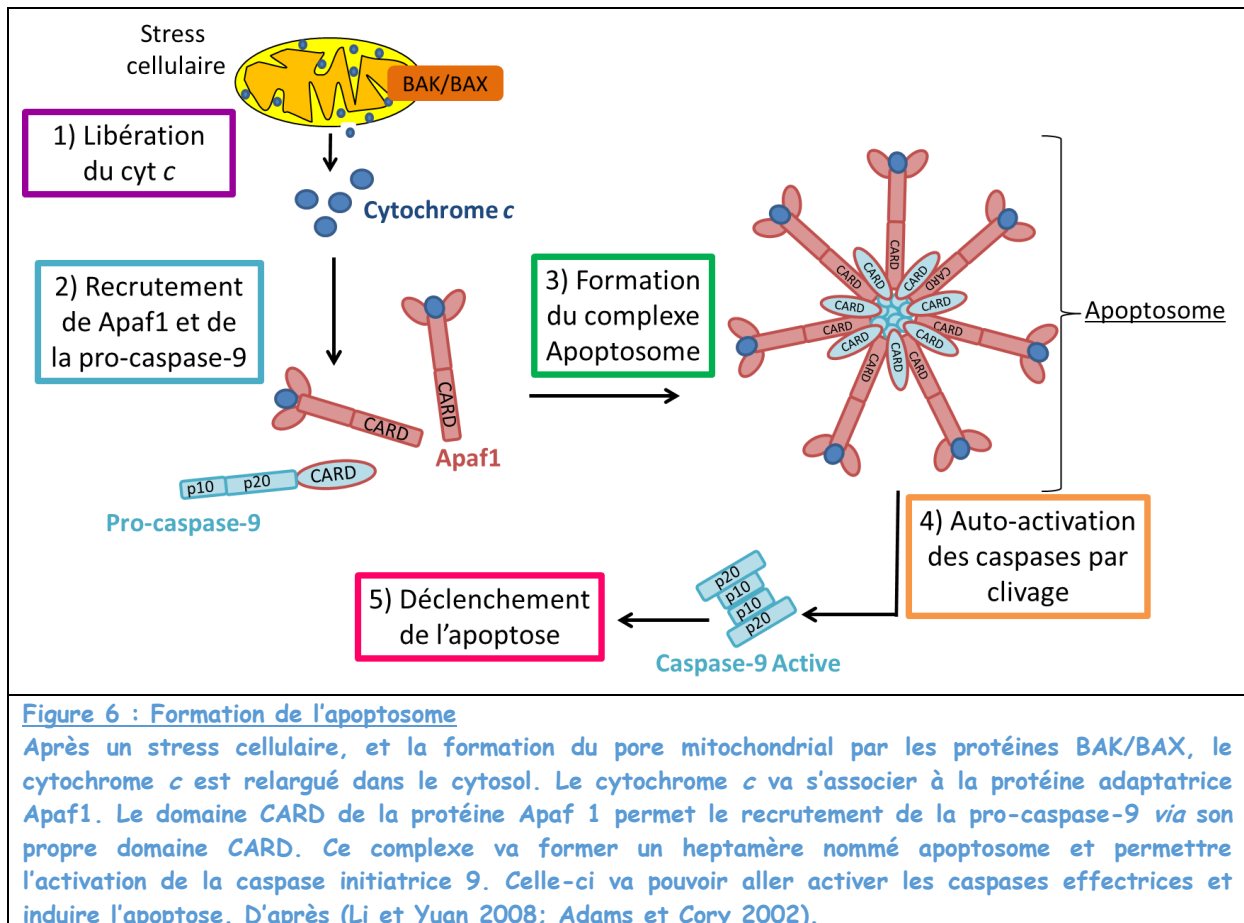


Figure 5 : La voie extrinsèque et la voie intrinsèque mitochondriale d'activation de l'apoptose
 A gauche, la voie extrinsèque : Après fixation du Fas-L (ligand) sur le récepteur Fas, celui-ci s'organise en trimère et recrute la protéine adaptatrice FADD (Fas-Associated Death Domain) puis les pro-caspases-8 et -10. Cette association multi-protéique est appelée le DISC (Death-Inducing Signaling Complex). Ce complexe induit un auto-clivage des pro-caspases-8 et -10. Ces caspases actives vont pouvoir activer les caspases-3, -6 et -7, qui cliveront les substrats essentiels à la vie.
 A droite, la voie intrinsèque mitochondriale : Suite à un stress cellulaire, la protéine pro-apoptotique Bak va induire la formation d'un pore mitochondrial, et entraîner la sortie du cytochrome c. Celui-ci va s'associer à la protéine Apaf-1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1) et à la pro-caspase-9 pour former le complexe de l'apoptosome. Ce complexe va permettre l'auto-activation de la caspase-9. Sous cette nouvelle forme, la caspase-9 va pouvoir activer les caspases-3, -6 et -7 qui vont cliver les substrats essentiels à la survie cellulaire. Un lien entre ces 2 voies peut être fait via la caspase-8, qui peut cliver en BID, qui va déstabiliser la mitochondrie. La voie inflammatoire peut aussi communiquer avec la voie intrinsèque via la caspase-1. Adapté d'après (Marchetti 2005; Denes, Lopez-Castejon, et Brough 2012)

a) La voie intrinsèque :

La **voie intrinsèque mitochondriale** est la voie cellulaire **interne** qui permet d'activer la mort cellulaire (Figure 5). Cette voie est activée à la **suite d'un stress cellulaire** qui peut être de plusieurs types comme une **perte du potentiel mitochondrial**, une **exposition aux rayonnements** ou un **sevrage en facteurs de croissance** (Marchetti

2005). Ce stress va induire l'activation de **Bak**, qui pourra alors s'homodimériser ou s'hétérodimériser avec **Bax**. Ce complexe va pouvoir former un pore dans la membrane mitochondriale externe et engendrer une **fuite du cytochrome c dans le cytosol** (Jourdain et Martinou 2009). Le cytochrome *c* libéré, depuis l'espace inter-membranaire dans le cytosol, va s'associer à la molécule Apaf-1 (Apoptotic Peptidase Activating Factor 1), et engendrer un changement **conformationnel de Apaf-1**. Cette forme dite « ouverte » va lui permettre ainsi **d'exposer son domaine CARD** et de **recruter la pro-caspase-9** pour former **l'apoptosome** (Adams et Cory 2002; - Li et Yuan 2008) (Figure 6). Cette agrégation de la pro-caspase-9 conduit à son **auto-activation**. La caspase initiatrice 9 mature va pouvoir alors activer les **caspases effectrices-3, -6 et -7** qui vont cliver les substrats essentiels à la survie cellulaire et donc induire la mort de la cellule (Marchetti 2005).



b) La voie extrinsèque :

La voie extrinsèque d'activation de l'apoptose (Figure 5) est activée à la suite de la **fixation du Fas-Ligand** (ligand appartenant à la superfamille du TNF) sur son **récepteur Fas**, et cette fixation va induire la **trimérisation de Fas** (Marchetti 2005).

Fas possède un domaine de mort (DD : Death Domain), au niveau de sa partie cytosolique, qui va permettre le **recrutement de la protéine adaptatrice FADD** (Fas-Associated Death Domain), par des interactions homotypiques entre leurs deux domaines DD respectifs. La protéine adaptatrice FADD possède également un domaine effecteur de mort DED qui s'associe au domaine DED situé sur la partie amino-terminale des pro-caspases-8 et/ou -10. Cette association de molécules forme le **DISC** (Death-Inducing Signaling Complex), et permet l'auto-activation des caspases initiatrices -8 et/ou -10 (Figure 7). Ces caspases matures vont pouvoir ensuite activer les **caspases effectrices -3, -6 et -7**, qui cliveront leurs substrats, par ailleurs essentiels à la survie cellulaire, et induiront de cette façon la mort cellulaire (-Li et Yuan 2008) (Marchetti 2005).

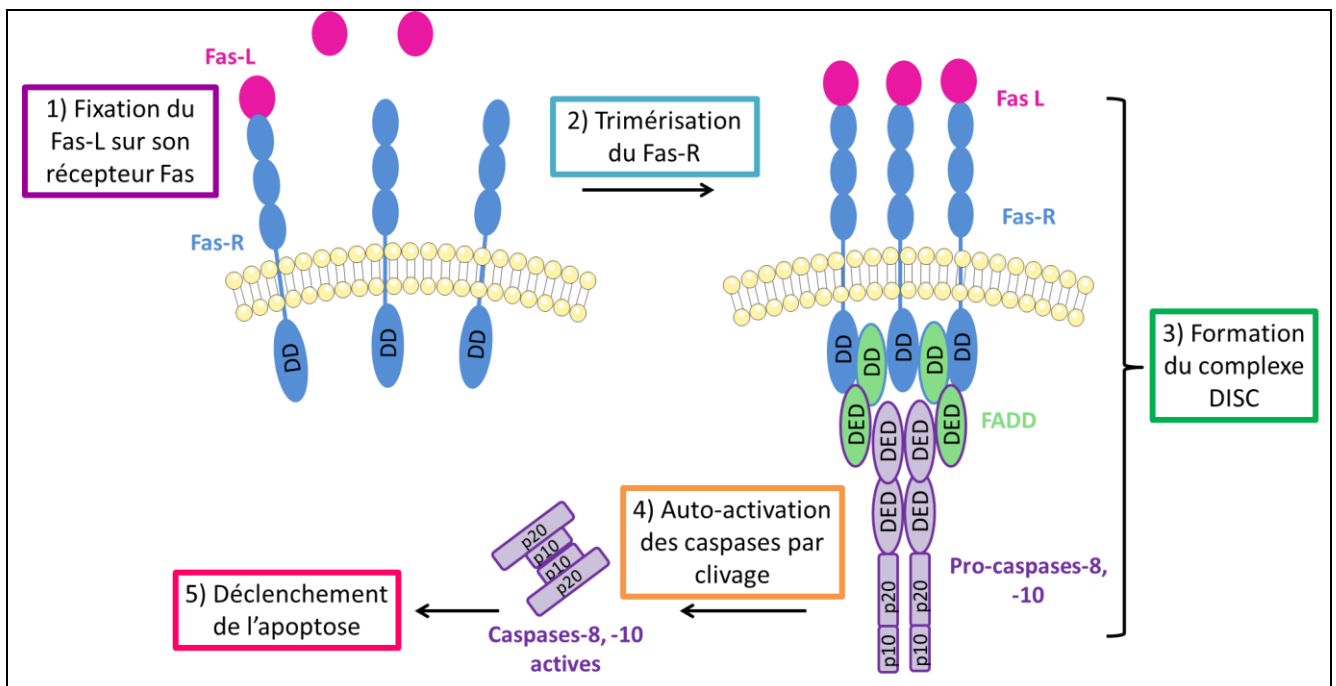


Figure 7 : Formation du complexe DISC (Death-Inducing Signaling Complex)

Le signal de mort cellulaire est induit par le Fas-Ligand, qui en se fixant sur son récepteur Fas va induire la trimérisation de Fas. La queue cytosolique du récepteur Fas possède un domaine de mort (DD), et sa trimérisation va induire un recrutement de plusieurs protéines adaptatrices FADD (Fas-Associated Death Domain) possédant aussi un domaine DD. Cette protéine adaptatrice FADD possède également un domaine effecteur de mort (DED) qui va lui permettre de recruter les pro-caspases-8 et/ou -10 via un de leur domaine DED, ce qui conduira à leur auto-activation. La trimérisation du récepteur Fas, et le recrutement de FADD et des pro-caspases forment le complexe DISC. Les caspases initiatrices -8 et -10 matures vont pouvoir alors activer les caspases effectrices. D'après (Li et Yuan 2008; Marchetti 2005)

Le récepteur Fas fait partie de la **superfamille des récepteurs de mort (DR : Death Receptor)**. Ce sont des protéines transmembranaires, caractérisées par la présence multiple de zones riches en cystéine dans leur domaine extracellulaire, et d'un

domaine d'interaction protéine-protéine *via* leur domaine de mort (DD) dans leur domaine intracellulaire. Ces récepteurs fonctionnent comme des senseurs cellulaires de surface pour détecter **des signaux de danger extracellulaire**. Cette famille comprend notamment le récepteur TNF-R1 (Tumor Necrosis Factor Receptor 1), le récepteur Fas (DR2), le récepteur TRAIL-R1, 2 (TNF- Related Apoptosis Inducing Ligand Receptor 1), et les récepteurs DR3 et DR6 (Marchetti 2005), qui, par un processus intracellulaire identique, sont également capables de déclencher l'apoptose. Cette famille de récepteurs peut aussi entraîner une signalisation qui va pouvoir favoriser la survie et la prolifération cellulaire (Declercq, Vanden Berghe, et Vandenabeele 2009; Wajant et Scheurich 2011).

c) Communication entre les voies :

L'activation de l'apoptose ne suit pas toujours une voie aussi linéaire. En effet, les **2 voies d'activation intrinsèque mitochondriale et extrinsèque** peuvent non seulement **communiquer entre elles**, mais également communiquer avec la **voie inflammatoire**, respectivement *via* la **caspase-8** et la **caspase-1** (Figure 5). Ces 2 caspases, une fois activées, vont pouvoir cliver la protéine **Bid**, qui aboutira à sa forme tronquée (**tBid**). La **protéine tBid** va interagir avec **Bax** dans le cytosol ou à la surface mitochondriale, ce qui va induire un changement conformationnel de Bax, lui permettant de s'intégrer dans la membrane mitochondriale externe. Elle va s'oligomériser et former un canal par lequel seront relargués le **cytochrome c** et les autres facteurs pro-apoptotiques **SMAC/DIABLO** (Denes, Lopez-Castejon, et Brough 2012; Martinou et Green 2001). La protéine **tBid** peut aussi s'insérer dans la membrane mitochondriale où elle va pouvoir activer **Bak**, qui est quant à elle constitutivement ancrée à la membrane. Ceci induira un changement conformationnel de Bak, puis son oligomérisation et la perméabilisation de la membrane mitochondriale (Martinou et Green 2001).

d) Autres formes de mort cellulaire :

L'apoptose n'est pas la seule forme de mort cellulaire, d'autres formes ont été décrites dans la littérature comme la nécrose, la pyroptose, la paraptose et la mort cellulaire autophagique (Sperandio, de Belle, et Bredesen 2000; Esteve et Knecht 2011; Denes, Lopez-Castejon, et Brough 2012). Ces morts cellulaires ont pour conséquence soit une rupture de la membrane cellulaire avec le déversement de contenu

inflammatoire dans le milieu extracellulaire, soit la formation de corps apoptotiques. Elles peuvent utiliser des mécanismes communs, comme l'activation de la caspase-9 indépendamment d'Apaf-1, avec la caspase-3 inactive et résistante aux inhibiteurs des caspases (Sperandio, de Belle, et Bredesen 2000), ou l'activation de la caspase-1 via l'inflammasome (Denes, Lopez-Castejon, et Brough 2012). L'autophagie également lorsqu'elle est excessive, peut aboutir à un point de non-retour et conduire la cellule à la mort (Esteve et Knecht 2011).

e) *GALIG, un inducteur de mort cellulaire particulière :*

In vitro, la surexpression par **transfection du gène *GALIG***, exprimant à la fois la **Mitogaligine** et la **Cytogaligine**, induit une mort cellulaire de type apoptose, avec une contraction cellulaire, une condensation mitochondriale et nucléaire, et un relargage du cytochrome c (cyt c) dans le cytoplasme (Duneau *et al.* 2005).

De plus, les cellules transfectées par *GALIG* montrent une membrane cellulaire intacte, mais positive à l'Annexine-V (Duneau *et al.* 2005), ce qui montre une translocation des phosphatidylsérines de la couche interne vers la couche externe de la membrane cytosolique, un des principaux changements lors de la mort cellulaire programmée (Martin *et al.* 1995). Les cellules exprimant la Mitogaligine au niveau mitochondrial ne montrent pas d'activation de la caspase-3. La protéine PARP n'est pas clivée et aucune fragmentation de l'ADN n'est détectée. La localisation cellulaire de la Mitogaligine, majoritairement mitochondriale, peut suggérer que l'effet cytotoxique, dû au relargage du cytochrome c, serait une conséquence d'une altération de la membrane mitochondriale. Des délétions progressives du côté N-terminal ou C-terminal de la Mitogaligine, fusionnée avec la protéine EGFP, ont permis de montrer, après transfection, que le signal d'adressage mitochondrial était situé dans la région centrale de la protéine (aa 31-54). En effet, les fragments protéiques 1-38 ou 54-97 fusionnés avec la protéine EGFP ont une localisation cytosolique, alors que les peptides 1-54 et 31-54 ciblent les mitochondries (Duneau *et al.* 2005). La séquence d'adressage est donc située dans la zone 31-54. Des peptides dérivés de ces séquences de la Mitogaligine ont été incubés avec des mitochondries isolées. Le peptide correspondant à la partie 35-53 de la Mitogaligine, incluant donc le signal d'adressage mitochondrial, induit un fort relargage du cytochrome c, le peptide 12-34 induit un relargage moins

important. La fixation de la Mitogaligine à la mitochondrie induit donc un relargage du cytochrome *c* (Duneau *et al.* 2005). De plus, la Mitogaligine est chargée très positivement, car très riche en résidus arginine, 12%, (Figure 2, p. 2). En effet, il a été montré que cette protéine cible très efficacement les **cardiolipides**, des glycérophospholipides présents dans les membranes bactériennes et qui représentent 18% des molécules de la membrane interne mitochondriale des cellules eucaryotes. La Mitogaligine très cationique a une forte affinité pour le cardiolipide qui est très anionique. Enfin, le cardiolipide et ses précurseurs sont très concentrés aux jonctions entre les membranes interne et externe mitochondriales, ceci pourrait constituer un point d'ancrage pour la Mitogaligine (Gonzalez *et al.* 2007).

Toute molécule agissant sur **l'équilibre mort/survie**, possède une molécule antagoniste. Les produits du gène *GALIG* induisant une mort cellulaire, quelles protéines de la famille Bcl-2, permettent de contrecarrer cette mort ? La surexpression de Bcl-2, ne protège pas du relargage du cytochrome *c* induit par *GALIG*. Mais, la co-transfection de *GALIG* et *Bcl-X_L* permet de protéger la mort induite par les produits du gène *GALIG* en diminuant le relargage du cytochrome *c* (Duneau *et al.* 2005). De plus, la surexpression d'un autre membre de la famille Bcl-2, la protéine **Mcl-1**, permet aux cellules de survivre en co-surexprimant *GALIG*. En effet, 48 heures après la co-transfection avec *Mcl-1*, on observe un plus fort taux de survie cellulaire (Mollet *et al.* 2013). Les protéines Bcl-X_L et Mcl-1 permettent donc spécifiquement de prévenir de la mort cellulaire induite par *GALIG*. Beaucoup de cancers montrent une surexpression de Bcl-2, *GALIG* en induisant la mort même lors d'une surexpression de Bcl-2, pourrait être efficace sur ces cancers, en induisant l'apoptose par déséquilibre de la balance mort/survie dans ces cellules cancéreuses.

Le gène *GALIG* induit donc un type d'apoptose particulier, où toutes les caractéristiques de l'apoptose classique ne sont pas toutes observées.

B. La différenciation cellulaire ; une apoptose incomplète

Le gène *GALIG* est exprimé faiblement dans les cellules immatures de la moelle osseuse et plus fortement dans les cellules mononucléées sanguines matures. Cette variation d'expression peut suggérer que *GALIG* jouerait un **rôle dans la différenciation cellulaire**. Ceci a conduit l'équipe à étudier l'expression de *GALIG* au

cours de la myélopoïèse, et dans le cas pathologique d'un cancer de la moelle osseuse, la **Leucémie Aiguë Myéloïde (LAM)**, pathologie associée à un blocage de la différenciation cellulaire (cf. 2^e partie I, p. 48).

1) Hématopoïèse, Myélopoïèse :

L'hématopoïèse vient du grec *haímatos* « sang » et *poiésis* « création » : il s'agit du phénomène qui permet la fabrication de toutes les cellules sanguines et éléments figurés du sang, ce qui comprend les érythrocytes, les globules blancs (lymphocytes, monocytes, granulocytes...) et les plaquettes. Les **cellules sanguines** sont des cellules ayant des **durées de vie très différentes dans l'organisme** : cela peut aller de la décennie pour le lymphocyte mémoire, à environ **120 jours** pour le globule rouge et de quelques heures à **2, 3 jours** pour le polynucléaire neutrophile. La moelle osseuse est dans l'obligation de **fabriquer entre 10^{11} et 10^{13} nouvelles cellules sanguines par jour**. Ces nouvelles cellules sont produites depuis le stock de cellules souches, afin de maintenir l'homéostasie cellulaire, pour remplacer les cellules qui meurent par apoptose spontanée, arrivées à leur terme de vie.

⌘ Les cellules souches :

Les **cellules souches** sont des cellules qui ont la capacité à la fois de **s'auto-renouveler**, et de générer, par **différenciation**, **diverses cellules matures** dans un tissu donné. Par exemple, pour la production des cellules sanguines, c'est la **cellule souche hématopoïétique (HSC, Hematopoietic stem cell)** qui peut se différencier en toutes cellules sanguines, par plusieurs voies de différenciation, encore appelées lignages. Au cours du développement, l'hématopoïèse va se dérouler dans différents sites comme le sac vitellin, la région méso-aortique (près du cordon ombilical) et le foie fœtal, avant de s'établir définitivement dans la moelle osseuse chez l'adulte. Les HSC dépendent de leur environnement, appelé **niche**. Cette niche permet notamment la régulation de l'auto-renouvellement et de la différenciation des HSC. Comme l'hématopoïèse change de site au cours du développement, cette niche change aussi, afin de s'adapter aux besoins de l'organisme. Des études ont montré que la niche hématopoïétique adulte est composée principalement d'ostéoblastes, qui permettent de réguler l'état quiescent des HSC via la production de thrombopoïétine, et de cellules vasculaires qui permettent de contrôler la

migration des HSC via la chimiokine SDF-1 (Stromal Cell-Derived Factor 1 -1, ou CXCL12) (Orkin et Zon 2008).

Les **HSC** se classent en 2 populations (Figure 8), la cellule souche à capacité d'auto-renouvellement à long terme, et celle à court terme. Cette dernière va se différencier en progéniteur multipotent, qui va se différencier soit en **Progéniteur Myéloïde Commun** (CMP), soit en **Progéniteur Lymphoïde Commun** (CLP).

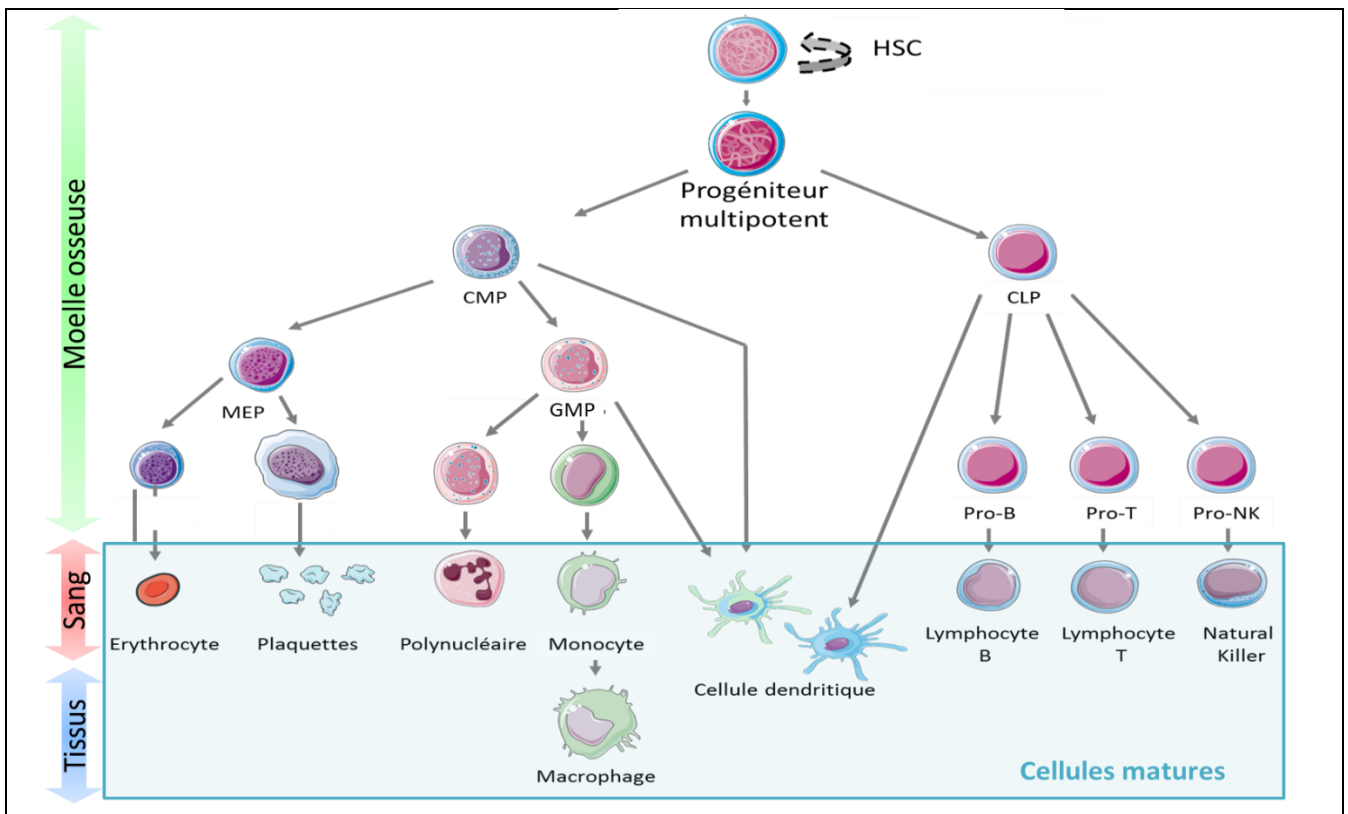


Figure 8 : Développement des cellules souches hématopoïétiques

Les cellules souches hématopoïétiques (HSC) pourront se différencier en progéniteurs multipotents. Ces progéniteurs donnent naissance aux Progéniteurs Lymphoïdes Communs (CLP) et aux Progéniteurs Myéloïdes Communs (CMP). Les CLP seront à l'origine des lymphocytes B, T et NK (Natural Killer). Les CMP vont se différencier en précurseurs mégacaryocytes/érythrocytes (MEP), qui donneront les érythrocytes et les plaquettes et en précurseurs granulocytes/macrophages (GMP), qui vont donner les polynucléaires et les monocytes/macrophages. Les CMP, les GMP et les CLP peuvent donner directement des cellules dendritiques. D'après (Reya *et al.* 2001; Orkin et Zon 2008).

Myélopoïèse :

L'axe de différenciation lymphoïde, depuis la **CPL** est nommé **lymphopoïèse**. Le progéniteur lymphoïde commun va pouvoir donner naissance aux pro-lymphocytes B et T (Pro-B, Pro-T), et aux pro-Natural Killer (Pro-NK) qui deviendront respectivement les **lymphocytes B, T et Natural Killer matures**. Le CLP peut aussi se différencier en

cellule dendritique lymphoïde. Cet axe ne sera pas développé car il n'est pas impliqué dans mon sujet d'étude.

L'axe de différenciation myéloïde, depuis la **CMP** est nommé **myélopoïèse**. C'est l'axe de différenciation développé au cours de ma thèse (Figure 8). Le progéniteur myéloïde commun va pouvoir se différencier selon 2 lignages, le lignage **Erythro-Plaquettaire**, en **MEP** (Mégacaryocyte Erythrocyte Précurseur) et le lignage **Granulo-Monocytaire**, en **GMP** (Granulocyte Macrophage Précurseur).

Le précurseur mégacaryocyte érythrocyte (MEP) peut se différencier en précurseur érythrocytaire qui va aboutir aux **érythrocytes**, ou en précurseur mégacaryocytaire qui va donner les **plaquettes** (thrombocytes).

Le précurseur granulocyte macrophage (GMP) peut se différencier en **polynucléaire (neutrophile, basophile et éosinophile)**, en cellule **dendritique myéloïde**, en **monocyte**, ce dernier pouvant se différencier en **macrophage**, lorsqu'il quitte le sang pour rejoindre les tissus.

Le précurseur myéloïde commun (CMP) peut aussi se différencier en cellule dendritique (Reya *et al.* 2001).

Les étapes de différenciation sont contrôlées par un ensemble de facteurs de transcription et de signaux extracellulaires, nécessaires à la différenciation vers le lignage donné (Orkin et Zon 2008).

Ces différentes cellules peuvent être **identifiées** via différents **caractères cytochimiques** et différents **marqueurs phénotypiques** de différenciation.

La myélopoïèse correspond donc à la production des cellules de la voie myéloïde comprenant les érythrocytes, les plaquettes, les polynucléaires, les macrophages et les cellules dendritiques myéloïdes, en partant du précurseur commun myéloïde. L'auto-renouvellement de ces cellules s'étendant sur une longue période de la vie, implique de très nombreuses divisions cellulaires ; elles ont donc plus d'opportunités que toutes autres cellules matures de l'organisme à accumuler des mutations. De plus, la machinerie cellulaire étant hautement activée, la tumorigenèse se trouve facilitée par rapport à celle de cellules matures (Reya *et al.* 2001). Bien que les cellules souches soient des cibles toutes définies pour la tumorigenèse, les cellules progénitrices peuvent aussi accumuler des mutations et devenir cancéreuses. Ces mutations peuvent donc toucher

tous les lignages de l'hématopoïèse, les différentes cellules souches et progéniteurs, donc des cellules ayant pris des voies et des degrés de différenciation variés. Ceci explique pourquoi les différents cancers de la moelle osseuse constituent un ensemble de maladies hétérogènes (Reya *et al.* 2001).

2) Les caspases essentielles à la différenciation :

Les caspases, comme décrit précédemment, ont un **rôle principal** dans **l'exécution de l'apoptose**, par le clivage des substrats essentiels à la vie et induisent donc la mort cellulaire. Bien que ceci soit paradoxal, plusieurs études ont montré que les caspases étaient également **essentiels au développement et à la survie de l'organisme** (Launay *et al.* 2005; Shalini *et al.* 2015). Elles interviennent par exemple pendant le **développement embryonnaire** du proencéphale, pendant la **prolifération, la migration et la différenciation neuronale**. Elles sont aussi nécessaires pour la **régénération tissulaire** chez le xénope, l'hydre ou les amphibiens (Shalini *et al.* 2015).

Ainsi les caspases actives sont nécessaires au **processus de différenciation** de plusieurs types cellulaires. En effet, cela a été bien décrit, notamment pour les différenciations avec énucléation, comme la différenciation des **érythrocytes** (Droin *et al.* 2008), des **kératinocytes** et des **cellules du cristallin** (Launay *et al.* 2005; Shalini *et al.* 2015), mais également au cours de la différenciation des cellules sanguines (Sordet *et al.* 2002; Rébé *et al.* 2007; Droin *et al.* 2008; Jacquel *et al.* 2012). Pour illustrer ce propos, 2 exemples distincts sont décrits ci-dessous, la différenciation dans la moelle osseuse des globules rouges et la différenciation du monocyte en macrophage.

Pendant la **différenciation érythrocytaire**, il a été montré que les caspases-9, -7, -2 et -3 sont transitoirement activées : on peut logiquement observer le clivage de la PARP et de la lamine-B, protéine qu'il faut éliminer pour permettre la différenciation en érythrocytes. Par contre, le facteur de transcription GATA1 (GATA Binding Protein 1, facteur de transcription érythroïde), détruit pendant l'apoptose par la caspase-3, n'est pas clivé au cours de la différenciation en globules rouges. Ce facteur de transcription est essentiel, car il permet notamment, en présence d'érythropoïétine de maintenir des taux élevés de Bcl-X_L et de transcrire d'autres gènes essentiels à cette différenciation. Il se trouve que GATA1 est pris en charge et protégé par la protéine chaperonne Hsp70 (Heat Shock Protein) dans le noyau, et bien que les caspases soient activées, GATA1

n'est pas clivé (Droin *et al.* 2008). Il est ainsi protégé de la dégradation, et il maintient son rôle de facteur de transcription nécessaire à la différenciation terminale du globule rouge.

Le **monocyte mature** dans le sang va migrer dans les tissus, suite à l'attraction par les chimiokines, et se différencier sans division cellulaire en macrophage. Au cours de cette différenciation terminale du monocyte en macrophage, il a été montré que les caspases initiatrices -8 et -9 ainsi que la caspase effectrice -3 sont activées dès les 24 premières heures (Rébé *et al.* 2007; Sordet *et al.* 2002). Cette activation des caspases pendant la différenciation cellulaire se fait de manière contrôlée et spécifique. Par exemple, la protéine PARP [Poly (ADP-Ribose) Polymérase], est l'une des 1^{ères} cibles identifiées comme étant clivées au cours de l'apoptose par la caspase-3. Par contre, PARP n'est pas clivée pendant cette différenciation cellulaire, alors que la caspase-3 est activée (Sordet *et al.* 2002), de même que la lamine-B qui participe à la structuration du noyau est clivée au cours de l'apoptose via les caspases, mais reste intègre au cours de la différenciation du monocyte en macrophage (Droin *et al.* 2008). Par ailleurs, le monocyte peut également se différencier en cellule dendritique, et durant cette différenciation ni la caspase-3, ni la caspase-9 ne sont activées. La différenciation en macrophage fait donc appel à une activation spécifique des caspases, alors que la différenciation en cellule dendritique doit impliquer d'autres mécanismes (Sordet *et al.* 2002).

De plus, **bloquer l'expression du gène de la caspase-3 ou -9** induit une **mort périnatale** avec une variété d'hyperplasies et un désordre dans l'architecture cellulaire. *In vitro*, l'ajout d'**inhibiteur de caspases** au cours de la différenciation de la lignée U937 en macrophage, inhibe non seulement l'activation des caspases, mais **empêche** aussi **l'adhésion au support**, typique de la différenciation en macrophage (Sordet *et al.* 2002).

En conclusion, la mort par apoptose nécessite une activation des caspases, mais sans l'activation des caspases il n'y a plus de vie possible. Le phénomène d'activation des caspases au cours de la différenciation cellulaire est donc un phénomène **très contrôlé**, avec, selon le type de différenciation envisagée, une **sélectivité de substrats** à protéger pour ne pas amener la cellule à mourir. De ce point de vue, on assimile la différenciation cellulaire à une **apoptose incomplète ou abortive** (Droin *et al.* 2008).

3) Etude de la différenciation myéloïde *in vitro* :

Les **lignées de laboratoire** sont des lignées cellulaires établies soit à partir de prélèvement effectué lors de biopsies de personnes atteintes de cancer, ou immortalisées artificiellement, ou encore surexprimant des gènes impliqués dans le cycle cellulaire. Correspondant au lignage myéloïde, il existe plusieurs lignées cellulaires établies, comme par exemple, les lignées **HL-60** Human Leukemia (Gallagher *et al.* 1979), **THP-1** Human Monocytic Leukemia (Tsuchiya *et al.* 1982), **K-562** (Lozzio et Lozzio 1979). La lignée **U-937** (Sundström et Nilsson 1976) est une lignée particulière, issue d'une effusion pleurale d'un patient atteint d'un lymphome histiocyttaire, pouvant servir également de modèle myéloïde.

Ces lignées peuvent **être différenciées *in vitro*** par différents agents comme le **DMSO** (diméthylsulfoxyde), l'**ATRA** (All Trans Retinoic Acid), les **esters de phorbols** comme le **PMA** (phorbol 12-myristate 13-acetate), l'**acide butyrique** et bien d'autres. En fonction du type cellulaire, de leur position initiale sur l'axe de différenciation, et de l'agent utilisé, différents types de cellules différenciées peuvent être obtenus (Figure 9). Ces lignées ont été utilisées comme modèle de différenciation myéloïde pour ma thèse, je vais donc brièvement les décrire.

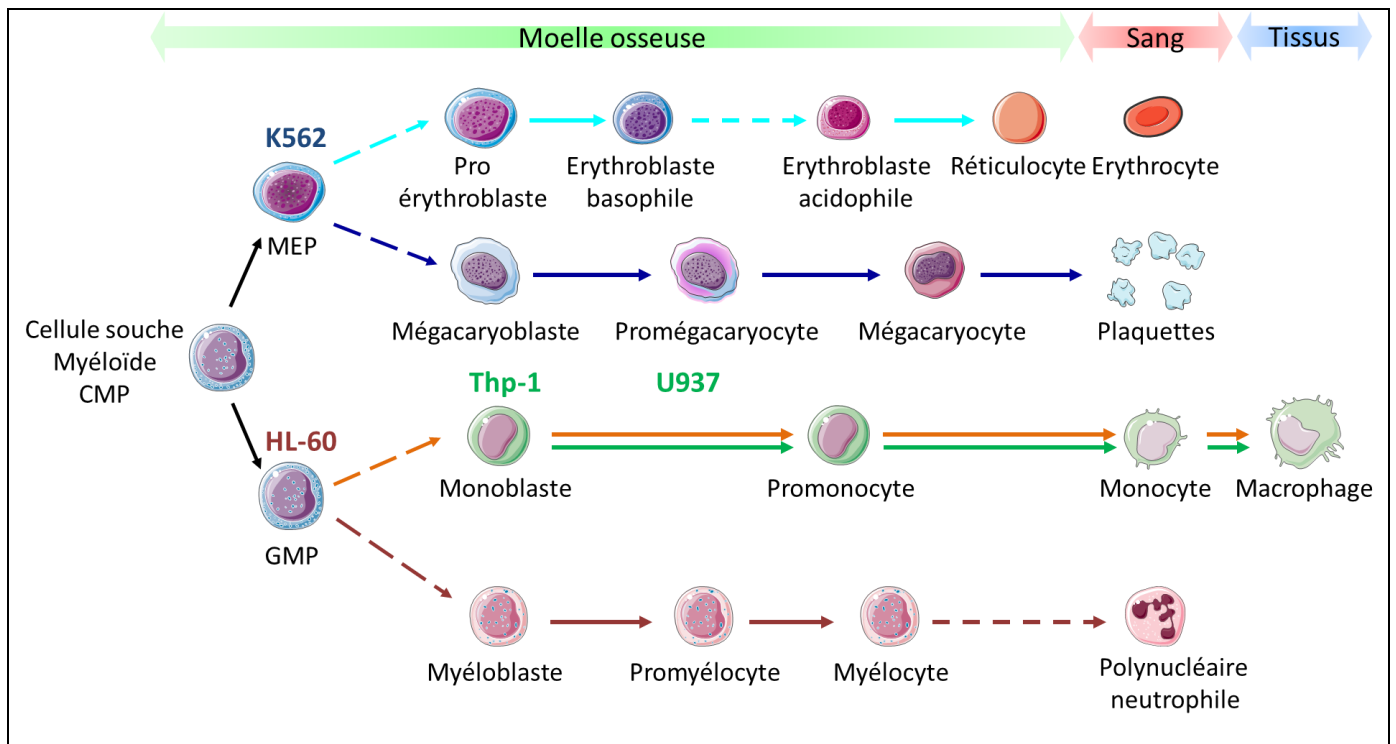


Figure 9 : Myéopoïèse et lignées cellulaires

La lignée K562 peut être induite *in vitro*, en érythrocyte, par ajout de DMSO, flèches bleu ciel, et en plaquettes, par ajout d'acide butyrique, flèches bleu foncé. Cette lignée est à la jonction du lignage érythro-plaquettaire.

La lignée HL-60 peut être induite *in vitro*, en monocyte/macrophage, par ajout de PMA, flèches orange, et en polynucléaire neutrophile, par ajout de DMSO, flèches rouges. Cette lignée se trouve à la jonction du lignage granulo-monocytaire.

Les lignées THP-1 et U937 peuvent être induites *in vitro* en monocyte/macrophage, par ajout de PMA, flèches vertes. Ces 2 lignées sont issues de la voie monocytaire.

D'après (Gallagher *et al.* 1979; Sundström et Nilsson 1976; Radzun *et al.* 1983; Tsuchiya *et al.* 1982; Baliga *et al.* 1993; Tabilio *et al.* 1983).

La lignée HL-60 :

Cette lignée cellulaire a été établie par Collins et ses collaborateurs en 1977 (Collins, Gallo, et Gallagher 1977), à partir d'un prélèvement effectué chez une femme de 36 ans ayant une leucémie aiguë, caractérisée par la suite en 1979 (Gallagher *et al.* 1979) comme étant une leucémie aiguë promyélocytaire encore appelée **LAM-M3** (cf. 2^e partie I, p. 48). La plupart des cellules sont des promyélocytes contenant des granules azurophiles, mais des myéloblastes et des myélocytes sont occasionnellement présents. Ces cellules doublent leur population en 48 à 72 heures, par addition de CSF (Colony Stimulating Factor), et elles forment des colonies. En 1988, cette lignée a été reclassée en leucémie aiguë myéloblastique **LAM-M2** (Dalton *et al.* 1988). En effet, les cellules HL-60 ont des granules, mais n'ont pas de corps d'Auer en fagot, caractéristiques de la **LAM-M3**. De plus, plusieurs anomalies génétiques sont retrouvées dans cette lignée,

mais la translocation caractéristique des LAM-M3 t(15;17) n'est pas retrouvée. Par ailleurs, cette leucémie est résistante à la chimiothérapie intensive, alors que la LAM-M3 se traite plutôt bien (Dalton *et al.* 1988). Les cellules HL-60 sont sensibles aux agents utilisés *in vitro* pour la différenciation des cellules de souris, comme le **DMSO**, **l'acide butyrique et les esters de phorbol** (Figure 9) (Koeffler et Golde 1980). Ces agents permettent ainsi la différenciation de ces cellules *in vitro* vers des granulocytes de types neutrophile « neutrophiles-like » par l'ajout de DMSO, d'acide rétinoïque ou d'actinomycine-D ou vers des monocytes de type « monocytes/macrophages-like » par ajout de vitamine D3 di-hydroxylée, l'acide butyrique ou les esters de phorbol. Cette **lignée cellulaire** représente donc un **bon modèle d'étude** de la **différenciation cellulaire myéloïde**, à la fois des types granulocytaires et monocytaires.

☞ La lignée U937 :

Cette lignée cellulaire est dérivée d'une patiente atteinte d'un **lymphome histiocyttaire** (Sundström et Nilsson 1976). Pour mémoire, un histiocyte est une cellule naissant dans la moelle osseuse, d'une durée de vie longue, migrant ensuite dans le sang puis vers les tissus périphériques où elle prend des formes, et des fonctions variées. L'analyse cytochimique a montré que ces cellules sont fortement positives pour plusieurs estérases, ce qui laisse donc suspecter un niveau de différenciation avancé (stade post-promyélocyte). Ces cellules sont également capables de produire du lysozyme, molécule connue pour être synthétisée par les monocytes/macrophages. On observe également un très faible pourcentage de cellules douées de la capacité à phagocyter des particules, comme des bactéries fixées. Ce profil cellulaire exclut un éventuel caractère lymphoblastoïde, et évoque un type monocytoïde, dérivé d'un histiocyte tumoral, dans un état de différenciation avancé, mais non terminal (Sundström et Nilsson 1976). Après stimulation *in vitro* par un ester de phorbol, le **PMA** (phorbol 12-myristate 13-acetate), ou TPA, (12-O-Tetradecanoylphorbol-13-acetate), ces cellules deviennent adhérentes, perdent leur capacité à se diviser et ont des caractéristiques de « macrophages-like », comme le développement d'une réponse migratoire, la capacité à phagocyter, et la sécrétion du lysozyme (Radzun *et al.* 1983). Cette **lignée cellulaire** est donc un **bon moyen d'étude de la différenciation monocyttaire** (Figure 9).

⌘ La lignée THP-1 :

Cette lignée cellulaire a été établie à partir de monoblastes issus du sang périphérique d'un jeune garçon d'un an atteint d'une **leucémie monocyttaire aiguë**. Elle est positive pour l'estérase [substrat utilisé : α -naphthyl butyrate] et montre des capacités phagocytaires. Elle produit du lysosome et a la capacité de restaurer la réponse des Lymphocytes T (L_T) à la concanavaline A par induction d'expansion clonale. Cette lignée montre donc des propriétés monocytaires (Tsuchiya *et al.* 1980). Comme pour la lignée U937, les cellules THP-1 peuvent être différenciées en macrophages par ajout de l'ester de phorbol de type **PMA** : ces cellules deviennent adhérentes au support en une heure, et leur capacité phagocytaire augmente fortement (Figure 9). Cette **lignée cellulaire** permet donc d'étudier la **différenciation du monocyte en macrophage**, et la **phagocytose** (Tsuchiya *et al.* 1982).

⌘ La lignée K562 :

Cette lignée cellulaire a été établie par Lozzio et Lozzio en 1975, à partir d'une effusion pleurale d'un patient atteint d'une leucémie myéloïde chronique ayant une crise blastique terminale, et a été caractérisée comme une cellule du lignage granulocytaire hautement indifférenciée (Lozzio et Lozzio 1979). Contrairement aux granulocytes et aux monocytes, ces cellules réagissent négativement à la coloration noir Soudan et à la myéloperoxydase, et elles sont positives pour la phosphatase acide. Possédant un fort degré prolifératif, elles sont **incapables de phagocyter** des particules ou bactéries (Lozzio et Lozzio 1979). Des études ont montré que cette lignée avait des caractéristiques érythroïdes (Andersson, Nilsson, et Gahmberg 1979). En effet, elles expriment des **glycoprotéines qui sont caractéristiques des érythrocytes** et elles sont **capables de produire de l'hémoglobine** fœtale et embryonnaire par stimulation par un agent *in vitro* (Koeffler et Golde 1980). D'autres études ont montré qu'un pourcentage de ces cellules avait une activité peroxydase faible, retrouvé exclusivement dans le noyau et le réticulum endoplasmique granuleux, caractéristiques des promégacaryoblastes, et que l'ajout d'acide butyrique augmente le pourcentage de cette population cellulaire. La lignée K562 serait donc au **carrefour entre les érythrocytes et les plaquettes** (Figure 9) (Vainchenker *et al.* 1981). Les cellules K562 peuvent être différenciées *in vitro* en « erythrocytes-like » par ajout de **DMSO** (Baliga *et al.* 1993),

et en « platelets-like » par ajout **d'acide butyrique** (Tabilio *et al.* 1983; Vainchenker *et al.* 1981). Cette **lignée cellulaire** au carrefour du lignage **érythro-plaquettaire** constitue un bon **modèle d'étude de ce type de différenciation**.

L'utilisation de ces lignées cellulaires myéloïdes est donc un excellent moyen d'étudier la différenciation myéloïde. En effet, elles peuvent également correspondre à un stade de différenciation précis et arrêté de la myélopoïèse, mais peuvent aussi être ré-induites à se différencier *in vitro* (Figure 9). Nous pouvons donc non seulement avoir une information à un instant précis de la différenciation mais encore, en induisant leur différenciation *in vitro*, suivre leur évolution au cours de ce phénomène.

⌘ Les monocytes isolés de donneurs sains :

Le monocyte présent dans le sang est une des rares cellules qui peut encore **se différencier sans prolifération** dans l'organisme. Dans les tissus, ces cellules peuvent devenir macrophage, cellule dendritique, ou encore cellule de Langerhans (Geissmann *et al.* 2010), en fonction de l'environnement, des cytokines proinflammatoires, ou de signaux de danger... Tous ces types cellulaires peuvent être facilement étudiés *in vitro*. En effet, après **récupération du prélèvement sanguin**, les cellules mononucléées sont séparées par gradient de densité, et les **monocytes sont isolés** d'après leurs marqueurs de différenciation spécifique. Le monocyte peut par la suite se différencier soit en **macrophage** par ajout de **M-CSF** (Macrophage - Colony Stimulating Factor), soit en **cellule dendritique** par addition de **GM-CSF** (Granulocyte Macrophage-CSF) et **IL-4** (Interleukine 4) (Geissmann *et al.* 2010).

Ces **cellules primaires** sont donc un **bon modèle d'étude** de la **différenciation terminale du monocyte**.

En conclusion, plusieurs outils nous permettent **d'étudier la différenciation myéloïde** à différents stades de maturation, via des lignées cellulaires, et des cellules issues de donneurs sains ou pathologiques, après stimulation par divers inducteurs de différenciation, spécifiques de lignées données.

4) **GALIG et différenciation myéloïde :**

Pour rappel, *in vitro*, la surexpression par transfection du gène **GALIG**, exprimant à la fois la Mitogaligine et la Cytogaligine, **induit une mort cellulaire** de type

apoptose, avec une contraction cellulaire, une condensation mitochondriale et nucléaire, et un relargage du cytochrome c dans le cytoplasme (Duneau *et al.* 2005).

Les protéines Bcl-X_L et Mcl-1 permettent de **prévenir de la mort cellulaire** induite par *GALIG*. De plus, une augmentation de l'expression de Mcl-1 a été montrée durant la différenciation de la lignée THP-1 en macrophage (Daigneault *et al.* 2010; Thomas, Lam, et Edwards 2010), et sa déplétion induit une mort rapide des cellules U937 pendant leur différenciation en macrophages (Moulding *et al.* 2000).

De plus, le gène *GALIG* est exprimé faiblement dans les cellules immatures de la moelle osseuse et plus fortement dans les cellules sanguines matures. Au laboratoire, il a également été montré une sous-expression de *GALIG*, dans les cellules leucémiques de la moelle osseuse de patients par rapport à des donneurs sains (Mollet *et al.* 2013). Ceci renforce l'hypothèse que le gène *GALIG* est important à la différenciation cellulaire.

III. *GALIG*, Système Ubiquitine Protéasome et Autophagie :

Il a été montré au laboratoire que les protéines issues du gène *GALIG*, notamment la Cytogaligine interagissent avec des protéines impliquées dans le système ubiquitine protéasome et l'autophagie (cf. 1^{re} partie III.C, p. 43).

En **conditions physiologiques normales**, les mécanismes de dégradation cellulaire, comme l'**autophagie** et le **système ubiquitine protéasome**, permettent d'assurer le contrôle **qualité des protéines**, et de réguler leur **demi-vie**. L'autophagie permet également de **recycler des organites** entiers comme les mitochondries. Ces mécanismes de dégradation cellulaire fonctionnent à des **niveaux basaux** différents, en fonction du type cellulaire considéré.

En **conditions de stress** (infection par un pathogène, privation en nutriment et oxygène...), la cellule va accélérer l'autophagie, ce qui va lui permettre de **recycler des protéines, des ARN, des gouttelettes lipidiques, des amas de sucres, voire des organites entiers et des pathogènes**. Après leur dégradation en acides aminés, sucres et lipides, ils vont pouvoir être réutilisés pour former d'autres molécules (Lamb, Yoshimori, et Tooze 2013; Majeski et Dice 2004).

A. Le système ubiquitine protéasome (UPS) :

Le système ubiquitine protéasome (UPS) et l'autophagie agissent simultanément, en conjonction l'un avec l'autre, et jouent un rôle essentiel dans la maintenance de

l'homéostasie et le contrôle-qualité des protéines (Cohen-Kaplan *et al.* 2016). Les chercheurs ayant montré l'importance du système ubiquitine protéasome pour la **dégradation des protéines cytosoliques et nucléaires**, ont été récompensés par le **Prix Nobel de Chimie en 2004** (aux Israéliens Aaron Ciechanover et Avram Hershko et à l'Américain Irwin Rose). La dégradation spécifique de ces protéines par l'UPS repose sur le fait que ces **protéines sont ubiquitinylées** sur un ou plusieurs résidus lysine. L'ubiquitination est une modification post-traductionnelle qui correspond à l'ajout de façon covalente d'une protéine entière, de 76 acides aminés, l'**ubiquitine**. Ces ubiquitines peuvent être ajoutées soit de façon **unique** (mono-ubiquitination), soit plusieurs fois sur des parties différentes (multi mono-ubiquitination) ou soit **en chaine** (poly-ubiquitination), par une liaison sur la lysine 63 ou sur la lysine 48. Le destin du substrat ubiquitinylé dépendra de la longueur de la chaine d'ubiquitine ainsi que de la position du résidu lysine (Cohen-Kaplan *et al.* 2016). Ainsi, seules les protéines marquées par au minimum 4 ubiquitines, reliées par une liaison sur la lysine 48 seront dégradées par ce système, soit ces substrats seront reconnus par les **protéines navettes co-chaperonnes comme Bag-3 et Bag-1**, impliquées dans le système protéasome (Cohen-Kaplan *et al.* 2016), soit la chaine d'ubiquitine pourra cibler directement la sous-unité régulatrice du protéasome (1^{re} partie III.A.1.b, p. 27) (Hicke, Schubert, et Hill 2005).

1) L'ubiquitination :

L'ubiquitination se déroule par l'action séquentielle de **3 enzymes, E1 enzyme d'activation (deux types), E2 enzyme de conjugaison (plusieurs centaines de types), et E3 ubiquitine ligase (plus de 1000 types)**, l'enzyme de transfert de l'ubiquitine sur la protéine à marquer (Figure 10). Lors de l'activation de l'ubiquitine, de l'**ATP** est nécessaire pour lier l'ubiquitine sur la cystéine du site actif d'E1. Puis l'**enzyme E1 transfère l'ubiquitine** à E2, qui la lie également de façon covalente. Enfin l'**enzyme E2-ubiquitine** cible une des **E3**, soit sur un domaine **HECT** (Homologous to the E6AP Carboxyl Terminus), présent par exemple sur HUWE1 (HECT, UBA and WWE domain containing 1, E3 ubiquitin protein ligase), capable d'interagir avec la Cytogaline (cf. III.A, p. 43), soit sur un domaine **RING** (Really Interesting New Gene), par exemple présent sur Parkin, une E3 Ubiquitine ligase impliquée dans la dégradation des agrégats protéiques et des mitochondries. Cette **E3-Ubiquitine** ligase ciblera directement la

protéine à dégrader. La protéine ubiquitinylée sera **par la suite dégradée**, soit par le **protéasome**, soit par **autophagie** ou pourra également être déubiquitinylée et ainsi échapper à la dégradation (Hicke, Schubert, et Hill 2005) : ces 2 systèmes sont donc liés (Cohen-Kaplan *et al.* 2016).

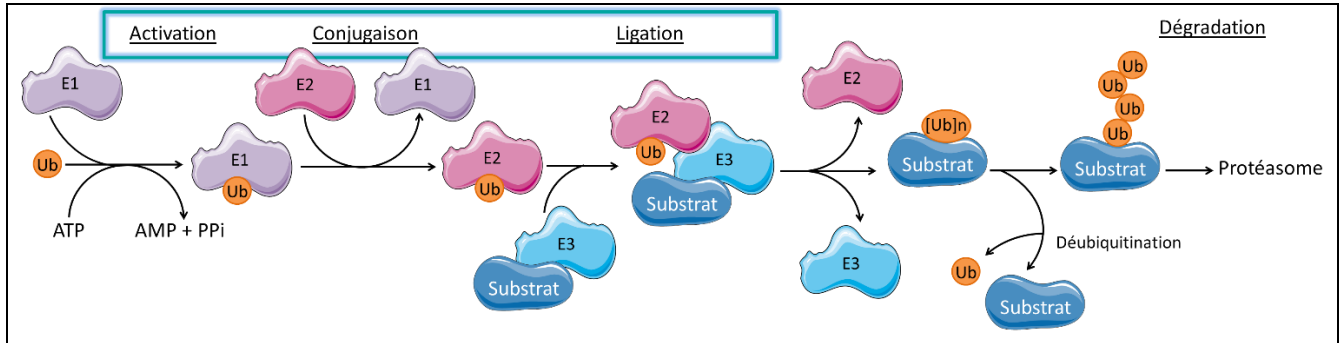


Figure 10 : Ubiquitination des protéines

En présence d'ATP, l'enzyme E1 va pouvoir lier sur une de ses cystéines une ubiquitine, pour former le complexe E1-Ub. L'enzyme d'activation E1 transfère l'ubiquitine à l'enzyme de conjugaison E2. Enfin l'enzyme de ligation E3 permet le transfert de l'ubiquitine d'E2-Ub vers le substrat sélectionné. Le substrat est par la suite soit conduit au protéasome pour sa dégradation, soit déubiquitinylé. D'après (Hicke, Schubert, et Hill 2005).

2) Le protéasome :

Le protéasome est un **complexe multi-enzymatique**, composé de **nombreuses sous-unités**. Il a un rôle dans la dégradation des protéines mal conformées après leur synthèse ou altérées au cours du temps, mais également dans la dégradation de protéines intactes pour lesquelles il régule leur demi-vie. Ainsi, il est impliqué dans le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose, notamment par la dégradation de protéines clefs comme les cyclines ou Bcl-2 (Adams 2003). Le **complexe protéasome 26S** est composé du **complexe 20S**, coiffé de 1 ou 2 **complexes régulateurs 19S** aux extrémités (Figure 11). Il forme un **canal étroit**, dans lequel seules les protéines ubiquitinylées et dénaturées peuvent passer. En effet, l'activité enzymatique se trouve à l'**intérieur** assurant ainsi la **protection des protéines cytosoliques**. Le **complexe 20S** est un **cylindre** composé de 4 **anneaux**, composés de 7 **sous-unités**, empilés les uns sur les autres. Les deux **anneaux internes** sont appelés β et les deux **externes** α . La chambre catalytique est composée des 2 **anneaux internes β** , contenant chacun 3 **sites protéolytiques**, distingués par leur **spécificité de substrat**. Les sous-unités $\beta 1$ ont une activité caspase-like qui clive de préférence après les **résidus acides** (GLU ou ASP), $\beta 2$ une activité trypsin-like qui coupe les liaisons peptidiques après un **résidu basique** (LYS ou ARG) et $\beta 5$ une activité chymotrypsin-like qui lyse après les **acides aminés**

hydrophobes (TYR ou PHE). Le complexe régulateur 19S permet de reconnaître les protéines ubiquitinylées, de libérer les ubiquitines liées à ces protéines à dégrader, de déplier et de dénaturer la chaîne peptidique. Il permet aussi de contrôler l'accès au cœur protéolytique (Adams 2003) : les protéines seront ainsi dégradées dans le cœur, de manière progressive, générant des fragments de 3 à 25 acides aminés.

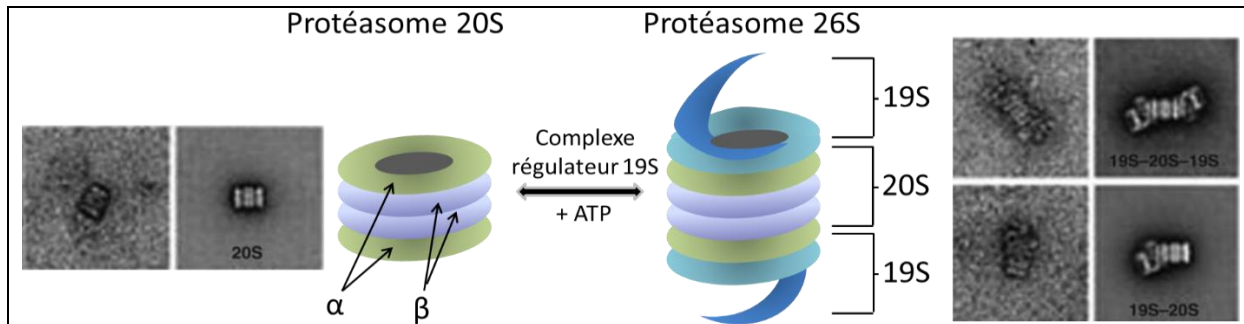


Figure 11 : Structure des protéasomes 20S et 26S

A gauche, Microscopie électronique et schéma du protéasome 20S, composé de 2 anneaux internes β et 2 anneaux externe α , ces anneaux sont composés chacun de 7 sous-unités empilées les unes sur les autres. Les 2 anneaux β contiennent chacun 3 sites actifs.

A droite, Microscopie électronique et schéma du protéasome 26S, composé du protéasome 20S et coiffé de 2 complexes régulateurs 19S. D'après (Adams 2003; Herrmann, Lerman, et Lerman 2010).

Plusieurs agents permettent d'inhiber le protéasome *in vitro*, comme le MG132 (Z-Leu-Leu-Leu-al). Plusieurs études ont pu montrer que l'inhibition du protéasome *in vitro* cause une mort cellulaire (Adams 2003). Le système ubiquitine protéasome est donc essentiel pour le maintien des processus cellulaires.

3) Système Ubiquitine Protéasome et famille Bcl-2 :

La régulation de l'apoptose est essentielle, et le système ubiquitine protéasome peut également prendre part à la régulation de celle-ci, notamment par l'ubiquitination des membres de la famille Bcl-2 (Broemer et Meier 2009; Neutzner *et al.* 2012). Il permet ainsi de réguler le ratio entre les membres pro et/ou anti-apoptotiques de cette famille, soit en stabilisant ces protéines (mono-ubiquitination), soit en induisant leur dégradation par le protéasome (polyubiquitination). Par exemple, la mono-ubiquitination de Bcl-2 entraîne sa stabilisation et augmente sa capacité d'interaction avec Bcl-2 (Neutzner *et al.* 2012). A contrario, la protéine Mcl-1 peut être poly-ubiquitinylée, entraînant sa **dégradation par le protéasome** (Zhong *et al.* 2005). La dégradation de cette protéine peut induire un **déséquilibre de la balance apoptotique** en faveur de la mort cellulaire, en diminuant l'interaction entre Mcl-1 et Bak. Ce dernier peut alors se

dimériser au niveau de la membrane mitochondriale et induire le **relargage du cytochrome c** (Zhong *et al.* 2005). Par ailleurs, la protéine pro-apoptotique cytosolique Bid est clivée par les caspases-1 et -8 en deux fragments. La partie N-terminale est très rapidement poly-ubiquitinilée et dégradée par le protéasome, tandis que la partie C-terminale va migrer à la mitochondrie et neutraliser les membres anti-apoptotiques. Afin d'inhiber cette induction de l'apoptose via tBid, le système ubiquitine protéasome doit contrôler sa dégradation rapide (Broemer et Meier 2009; Neutzner *et al.* 2012).

En conclusion, ce n'est bien sûr qu'un bref aperçu de tous les liens moléculaires existant entre le système ubiquitine protéasome et l'apoptose, mais cela illustre le fait que l'ubiquitination et la dégradation des membres de la famille Bcl-2 permettent de réguler l'induction ou l'inhibition de l'apoptose et donc de contrôler le destin cellulaire.

4) Système Ubiquitine Protéasome et différenciation cellulaire :

Pour passer d'un état de différenciation à un autre, une cellule peut avoir besoin de pratiquer des changements rapides de son contenu cellulaire. Dans ce cas, elle doit pouvoir éliminer plusieurs protéines dont elle n'a plus besoin, mais parfois également certains organites. Par exemple, le système ubiquitine protéasome permet notamment à la cellule hématopoïétique de contrôler le niveau de certains facteurs de transcription, favorisant soit l'auto-renouvellement, soit la différenciation cellulaire (Demasi, Simões, et Bonatto 2015). Ainsi il a été montré que l'activité du facteur de transcription GATA1, essentiel à la différenciation érythroïde (cf. 1^{re} partie II.B.2, p. 18), est hautement régulé par le système ubiquitine protéasome (Naujokat et Šarić 2007). D'une autre façon, le système ubiquitine protéasome intervient également dans la différenciation du myoblaste en myotube. En effet, lors de cette différenciation, les myoblastes mononucléés fusionnent pour former un myotube plurinucléé. Toute inhibition du protéasome induit un blocage de cette fusion cellulaire, nécessaire pour la génération des myotubes. A noter que ceci est réversible lorsque l'inhibition du protéasome est levée (Kim et al. 1998). D'une façon intéressante, il a été montré chez la souris que l'ubiquitine seule permet de médier la liaison des cellules progénitrices hématopoïétiques au stroma de la moelle osseuse, ainsi que dans la rate. Ceci est dû à l'ubiquitine exprimée à la surface cellulaire des cellules du stroma et aux sites de liaisons spécifiques existants sur les cellules progénitrices (Naujokat et Šarić 2007). Ce rapprochement

cellulaire, médiée par l'ubiquitine, sans intervention du protéasome ici, permet une différenciation optimale des progéniteurs.

En conclusion, le système ubiquitine protéasome est indispensable au bon déroulement de la différenciation de plusieurs types cellulaires.

B. L'autophagie

L'autophagie est un processus de **dégradation cellulaire**, essentiel pour la survie des cellules eucaryotes. Ce processus peut être assimilé à une usine de recyclage interne à la cellule. Les travaux d'Yoshinori Ohsumi sur l'autophagie ont été récompensés par l'obtention du prix Nobel de médecine en 2016. En condition physiologique normale, l'autophagie est activée à des niveaux de base différents, en fonction du type cellulaire. En condition de stress, le flux autophagique augmente, afin de maintenir toutes les fonctions cellulaires nécessaires à la survie. L'autophagie est impliquée notamment dans l'homéostasie cellulaire, le développement, la tumorigenèse et l'infection (Lamb, Yoshimori, et Tooze 2013). Différents types d'autophagie ont été décrits, la micro-autophagie (cf. 1^{re} partie III.B.1, p. 30), l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) (cf. 1^{re} partie III.B.2, p. 30) et la macro-autophagie (ou communément dénommée autophagie, (cf. 1^{re} partie III.B.3, p. 32). Différents sous-types d'autophagies ont été définis en fonction du constituant cellulaire séquestré comme la xénophagie (bactérie et virus), l'agrégaphagie (agrégat de protéines), la pexophagie (peroxysomes) et la mitophagie (mitochondrie), (Lamb, Yoshimori, et Tooze 2013).

1) La micro-autophagie :

La micro-autophagie est un processus de **dégradation lysosomale non sélective**, par englobement direct de contenu cytoplasmique par des tubes autophagiques, qui permettent, à la fois, **l'invagination et la fusion dans la lumière lysosomale** (Li, Li, et Bao 2012). Ce processus ne sera pas plus détaillé, car ce n'est pas le sujet de la thèse.

2) L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes :

L'autophagie médiée par les protéines chaperonnes est une forme **sélective d'autophagie protéique**. La macro-autophagie est rapidement activée à la suite d'une **limitation en nutriment**, mais lorsque la **privation perdure**, la macro-autophagie diminue et **l'autophagie médiée par les chaperonnes (CMA) se met en place** (Majeski et Dice 2004). Les protéines cytosoliques solubles contenant le **court motif pentapeptidique**

KFERQ, plus ou moins dégénéré, sont repérées puis dégradées par le lysosome (Johansen et Lamark 2011; Majeski et Dice 2004) (Figure 12). Ce motif KFERQ est le premier à avoir été identifié, mais il peut varier légèrement, il est constitué d'un résidu glutamine, précédé de 4 résidus. Il est trouvé dans environ 30% des protéines cytosoliques. Le peptide d'adressage KFERQ est la cible d'un **complexe de chaperonnes** contenant **hsc70** et plusieurs autres **co-chaperonnes** (**hsp90** : heat shock protein 90, **hsp40** : heat shock protein 40, **hop** : Hsp70-Hsp90 organizing protein, **hip** : **Hsc70 interacting protein** et **bag-1** : BCL2 associated athanogene 1). Ce complexe se fixe aux multiples sous-unités du **récepteur lysosomal Lamp2a** (Lysosomal-associated membrane protein 2), ce qui induit la multimérisation de Lamp2a et la dénaturation de la protéine présentant le motif KFERQ. Cette dénaturation permet le passage de la protéine-cible à travers la membrane lysosomale, notamment grâce à l'aide de Hsc70 lysosomale (Ly-HSC70). Dans la lumière du lysosome, les protéines seront dégradées (Johansen et Lamark 2011; Majeski et Dice 2004). Le **lysosome est un organite acide** avec un pH interne compris entre 5,1 et 5,5. Il contient diverses **hydrolases actives** à pH acide : on y trouve des nucléases, des protéases, des glycosidases, des lipases, des phosphatases, des sulfatases et des phospholipases. (Johansen et Lamark 2011; Majeski et Dice 2004).

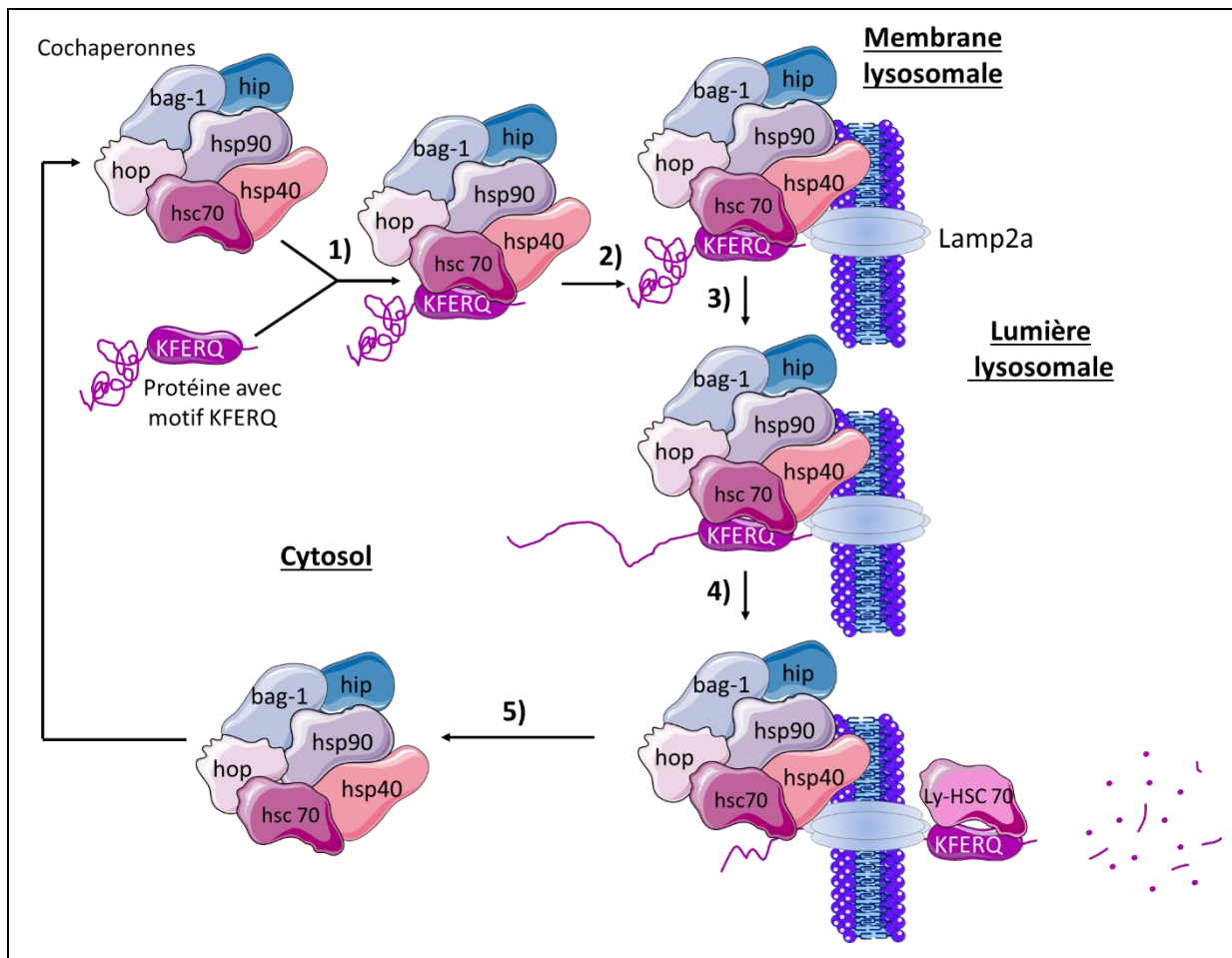


Figure 12 : Mécanisme de l'autophagie médiée par les chaperonnes

1), hsc70 avec les cochaperonnes hip, hop, bag-1, hsc90 et Hsp40, reconnaissent le motif KFERQ sur une protéine cytosolique. 2), Ce complexe cible Lamp2a à la membrane lysosomale. 3) La protéine substrat avant de traverser la membrane, est dénaturée, et 4), la protéine lysosomale Ly-hsc70 vient aider au passage de la protéine substrat à travers la membrane. Puis la protéine est dégradée par les enzymes lysosomales, 5), le complexe est relargué dans le cytoplasme et pourra être disponible si une autre protéine expose un motif KFERQ. D'après (Majeski et Dice 2004)

L'autophagie médiée par les chaperonnes permet donc de recycler les protéines de façon sélective, ce qui permet de maintenir l'homéostasie protéique ainsi que leur contrôle qualité.

3) La macro-autophagie :

La **macro-autophagie** se produit lorsqu'il y a formation d'une double membrane isolée (Figure 13) qui en s'incurvant, va pouvoir englober du matériel cytosolique, comme des macromolécules (protéines, lipides...) et des organites. Cette double membrane, appelée **phagophore**, va progressivement se refermer pour former l'**autophagosome**. L'autophagosome va ensuite fusionner avec le **lysosome**, et former l'**autophagolysosome**. Les protéines et organites séquestrés vont ainsi être dégradés par les hydrolases acides du lysosome en acides aminés et éléments simples, qui pourront

alors être transportés à travers la membrane lysosomale pour former, par exemple, dans le cytosol de nouvelles protéines (Lamb, Yoshimori, et Tooze 2013). L'origine de cette membrane reste encore un mystère. Plusieurs organites ont été impliqués dans sa formation comme le réticulum endoplasmique (RE), la mitochondrie, les membranes associées aux mitochondries (MAM), le Golgi, la membrane cytoplasmique et le système de recyclage de l'endosome (Tooze et Yoshimori 2010; Lamb, Yoshimori, et Tooze 2013).

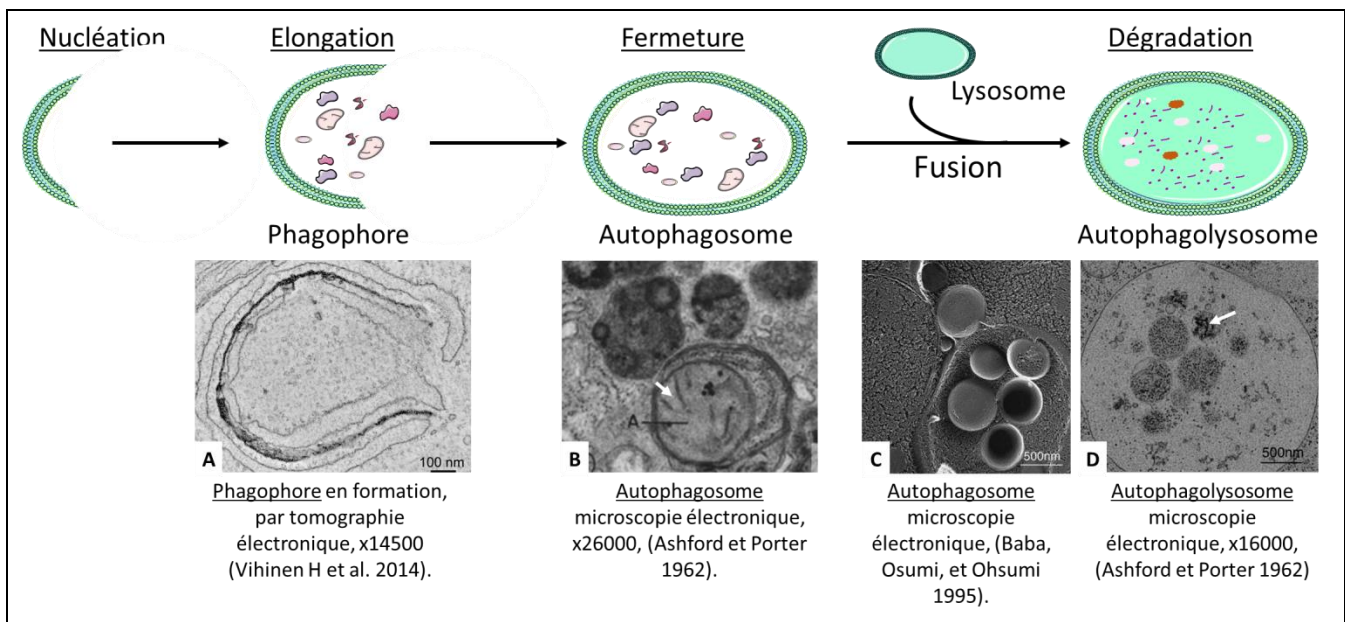


Figure 13 : La macro-autophagie

La macro-autophagie commence par la formation d'une double membrane, appelée aussi phagophore, dans le cytoplasme qui va pouvoir englober des protéines, des organites, et du matériel cytoplasmique, puis s'étendre pour se refermer en une vésicule, appelée autophagosome. Celui-ci va par la suite fusionner avec un lysosome, pour devenir l'autolysosome. Les enzymes lysosomales vont dégrader les composants séquestrés, qui pourront être réutilisés par la cellule. D'après (Lamb, Yoshimori, et Tooze 2013).

Microscopie : **A**, phagophore en formation, par tomographie électronique, x14500, (Vihinen H *et al.* 2014). **B**, autophagosome contenant du réticulum endoplasmique rugueux et une mitochondrie (flèche), microscopie électronique, x26000, (Ashford et Porter 1962). **C**, autophagosome fusionnant avec une vacuole, microscopie électronique, (Baba, Osumi, et Ohsumi 1995). **D**, autophagolysosome contenant des vestiges mitochondriaux, microscopie électronique, x16000, (Ashford et Porter 1962).

La formation de l'autophagosome se déroule en **plusieurs étapes** : l'**initiation**, la **nucléation**, l'**élongation**, la **fermeture** et la **maturation**. Elle nécessite une machinerie protéique complexe, parmi laquelle on retrouve principalement les produits des gènes de la famille **ATG** (autophagy-related gene). Initialement découverts chez la levure, ces gènes sont très conservés entre les espèces (Johansen et Lamark 2011; Lamb, Yoshimori, et Tooze 2013) (**Figure 14**). L'**activation transcriptionnelle** des gènes des

protéines **autophagosomales** et **lysosomales** est sous le contrôle du facteur de transcription **TFEB** (Transcription Factor EB) (Martina *et al.* 2012).

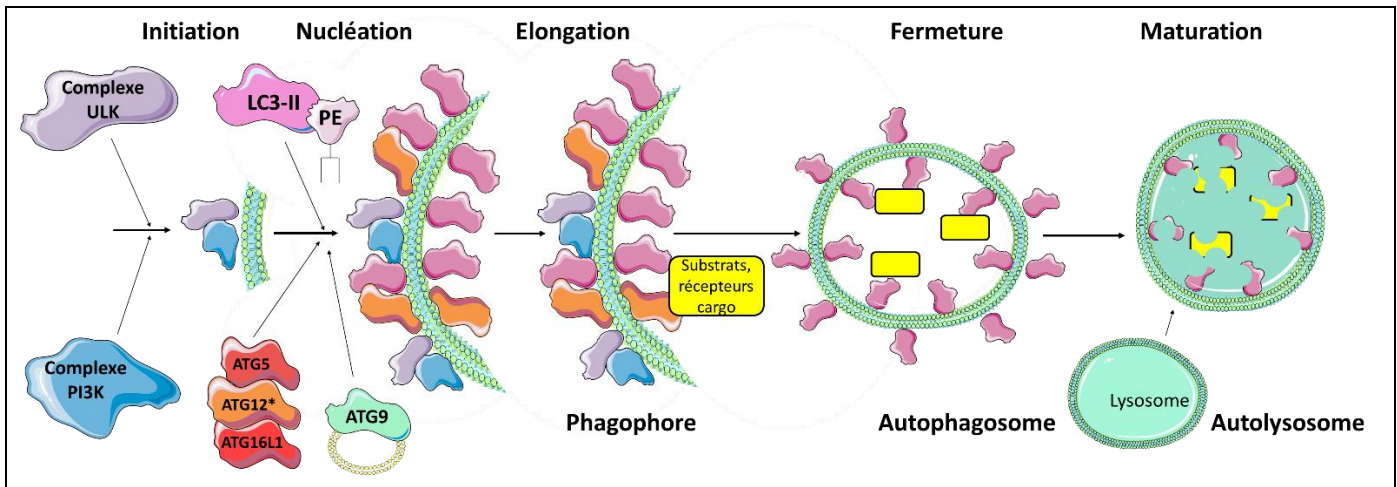


Figure 14 : Formation de la vésicule d'autophagie

L'initiation de l'autophagie se déroule via l'activation des complexes ULK (UNC51 like Ser/Thr kinase) et PI3K (phosphoinositide 3-kinase). Une fois les complexes ULK et PI3K activés au site d'initiation, ils vont pouvoir phosphoryler plusieurs protéines et produire un pool de phosphatidyl-inositol-3-phosphate spécifique de l'autophagosome (PtdIns(3)P).

Ces événements vont conduire à la nucleation de la membrane isolée et au recrutement de protéines ATG supplémentaires et d'effecteurs PtdIns(3)P spécifiques de l'autophagie. La phosphorylation d'ATG9 par ULK induit sa relocalisation au niveau de la membrane isolée, et permet ainsi un apport de membrane au site d'initiation. Les protéines ATG12-ATG5-ATG16L1 formant le complexe ATG16L1, sont recrutées à la membrane. Ce complexe a pour fonction de médier la conjugaison de la phosphatidyléthanolamine (PE) à la protéine LC3, comme aux membres de la famille ATG8, à savoir LC3 A, B et C, GABARAP et les protéines GABARAP-like. Ceci leur permettra de s'associer à la membrane de l'autophagosome. Cette association de protéines et de complexes protéiques à la membrane va engendrer l'élongation de la membrane isolée et permettre la fermeture de l'autophagosome ainsi que le clivage des LC3 et autres ATG8 sur la membrane externe, c'est la phase de maturation. D'après (Johansen et Lamark 2011; Lamb, Yoshimori, et Tooze 2013).

⌘ L'initiation :

L'initiation de l'autophagie implique le **complexe ULK** (Unc-51-UNC51like Ser/Thr kinase), qui contient les deux kinases ULK1 et 2, ATG13, FIP200 (RB1-inducible coiled-coil protein 1/ FAK family kinase interacting protein of 200 kDa) et ATG101.

Chez les mammifères, dans des conditions normales d'alimentation, le **complexe ULK** est fixé à **mTORC1 activée** (Ser/thr-protein kinase mTOR/activé (mammalian Target Of Rapamycin Complex 1), le complexe ULK séquestré par mTORC1 est ainsi inactif. De plus, mTORC1 inhibe l'autophagie également par la séquestration du **facteur de transcription TFEB** dans le cytoplasme. En effet, mTORC1 **phosphoryle TFEB**, ce qui induit au recrutement de protéines qui vont cibler et masquer le signal d'adressage nucléaire de TFEB, conduisant à son inhibition par sa **séquestration dans le cytoplasme** (Martina *et al.* 2012).

Lors d'une privation en nutriments, **mTORC1** est **inactivée**, ce qui conduit à une déphosphorylation de TFEB, puis son exportation dans le noyau et ainsi **l'activation transcriptionnelle des gènes autophagiques** (Martina *et al.* 2012).

De plus, l'inactivation de mTORC1 conduit également à la **libération du complexe ULK**. Ceci va permettre une **augmentation de l'activité des kinases ULK1 et ULK2**. Ainsi, l'inactivation du complexe de régulation négatif mTORC1 est suivie par l'activation du complexe ULK (Johansen et Lamark 2011; Lamb, Yoshimori, et Tooze 2013; Wani *et al.* 2015). Les extrémités C-terminales d'ULK1 et ULK2 vont pouvoir ainsi cibler la membrane du RE par exemple, et **recruter** les autres membres du **complexe d'induction**, au site d'initiation de l'autophagosome.

Le **complexe PI3K** (phosphoInositide 3-kinase) est également impliqué dans l'initiation de l'autophagosome. Il est composé d'une sous-unité catalytique de la PI3K, **VPS34/PIK3C3** (Vacuolar Protein Sorting 34/Phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3), d'une sous-unité régulatrice, **VPS15/PIK3R4** (Vacuolar Protein Sorting 15/Phosphoinositide 3-kinase regulatory subunit 4/PI3K p150 subunit), de **Bécline-1** (Coiled-coil myosin-like BCL2-interacting protein) et d'**ATG14** (Beclin 1-associated autophagy-related key regulator) (Johansen et Lamark 2011; Lamb, Yoshimori, et Tooze 2013).

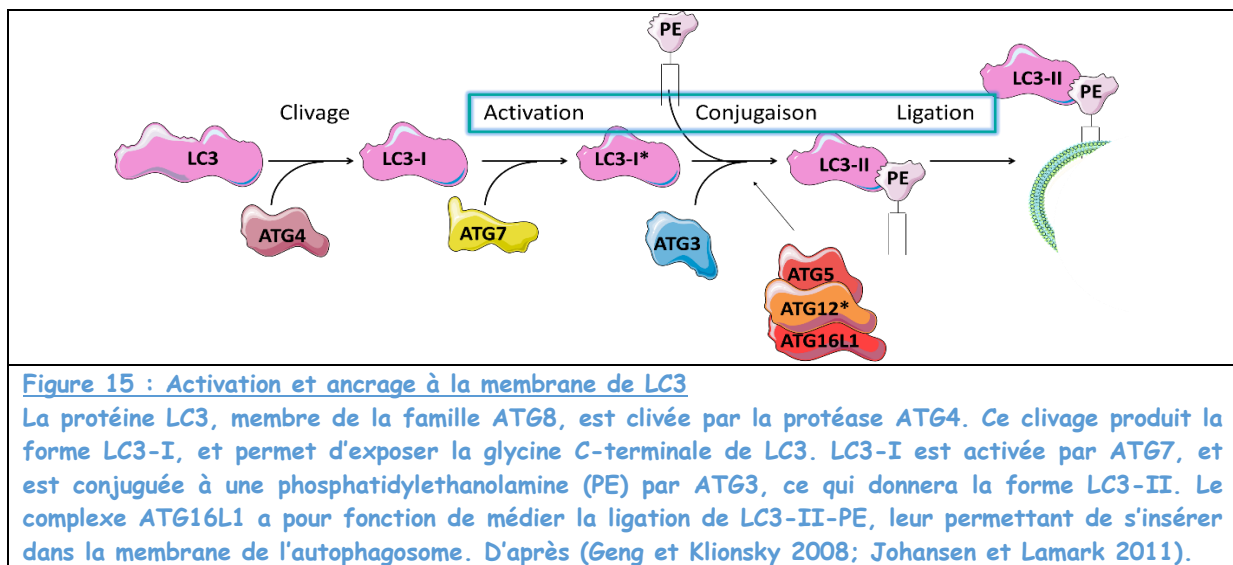
⌘ La nucléation :

Une fois les complexes ULK et PI3K recrutés et activés au site d'initiation, ils vont **phosphoryler** plusieurs protéines contenant des résidus Ser/Thr et vont produire un **"pool" de phosphatidylinositol-3-phosphate** (PtdIns(3)P), spécifique de l'autophagosome. Ces événements vont conduire à la **nucléation de la membrane isolée et au recrutement de protéines ATG** supplémentaires et d'effecteurs PtdIns(3)P spécifiques de l'autophagie (Johansen et Lamark 2011; Lamb, Yoshimori, et Tooze 2013).

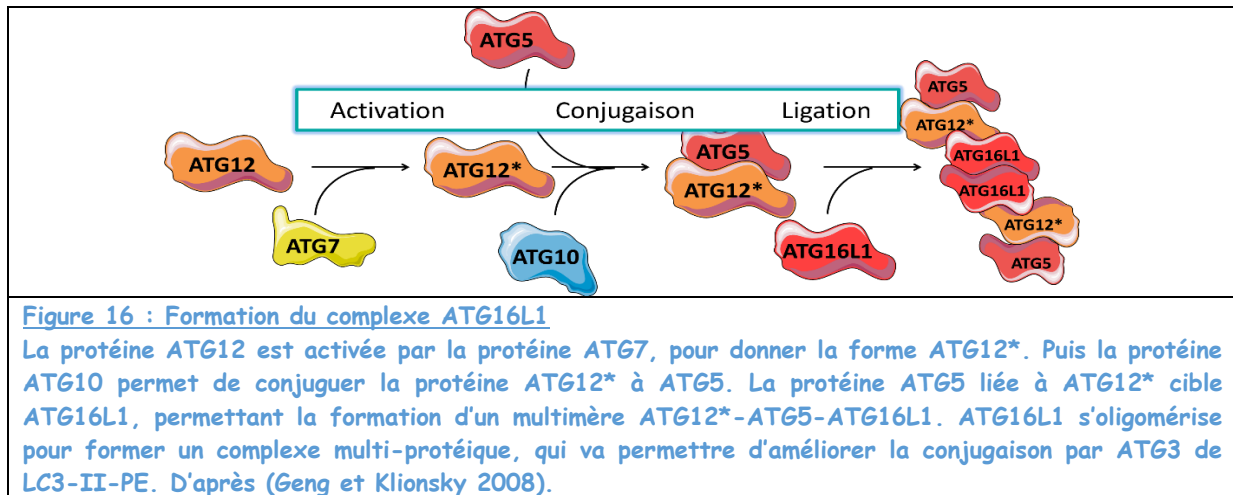
⌘ L'élongation :

Dans ce processus, les protéines de la famille **ATG8** ont un rôle central. La famille ATG8 comprend une seule protéine chez la levure, alors qu'elle contient plusieurs membres chez les mammifères, qui peuvent être classés en **2 sous-familles**. La première contient les **MAP1LC** (Microtubule-Associated Proteins-Ligth chain), qui sont **LC3 A, LC3B et LC3C**. La deuxième contient au moins 4 membres, la protéine **GABARAP** (GABA

type A Receptor Associated Protein), et trois protéines homologues, les protéines GABARAP-like, **GABARAPL1** (ATG8L, GEC-1: Glandular Epithelial Cell protein 1), **GABARAPL2** (GATE-16 : Golgi-Associated ATPase Enhancer of 16 kDa), et **GABARAPL3**. L'extrémité C-terminale de ces protéines de la famille ATG8 est **spécifiquement clivée** par les Cystéine protéases de la famille ATG4, et expose une **Glycine C-terminale**. Ce clivage produit la forme « I » des molécules ATG8 (par exemple LC3-I). Ce résidu Glycine est par la suite activé par ATG7 et **conjugué à une PE** (phosphatidyléthanolamine) par ATG3, ce qui donnera la forme « II » des molécules ATG8, (par exemple, LC3-II), ([Figure 15](#)) (Geng et Klionsky 2008; Johansen et Lamark 2011).



De plus, les protéines ATG12-ATG5-ATG16L1 formant le **complexe ATG16L1**, sont recrutées à la membrane. Ce complexe **ATG16L1** subit également un processus commun à l'**ubiquitination**, ([Figure 16](#)). En effet, la protéine **ATG12** doit être **activée** par **ATG7**, comme LC3, puis **ATG10** conjugue **ATG5** à **ATG12** activée. Enfin **ATG5-ATG12** se lie à **ATG16L1** par interaction avec **ATG5**. ATG16 peut s'oligomériser, ce qui va engendrer la formation d'un complexe multimérique **ATG12-ATG5-ATG16**. Ce complexe a pour fonction de médier la ligature de LC3-II-PE et les membres de sa famille, leur permettant de s'insérer dans les membranes biologiques, notamment celles de l'autophagosome. (Geng et Klionsky 2008).



L'**activation** et l'**ancrage** à la membrane de **LC3** (Figure 15) ainsi que la formation du complexe **ATG16L1** (Figure 16) se déroulent selon les mêmes étapes que l'**ubiquitination des protéines** (Figure 10), à savoir activation, conjugaison et ligation, avec comme **substrat** **ATG5** ou le **PE**. De ce fait, la protéine **ATG7** peut être assimilée à une **E1 enzyme d'activation**, **ATG3** et **ATG10** à une **E2 enzyme de conjugaison**, et le complexe **ATG12-ATG5-ATG16L1** à une **E3 ubiquitine ligase**, pour **LC3-II-PE** (Geng et Klionsky 2008).

Cette association de protéines de la famille **ATG8** à la membrane va permettre l'**expansion de la membrane isolée**. Notamment grâce à la **protéine ATG9**, cette protéine permet l'**apport de phospholipides** et de **morceaux de membrane** au niveau du **site du phagophore en formation**, sous la forme de vésicules. En effet, la protéine **ATG9** fait la **navette** entre le **réseau trans-golgien** et le **site de formation du phagophore** (Papinski *et al.* 2014). De plus, **ATG9** permet le **recrutement des protéines ATG8 et ATG18** au niveau de la **membrane isolée**, et la **relocalisation d'ATG9** à la membrane nécessite sa **phosphorylation** par le **complexe kinase ULK** (Papinski *et al.* 2014; Wani *et al.* 2015).

Avant la fermeture de cette membrane, seuls restent associés les membres de la famille **LC3** sur ce qui deviendra la surface interne de l'autophagosome. En effet, les protéines **LC3** présentes sur la surface externe vont pouvoir être **déconjuguées** par la **protéase ATG4**, afin d'être recyclées, et les autres protéines **ATG** ciblant cette membrane sont quant à elles dissociées de l'autophagosome (Johansen et Lamark 2011; Lamb, Yoshimori, et Tooze 2013). La protéine **LC3** permet l'**expansion de la membrane**

isolée, elle agit donc à un stade précoce de la formation de l'autophagosome, alors que les membres **GABARAP** quant à eux sont essentiels pour les **étapes tardives de la maturation de l'autophagosome** (Weidberg *et al.* 2010). La maturation est également favorisée par **Bécline**, ainsi que les **protéines membranaires lysosomales LAMP1 et LAMP2**, une protéine de liaison, une ATPase, et le pH des lysosomes (Kang *et al.* 2011).

En conclusion, les protéines de la famille LC3 permettent d'aider l'élongation et la fermeture de l'autophagosome (Johansen et Lamark 2011; Lamb, Yoshimori, et Tooze 2013).

⌘ La macro-autophagie sélective via les protéines adaptatrices

Plusieurs **protéines dites adaptatrices** sont impliquées dans le déroulement de la macro-autophagie sélective. C'est le cas de **p62** (codée par le gène SQSTM1, séquestosome), de **NBR1** (Neighbor of BRCA1 gene 1 protein) et de **NIX** (**NIP3-like Protein X**) ou **BNIP3L** (**BCL2/adenovirus E1B 19 kDa protein-Interacting Protein 3-Like**). Les protéines p62 et NBR1, cibles de la macro-autophagie, permettent de **sélectionner les substrats ubiquitinylés** pour médier leurs dégradations par macro-autophagie (Johansen et Lamark 2011). La protéine p62 humaine possède plusieurs domaines. Elle a un signal de **localisation nucléaire** et un signal **d'export nucléaire**, ce qui lui permet de faire la **navette** entre le noyau et le cytoplasme. On retrouve également un domaine **PB1** (Phox and Bem 1), qui permet les interactions protéine-protéine entre p62 et certaines protéines kinases, ainsi que sa **polymérisation**, un domaine **UBA** (Ub-associated) permettant les interactions avec les **protéines ubiquitinylées** et un domaine **LIR** (LC3-interacting region). Grâce au domaine **LIR**, p62 peut interagir avec les membres de la famille ATG8, à savoir LC3, mais aussi les membres **GABARAP** (Johansen et Lamark 2011). Ces adaptateurs vont donc sélectionner des **substrats ubiquitinylés**, soit des protéines libres, soit des protéines présentes sur les organites à recycler, par exemple sur les mitochondries, et apporter ces éléments à dégrader au niveau de la **vésicule d'autophagie** au stade autophagosome ou au niveau du **protéasome** par exemple pour les protéines libres.

En conclusion, les protéines adaptatrices participent à la dégradation, de protéines malformées, d'agrégats ou complexes protéiques, mais également à la

xénophagie, c'est-à-dire l'élimination des pathogènes intracellulaires, et à la mitophagie, soit l'élimination des mitochondries endommagées (Johansen et Lamark 2011).

4) Autophagie et famille Bcl-2 :

Bien que l'**autophagie** soit associée à la **survie cellulaire**, elle peut également promouvoir la **mort**. En effet, quand l'autophagie est excessive, elle peut passer un point de non-retour et conduire la cellule à la mort (Esteve et Knecht 2011), suite à la **dégradation de composants essentiels à la survie**. Nous n'allons pas dans ce paragraphe décrire tous les liens entre autophagie et apoptose, mais seulement ceux avec les protéines de la famille Bcl-2. De plus, certains auteurs ont suggéré que si le volume des vacuoles autophagiques était égal ou supérieur au reste du cytoplasme, cela conduirait la cellule irréversiblement à la mort (Esteve et Knecht 2011).

Par ailleurs, un **lien moléculaire** entre l'apoptose et l'autophagie a été mis en évidence, notamment via la protéine **Bécline-1**. En effet, elle possède un **domaine BH3**, ce qui la rattache donc aux membres de la **famille Bcl-2** (Maiuri *et al.* 2007), ce domaine BH3 permet à Bécline d'**interagir** avec les **membres anti-apoptotiques** (Bcl2, Bcl-XL et Mcl-1) (Maiuri *et al.* 2007; Lindqvist et Vaux 2014; Sinha et Levine 2009) (Figure 17).

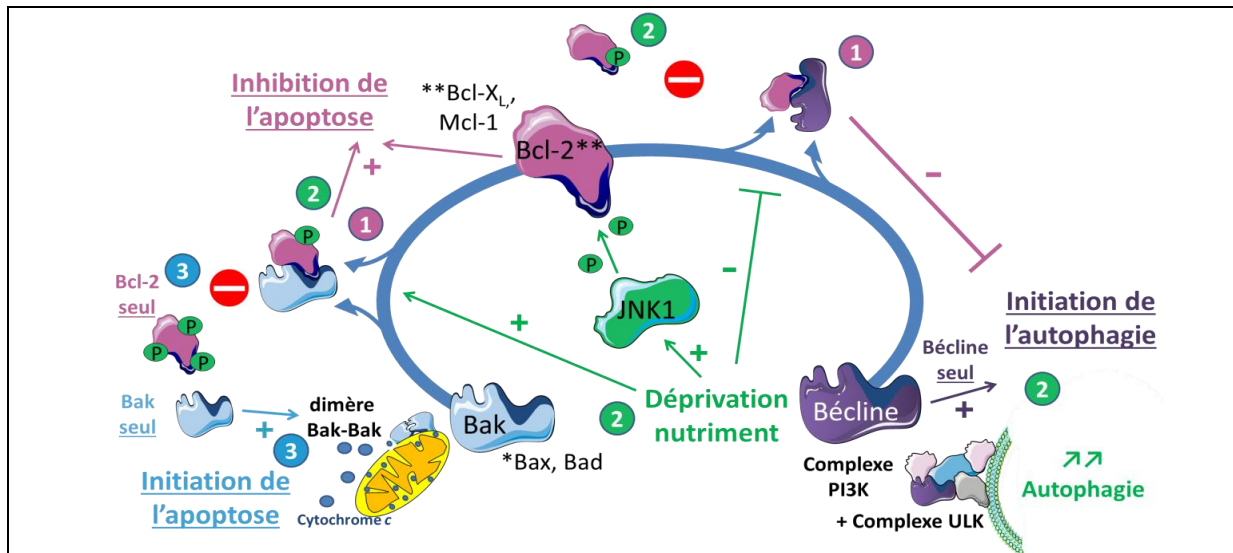


Figure 17 : Bécline-1 et les protéines de la famille Bcl-2

La protéine Bécline-1, à droite, est essentielle à l'initiation de l'autophagie. De plus, elle possède un domaine BH3, qui lui permet d'interagir avec les protéines de la famille Bcl-2, au centre, Bcl-2, BCL-XL, et Mcl-1, inhibant l'autophagie (1). Les membres pro-apoptotiques, à gauche, interagissent également avec Bcl-2 (1), inhibant l'apoptose. En cas de stress, la kinase JNK1 va phosphoryler Bcl-2, ce qui induit une diminution du complexe Bécline/Bcl-2 et une augmentation du complexe Bcl-2/Bad. La protéine Bécline libre pourra être recrutée au niveau du complexe PI3K, et induire la formation des autophagosomes (2). Si ce stress dure trop longtemps, les protéines anti-apoptotiques continueront à être phosphorylées et ne pourront plus interagir avec les membres pro-apoptotiques, ce qui conduira la cellule vers la mort (3). D'après (Maiuri *et al.* 2007; Lindqvist et Vaux 2014; Sinha et Levine 2009).

Dans une situation normale, la protéine **Bécline** interagit avec les membres anti-apoptotiques **Bcl2**, **BCL-XL** et **Mcl-1** via leurs domaines **BH3** respectifs. Ceci induit la **séquestration de Bécline** et ainsi une **inhibition de l'autophagie** (1, [Figure 17](#)), mais les membres anti-apoptotiques interagissent également avec les membres pro-apoptotiques protégeant ainsi la cellule de la mort cellulaire intrinsèque.

Lors d'une **privation de nutriments**, l'activité de la protéine kinase JNK1/MAPK8 (c-Jun N-terminal Kinase 1/ Mitogen-activated protein kinase 8) augmente. Elle va alors **phosphoryler Bcl-2**, ce qui entraîne une **diminution** du complexe **Bécline-1/(Bcl-2/Bcl-X_L)** et une **augmentation** du complexe **Bad/Bcl-X_L** (2, [Figure 17](#)). La protéine **Bécline libre** peut donc être recrutée à la membrane d'initiation pour former le complexe PI3K, permettre la **formation des autophagosomes**, et ainsi induire une **augmentation de l'autophagie** (2, [Figure 17](#)) (Maiuri *et al.* 2007; Sinha et Levine 2009, Lindqvist et Vaux 2014). Si la privation en nutriments **dure trop longtemps**, la protéine Bcl-2 va être **hautement phosphorylée**. Cela va également lui **enlever ses propriétés anti-apoptotiques**, puisque ce haut taux de phosphorylation, l'empêche d'interagir avec les membres pro-apoptotiques, ce qui conduira la cellule vers une **mort par apoptose** (3, [Figure 17](#)) (Maiuri *et al.* 2007; Sinha et Levine 2009, Lindqvist et Vaux 2014).

De plus, Bécline-1 peut également être clivée par les caspases, après un stimulus apoptotique, ce qui induit une autre localisation des parties clivées de Bécline-1. En effet, la partie N-terminale de Bécline-1 se retrouve accumulée dans le noyau, alors que la partie C-terminale rejoint la mitochondrie. Ce changement de localisation induit une perte de la fonction autophagique de Bécline-1, mais elle entraîne également une amplification du signal apoptotique par le relargage d'autres composés pro-apoptotiques de la mitochondrie (Djavaheri-Mergny, Maiuri, et Kroemer 2010).

En conclusion, l'autophagie et l'apoptose sont deux processus étroitement régulés, grâce aux différents équilibres des complexes formés qui, s'ils sont en excès, conduiront la cellule à la survie, l'autophagie, l'apoptose ou encore la mort autophagique.

5) [Autophagie et processus de différenciation cellulaire :](#)

L'autophagie a été décrite comme étant impliquée dans plusieurs processus de différenciation : au cours de l'embryogenèse (étapes précoces après la fécondation), au

cours de la différenciation des adipocytes, mais aussi au maintien et à la différenciation des cellules sanguines (Mizushima et Levine 2010). Nous ne développerons pas dans ce paragraphe toutes les différenciations cellulaires où l'autophagie est impliquée, mais seulement quelques exemples, permettant de comprendre l'importance de l'autophagie au cours de la différenciation des cellules hématopoïétiques.

Les **cellules souches hématopoïétiques** (HSC) sont dans un état quiescent dans la niche hématopoïétique. Après un stimulus, certaines cellules vont s'auto-renouveler et se différencier en diverses cellules matures. L'autophagie permet à ces cellules à longue durée de vie **d'être protégées de certains signaux de stress**, comme la privation en nutriments, le manque d'oxygène ou la diminution de cytokines (Evangelisti *et al.* 2015). Chez des souris **invalidées pour le gène ATG7** (activation de LC3-I, Figure 15), on observe une **diminution des progéniteurs myéloïdes et lymphoïdes**, une sévère anémie, et une diminution des lymphocytes T, B et Natural Killer (Evangelisti *et al.* 2015). De plus, la stimulation par G-CSF, induit une augmentation du nombre de vésicules LC3 (autophagosome) chez les neutrophiles, ainsi que, chez les cellules souches hématopoïétiques humaines et de souris, (Leveque-El Mouttie *et al.* 2015). Par ailleurs, les HSC ne forment plus de colonies après stimulation lorsque l'autophagie est bloquée (Evangelisti *et al.* 2015). De plus, lors de la **différenciation des réticulocytes** embryonnaires en globules rouges, les **mitochondries** sont éliminées par autophagie médiée par Ulk1 et ATG5. Lorsque ces protéines sont inhibées, on observe dans ces réticulocytes une accumulation des mitochondries qui seront toujours présentes dans les érythrocytes matures (Honda *et al.* 2014; Mizushima et Levine 2010). Par ailleurs, il a été montré que la **différenciation terminale du monocyte en macrophage** nécessitait l'activation des **caspases** mais également **l'activation de l'autophagie**, notamment pour l'acquisition de la capacité à phagocyter (Jacquel *et al.* 2012).

Les Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM), sont un ensemble de cancers de la moelle osseuse associé à un blocage de la différenciation myéloïde (cf. 2^e partie. I, p. 48). Dans le cas d'une de ces LAM, la Leucémie Aiguë promyélocytaire, on met en évidence un réarrangement chromosomique particulier, conduisant à la production d'une protéine chimère **PML-RAR α** . La thérapie consiste à réinduire **la différenciation** par un **traitement à l'arsenic ou à l'ATRA** (All Trans Retinoic Acid) (cf. 2^e partie I.B.1.b, p.

58). Il a été montré que ce traitement induit une **augmentation du flux autophagique** et donc du **nombre de vésicules LC3B**. De plus, la protéine chimère **PML-RAR α** **colocalise** avec **p62**, **LC3b** (autophagosome) et **LAMP2** (autophagolysosome) (Wang *et al.* 2011). L'**inhibition de p62** conduit à une **altération de la dégradation de PML-RAR α** et une **diminution des marqueurs de différenciation** (Wang *et al.* 2011). Cette différenciation s'accompagne donc également de l'**élimination par autophagie, de la protéine chimère PML-RAR α** .

L'ATRA induit aussi une augmentation de Bécline-1, qui n'est pas nécessaire à la différenciation, mais pourrait permettre la survie de ces cellules : par interaction de Bécline-1 avec les membres pro-apoptotiques, les membres anti-apoptotiques seraient alors libérés (Trocoli *et al.* 2011) (Figure 17).

En conclusion, **l'autophagie est essentielle à la différenciation cellulaire.**

6) Autophagie et système immunitaire :

L'autophagie permet au système immunitaire de maintenir ses fonctions essentielles pour la survie de l'organisme, mais également aux cellules de **détruire des pathogènes intracellulaires** (bactérie, virus) par xénophagie (cf. 1^{re} partie III.B, p. 30). Dans ce paragraphe nous détaillerons uniquement les grandes lignes de l'implication de l'autophagie dans le système immunitaire, pour une meilleure compréhension de son rôle suite à l'infection par le virus de l'immunodéficience acquise (cf. p. 78). De plus, l'autophagie permet la génération de peptides bactériens ou viraux dans les **cellules présentatrices d'antigène (CPA)** comme les cellules dendritiques et les macrophages. Pour les **cellules T**, l'autophagie a donc un rôle direct et indirect pour le maintien de leur fonction immunitaire, puisque ces peptides seront présentés, dans le **CMH de classe II** par les CPA (Cohen-Kaplan *et al.* 2016) et reconnus par le récepteur des cellules T (TCR). Par ailleurs, durant l'**inflammation**, l'autophagie peut **diminuer la sécrétion d'IL-1 β** , soit par recapture directe, soit en agissant sur la « clairance » de l'inflammasome, ou encore en contrôlant sa sécrétion (Dinkins, Pilli, et Kehrl 2015). Par ailleurs, il a été montré que toutes ces cellules n'ont pas le même taux basal d'autophagie. En effet, le macrophage, par exemple, a un niveau d'autophagie basal très élevé et de ce fait est un bon modèle d'étude de l'autophagie. Cependant il a été montré que certaines bactéries, comme *Mycobacterium tuberculosis* ont développé des stratégies afin d'échapper à cette

"clearance" en inhibant ce mécanisme (Gutierrez *et al.* 2004). Des **stratégies d'échappement** à l'autophagie ont aussi été mis en évidence dans le cas de l'infection par le VIH, (Sagnier *et al.* 2015; Daussy, Beaumelle, et Espert 2015; Borel *et al.* 2015) (cf. 2^e partie. II, p. 67).

En conclusion, la régulation des armes de l'immunité innée ou adaptative est due en partie à des **processus de dégradation, soit par le protéasome, soit par autophagie**. Les **systèmes de recyclage cellulaire, l'autophagie et le système Ubiquitine Protéasome**, sont **essentiels au fonctionnement du système immunitaire**.

C. Interactome des produits du gène *GALIG* :

La recherche de partenaires moléculaires des protéines codées par *GALIG* est une des étapes importantes permettant de comprendre et de caractériser plus finement son mécanisme d'action. Une approche par la technique du **double hybride chez la levure** (Yeast Two Hybrid System) a tout d'abord été tentée. Malheureusement, très peu de protéines se sont avérées interagir avec les produits du gène *GALIG* : aucune avec la Mitogaligine, et une quinzaine pour la Cytogaligine. A noter que plusieurs de ces protéines ont un rôle dans le système ubiquitine protéasome. Aucune des protéines n'était mitochondriale, ceci est sans doute dû au fait que le système double-hybride classique dans la levure n'est pas adapté à la détection des interactions entre protéines membranaires et en particulier aux protéines insérées dans les membranes mitochondriales. En effet le système double hybride de levure, nécessite que la protéine appât puisse être transloquée dans le noyau

La seconde approche, *via* la technique de test d'interaction **Luc-PCA** (Luciferase protein complementation assay), (Remy et Michnick 2006) nous a permis de mettre en évidence plusieurs partenaires possibles (Figure 18). Ce système repose sur la reconstitution de l'activité luciférase par 2 sous-unités de *Gaussia* luciférase humanisée (hGLuc1 et hGLuc2), fusionnées aux 2 protéines à tester. S'il y a interaction entre les protéines testées (dans l'exemple, A et C), les 2 sous-unités luciférase sont suffisamment proches pour reconstituer une activité enzymatique et l'ajout de coelentérazine, substrat de l'enzyme, va conduire à une émission de lumière détectable à 480 nm (Figure 18). Par contre, si les 2 protéines testées (dans l'exemple, A et B) n'interagissent pas, l'activité

luciférase n'est pas reconstituée : aucune émission de lumière ne sera détectée après l'ajout du substrat.

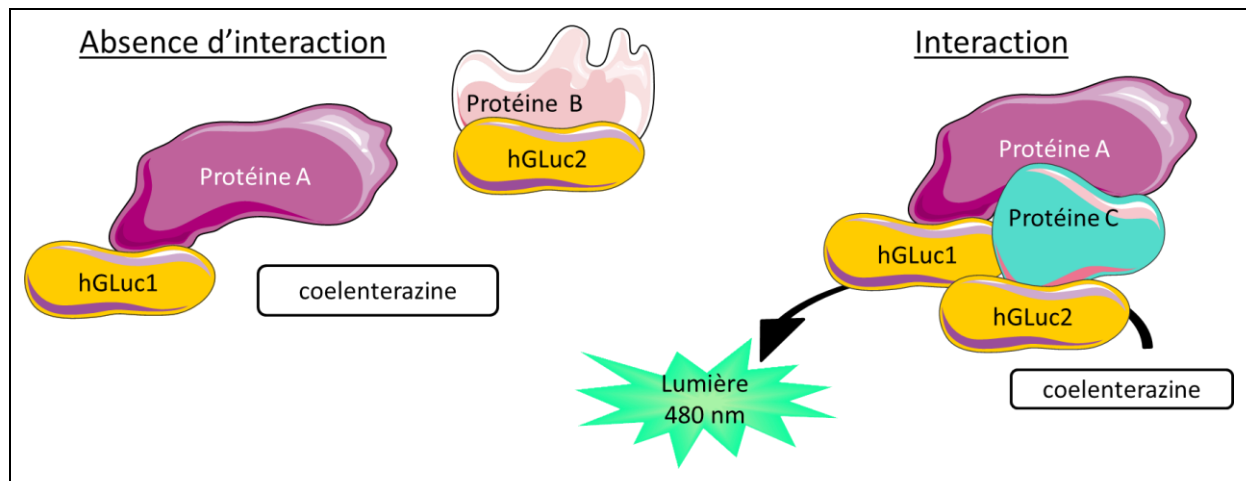


Figure 18 : Technique Luc-PCA (Luciferase protein complementation assay)

Les sous-unités de la luciférase hGLuc1 et hGLuc2, sont fusionnées aux protéines d'intérêts A, B ou C. En absence d'interaction, à gauche lorsque l'on rajoute le substrat de la luciférase, aucune émission lumineuse n'est détectée. En cas d'interaction, à droite, les protéines se rapprochent, ce qui permet aux 2 sous-unités de la luciférase de reconstituer une activité enzymatique. Lorsque le substrat est ajouté, il est métabolisé par la luciférase ce qui conduit à une émission de lumière à 480 nm (Remy et Michnick 2006).

Les premières expériences qui ont permis de valider que ce test pouvait s'appliquer aux protéines mitochondriales ont été effectuées via l'étude de protéines connues pour interagir entre elles et impliquées notamment dans l'apoptose comme Bax, Bak ou encore Mcl-1.

La Cytogaligine peut former un **homodimère** avec elle-même ou un **hétérodimère** avec la Mitogaligine. Néanmoins, l'étude des Galigines s'avère complexe. En effet, la **Mitogaligine semble instable**, puisque très vite dégradée au sein de la cellule. C'est pourquoi la plupart des tests d'interaction la concernant nécessitent l'ajout d'un inhibiteur du protéasome, le **MG132**, qui va permettre sa stabilisation dans le cytosol (Robinet 2010).

Bien que Bcl-X_L et Mcl-1 inhibent la mort induite par les produits du gène *GALIG* (Duneau *et al.* 2005; Mollet *et al.* 2013), **aucune interaction** entre la Cytogaligine et les **protéines impliquées dans l'apoptose** Bax, Bad, Bcl-2, Bcl-X_L et Mcl-1 n'a été mise en évidence.

Il a été montré que la Cytogaligine pouvait interagir avec les **domaines « Leucine-zipper »** présents notamment dans les facteurs de transcription. Parmi les protéines mitochondriales à « leucine-zipper », nous avons pu mettre en évidence une interaction

avec **LETM1** (Leucine zipper-EF-hand-containing transmembrane protein 1). LETM1 a été identifiée comme étant un transporteur calcique mitochondrial (Jiang, Zhao, et Clapham 2009). LETM1 et la Cytogaligine interagissent avec **THEM4** (THEM4, Thioesterase Superfamily Member 4 ou CTMP, Carboxyl-Terminal Modulator Protein). LETM1/THEM4 forme un complexe mitochondrial, qui intervient dans la fission mitochondriale médiée par Opa1 (optic atrophy type-1) (Piao *et al.* 2009). Or, Mcl-1 qui inhibe la mort induite par les produits du gène *GALIG*, même si elle n'interagit pas directement avec les Galigines, interagit avec le complexe **THEM4/LETM1**. Ces deux interactions Cytogaligine/LETM1 et Mcl-1/LETM1 pourraient expliquer les oppositions fonctionnelles mort/survie entre les produits du gène *GALIG* et la protéine Mcl-1 (Figure 19). De plus, la **Cytogaligine** interagit également avec la protéine suppresseur de tumeur **p53**. La protéine p53 est impliquée dans les **mécanismes de réparation de l'ADN**, en activant la transcription de gènes au niveau du **cycle cellulaire**. Si la réparation est impossible, l'apoptose est déclenchée. Par ailleurs, des expériences de co-transfection ont montré que l'expression du gène de la luciférase sous le **contrôle du promoteur de *GALIG***, était **diminuée** en présence de p53 (Raimond *et al.* 1995). Cette interaction **p53/Cytogaligine** pourrait **inhiber la fonction de facteur de transcription de p53** et notamment exercer un **rétrocontrôle positif** sur le gène *GALIG*.

Des interactions entre les Galigines et l'**α-synucléine**, protéine impliquée dans les corps de Lewy, caractéristiques de la **maladie de Parkinson**, ont également été mises en évidence. Cette protéine qui peut être à la fois cytosolique et mitochondriale, induit une cytotoxicité lorsqu'elle s'agrège. Cet aspect est l'un des objets de la thèse de Saïd El Haddad, ayant pour thématique l'expression du gène *GALIG* dans la maladie de Parkinson. Des études ont montré une **dérégulation de l'autophagie** chez les **patients** et les **modèles d'études de la maladie de Parkinson** (Lynch-Day *et al.* 2012), c'est pourquoi nous avons recherché des partenaires moléculaires des protéines du gène *GALIG* impliqués dans ces processus cellulaires.

La **Cytogaligine** interagit avec les protéines **GABARAP**, **LC3B** et la protéine adaptatrice **p62/SQSTM1** qui sont impliquées dans les **étapes précoces de la formation de la vésicule de macro-autophagie** (cf. 1^{re} partie III.B.2.c, p. 32). De plus, la Cytogaligine interagit avec les protéines **Hsc70** impliquées dans l'**autophagie médiée par les**

chaperonnes. Elle interagit également avec les protéines **HUWE1** et **UBQLN4** (Ubiquilin-4) qui interviennent dans le **Système Ubiquitine Protéasome** (cf. 1^{re} partie III.B.1, p. 25), ces deux dernières interactions ayant également été mises en évidence par le système double hybride. La protéine **HUWE1**, une **ubiquitine E3 ligase**, qui possède également un **domaine BH3**, qui lui permet d'interagir avec **Mcl-1** (Zhong *et al.* 2005), mais pas avec les autres membres de la famille Bcl-2. Cette interaction engendre l'**ubiquitination** de Mcl-1 et donc sa **dégradation par le protéasome**. On peut envisager que cela pourrait induire une dérégulation de la balance apoptotique, par l'élimination d'une protéine qui protège la membrane mitochondriale, et qui inhibe la mort induite par les produits du gène **GALIG**.

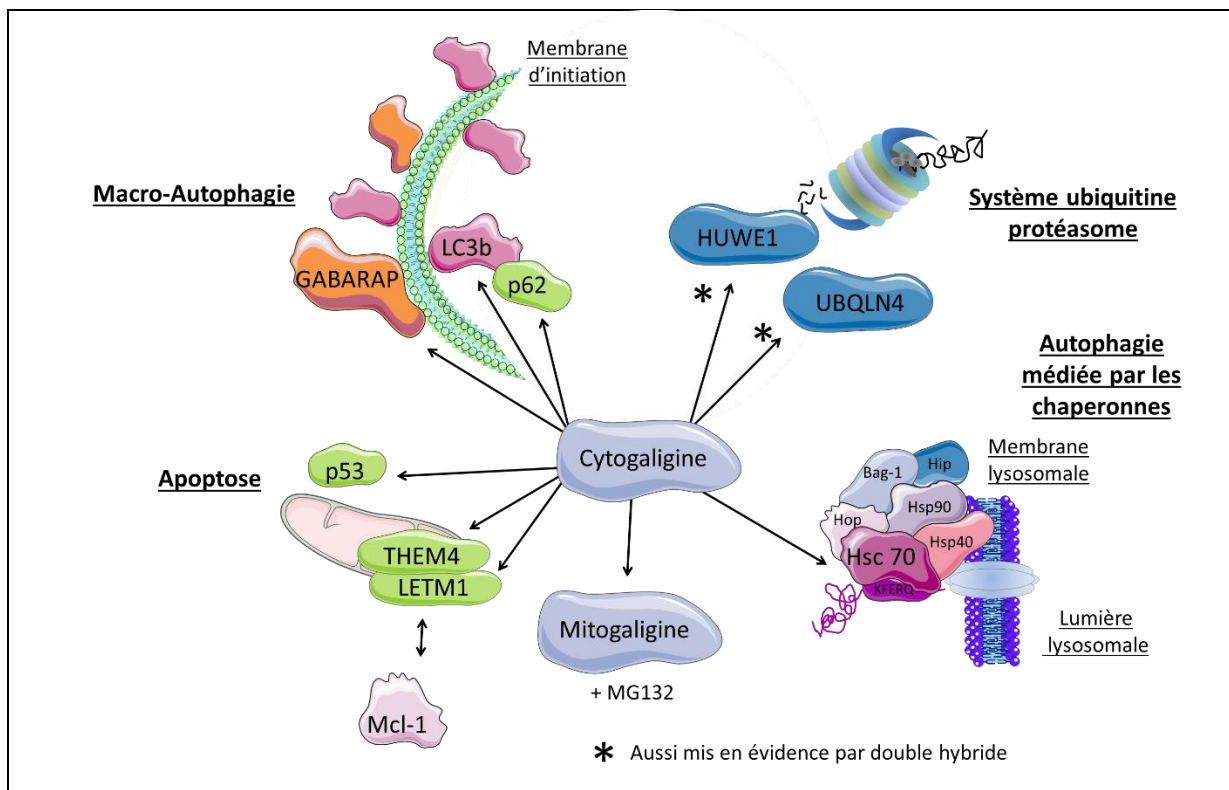


Figure 19 : Interactome de la Cytogaligine

La Cytogaligine interagit avec les protéines p53 et LETM1/THEM4 impliquées dans l'apoptose, Mcl-1 qui s'oppose fonctionnellement à GALIG, interagit avec le complexe THEM4/LETM1. La Cytogaligine interagit avec HUWE1 et UBQLN4 impliquées dans le système ubiquitine protéasome. Elle interagit aussi avec Hsc70 impliquée dans l'autophagie médiée par les chaperonnes. Elle interagit également avec les protéines LC3B, GABARAP et p62 impliquées dans la formation de la vésicule d'autophagie.

En conclusion, la Cytogaligine interagit avec plusieurs partenaires impliqués dans l'autophagie et le Système Ubiquitine Protéasome (Figure 19).

Ces données récentes permettent pour la première fois de fournir des pistes quant au mécanisme d'action des produits du gène *GALIG*. Deux questions sont aujourd'hui posées :

- Existe-t-il d'autres protéines, impliquées dans l'autophagie et UPS, capables d'interagir avec la Mitogaligine et la Cytogaligine ?
- Quel est le rôle, s'il y en a un, des Galigines dans l'exécution de ces deux processus de recyclage ?

Introduction 2^e partie : *GALIG* en conditions pathologiques

I. Défaut de différenciation : cas des leucémies Aiguës Myéloïdes :

Les travaux antérieurs sur l'expression du gène *GALIG* ont montré qu'il était plus faiblement exprimé dans les **cellules immatures de la moelle osseuse (MO)** que dans les **cellules matures du sang**. Cette variation d'expression peut suggérer que *GALIG* jouerait un **rôle dans la différenciation cellulaire**. De plus, *GALIG* est **sous-exprimé** dans les cellules de la moelle osseuse de patients atteints de **Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM)**, pathologie associée à un blocage de la différenciation cellulaire, ce qui renforce l'hypothèse que le gène *GALIG* exercerait un rôle dans la différenciation cellulaire.

Les **LAM** regroupent différents cancers touchant la lignée myéloïde. Toutes les LAM sont caractérisées par une **augmentation** du nombre de cellules **myéloïdes immatures cancéreuses dans la moelle osseuse**, ce qui induit fréquemment des **troubles de l'hématopoïèse** normale avec une **granulopénie** (déficit en granulocytes), une **thrombopénie** (déficit en plaquettes) et/ou une **anémie** (déficit en globules rouges) avec ou sans **leucocytose** (augmentation des globules blancs). Les LAM sont donc des cancers de la moelle osseuse, mais il s'agit d'un ensemble **très hétérogène**, pouvant affecter les cellules myéloïdes au niveau des différents lignages, comme les **lignages érythro-plaquettaire, granulo-monocytaire**, mais également à différents stades de différenciation : de la **cellule progénitrice** commune myéloïde qui correspond à la cellule myéloïde la plus immature jusqu'à des stades plus différenciés dans chaque lignage. (Löwenberg, Downing, et Burnett 1999).

A. Classification initiale, par stade de différenciation des blastes

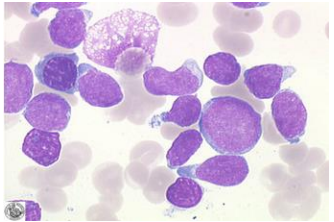
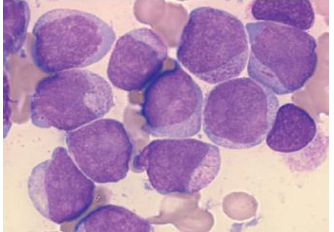
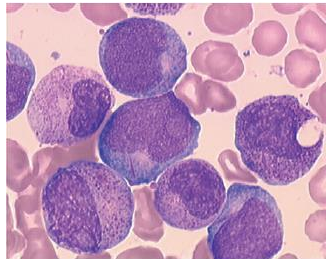
Les LAM Représentent environ 70% des leucémies aiguës (LA). Elles affectent aussi bien les enfants (15-20% des LA) que les adultes (80-85% des LA) (Preudhomme, Llopis, et Boissel 2012). Jusqu'aux années 1970, le diagnostic était basé uniquement sur l'examen pathologique et cytologique de la moelle osseuse et du sang. L'affinement du diagnostic avec les différents sous-types de LAM et les avancées thérapeutiques ont permis d'améliorer le taux de survie pour les patients de moins de 65 ans (Löwenberg, Downing, et Burnett 1999).

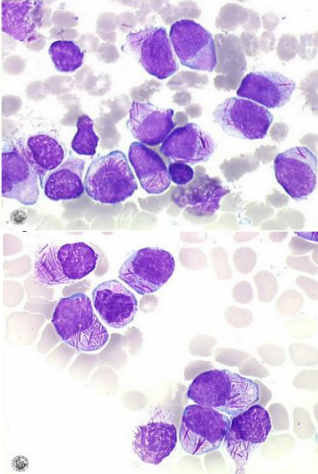
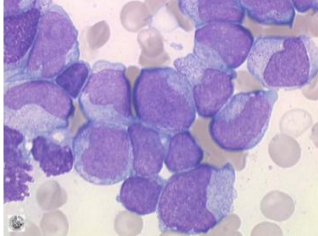
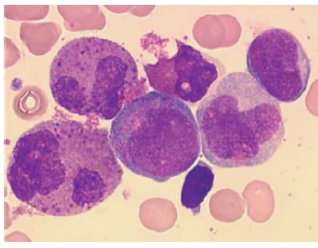
La **première classification** émise par un groupe de 7 chercheurs Français, Américains et Britanniques (FAB), a permis d'établir la 1^{ière} nomenclature internationale pour les leucémies Aiguës Myéloïdes et Lymphoïdes. Cette classification, appelée **FAB** (Bennett *et al.* 1976), repose sur l'étude de plus de 150 cas de leucémie aiguë et de maladies pouvant être confondues avec la leucémie aiguë. Les LAM étant un ensemble hétérogène de pathologies, ce classement a été capital pour le choix du traitement le plus adapté et pour la comparaison des différents essais cliniques entre eux afin d'améliorer le traitement des différents sous-groupes de patients. Cette classification repose sur une coloration au Romanowsky des cellules sanguines, cette technique ayant évolué par la suite par la coloration au **May-Grünwald Giemsa (MGG)**. Des paramètres cytochimiques (test des activités myéloperoxidase et estérase), des marqueurs immunophénotypiques spécifiques ainsi qu'une analyse caryotypique viendront ensuite compléter le diagnostic. Ils ont pu définir **3 types de leucémies aiguës lymphoblastiques** (non détaillé), et **6 types de leucémies aiguës myéloïdes (M1, M2, M3, M4, M5 et M6)** en fonction de l'axe de la différenciation dans laquelle la cellule est engagée et son degré de maturation. Cette classification a été révisée par les auteurs en 1985 (Bennett *et al.* 1985b), puis y ont été ajoutées la **LAM-M7** (Bennett *et al.* 1985a) et la **LAM-MO** en 1991 (Bennett *et al.* 1991).

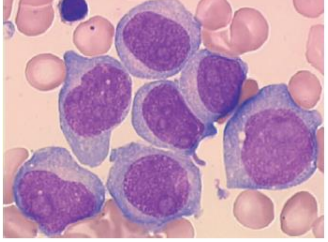
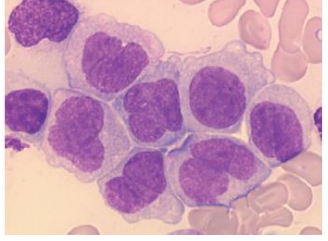
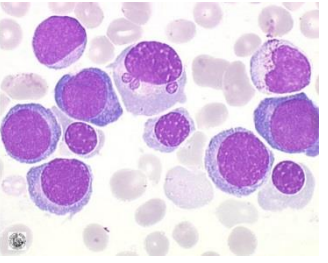
Type FAB	Types de cellules leucémiques	(% de cas)	Tests enzymatiques		Analyse caryotypique	
			Myélo peroxydase	Estérase	Translocation et réarrangement associés	[% de cas]
M0	Indifférenciées	(2-3%)	-	-	inv(3q26) et t(3 ;3)	[1%]
M1	Myéloblastes sans différenciation	(15-20%)	+	-		
M2	Myéloblastes avec différenciation	(25-30%)	+	-	t(8;21) t(6;9)	[40%] [1%]
M3	Promyélocytes à corps d'Auer en fagot	(5-10%)	+	-	t(15;17) t(11;17) t(5;17)	[98%] [1%] [1%]
M4	Myélomonocytes	(20%)	+	+	11q23 Inv(3q26) et t(3;3) t(6;9)	[20%] [1%] [1%]
M4Eo	Myélocytes avec éosinophiles anormaux	(5-10%)	+	+	Inv(16) et t(16;16)	[80%]
M5	Monoblastes et (pro)monocytes anormaux 5a : si monoblastes sup 80% 5b : si promonocytes et monocytes anormaux sup 80%	(2-9%)	-	+	11q23 t(8;16)	[20%] [2%]
M6	Erythroblastes	(3-5%)	+	-		
M7	Mégacaryocytes ayant au moins une glycoprotéine	(3-12%)	-	+	t(1;22)	[5%]

Tableau 1 : Classification Franco-Américano-Britannique (FAB) des sous-types de Leucémies Aiguës Myéloïdes
1^{re} colonne : type de LAM classification Franco-Américano-Britannique, 2^e colonne : type de cellules leucémiques, 3^e colonne : % de cas représenté dans les LAM, 4^e et 5^e colonne : activité myéloperoxydase et estérase, + : positive, - : négative, 6^e colonne : réarrangement caryotypique associé, 7^e colonne : % de cas par LAM possédant ce réarrangement.
D'après (Bennett *et al.* 1976, 1985b, 1985a, 1991; Löwenberg, Downing, et Burnett 1999)

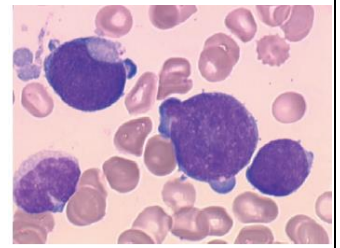
Parmi les LAM, on distingue, **d'après la classification FAB** : (Bennett *et al.* 1976, 1985a, 1985b, 1991).

☞ La LAM-M0 : Leucémie myéloblastique aiguë à différenciation <u>minimale</u>. Il s'agit de la LAM la moins différenciée. Elle représente 2 à 3% du nombre de cas de LA. Les cellules sont positives à certains antigènes myéloïdes, et sont négatives pour les réactions d'estérase et de myéloperoxydase. C'est une Leucémie Aiguë, sans signe morphologique de différenciation myéloïde (absence de granulation et de corps d'Auer, fusion de plusieurs granulations azurophiles).	 Blastes dits « en miroir à main » (« Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers » 2016)
☞ La LAM-M1 : Leucémie myéloblastique aiguë sans maturation. Avec quelques marques de différenciation granulocytaire, elle représente environ 15 à 20% des cas de leucémie aiguë myéloïde. Les blastes en coloration de Romanowsky sont sans granule et contiennent un ou plusieurs nucléoles. Ils sont myéloperoxydase positifs et estérase négatifs, et une proportion variée des blastes contiennent des granules azurophiles et/ou des corps d'Auer.	 Blastes de petite à moyenne taille, un blaste avec corps d'Auer (Preudhomme, Llopis, et Boissel 2012)
☞ La LAM-M2 : Leucémie myéloblastique aiguë avec maturation. A la différence de la LAM-M1, on observe un début de maturation des cellules. C'est la plus fréquente, elle représente 25 à 30% des cas de LAM. Les blastes sont souvent nucléés et ont une quantité variable de cytoplasme avec beaucoup de granules azurophiles et/ou de corps d'Auer. Les blastes sont myéloperoxydase positifs et estérase négatifs, et dans plus de 40% des cas, on observe une translocation t(8;21), entre le facteur de transcription CBFα/AML1/RUNX1 (Core-binding factor subunit alpha-2/Acute Myeloid Leukemia 1/Runt-related transcription factor 1) et ETO/RUNX1T1/CBFα2T1 (eight twenty one/RUNX1 Translocation Partner 1/CBF-a Translocation Partner 1). Ceci induit un dysfonctionnement du facteur de transcription CBFβ/CBFα (cf. 2^e partie.I.B.1.a, p. 56). Une autre translocation qui touche cette fois CBF-β est retrouvée dans les LAM-M4Eo, voir ci-après.	 LAM avec t(8;21), blastes à grains et à corps d'Auer (Preudhomme, Llopis, et Boissel 2012)

☞ <u>La LAM-M3 : Leucémie aiguë promyélocytaire.</u> On observe une maturation des cellules, qui sont au stade promyélocyte. Elle représente environ 5 à 10% des cas de LAM. Le promyélocyte est une grosse cellule, qui, dans le lignage normal, est granulocytaire. Elle contient de nombreux granules azurophiles et son noyau est de grande taille, souvent réniforme ou polylobé. On retrouve des corps d'Auer mais sous la forme de fagots, caractéristiques de ce type de LAM. Les analyses cytogénétiques ont pu mettre en évidence dans 98% des cas une translocation des gènes PML-RARα t(15;17) (PML :, RARα :). Deux autres gènes peuvent être juxtaposés à RARα (PLZF- RARα, NPM-RARα) et représentent les 2% restants. Ainsi, les traitements à l'acide rétinoïque et ses dérivés, ou à l'arsenic, permettent un meilleur taux de rémission pour ces patients. Quel que soit le réarrangement, le gène codant pour le récepteur à l'acide rétinoïque est impliqué, ce qui explique l'existence de stratégies thérapeutiques particulières pour ce type de LAM (cf. 2^e partie.I.B.1.b, p. 58).	 Blastes contenant de nombreux fagots d'Auer (Photo, en ligne « Laboratoire d'Hématologie Cellulaire, du CHU d'Angers » 2016)
☞ <u>La LAM-M4 : Leucémie aiguë myélomonocytaire.</u> Elle représente environ 20% des cas de LAM. Les blastes sont myéloperoxidase et estérase positifs, et on observe des cellules granulocytaires et monocytaires en proportion variable qui excèdent 20% des cellules nucléées de la moelle osseuse. Parmi les patients, 20% montrent des altérations chromosomiques au niveau du bras q23 du chromosome 11 correspondant au gène MLL (Mixed-Lineage Leukemia), qui conduiront à la production d'une protéine chimère. Plusieurs loci peuvent participer à ces altérations, et les principaux sites impliqués sont 6q27, 9p22, 10p12, 17q21 ou 19p13.1.	 Excès de blastes, monocytes et granulocytes (rares ici) (Photo, en ligne « Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers » 2016)
• <u>La LAM-M4Eo : Leucémie aiguë myélomonocytaire avec éosinophiles anormaux.</u> Elle représente environ 5 à 10% des cas de LAM, les blastes sont myéloperoxidase et estérase positifs. Ils sont associés à une maturation éosinophile anormale. Dans 80% des cas, on note une	

inversion ou une translocation du chromosome 16, qui aboutit à la fusion entre le gène du facteur de transcription CBFβ (Core Binding Factor Subunit β) et MYTH11 (myosin heavy chain 11). Cette protéine chimère induit une répression de l'activité transcriptionnelle médiée par CBFβ/CBFα, par séquestration de celui-ci sous forme de complexe inactif dans le cytoplasme. Comme la LAM-M2, ce réarrangement conduit à un défaut d'activité du facteur de transcription CBFβ/CBFα.	Blastes myéloïdes, précurseurs monocytaires, et éosinophiles anormaux (Photo, (Preudhomme, Llopis, et Boissel 2012))
La LAM-M5 : <u>Leucémie aiguë monocyttaire</u>. Elle représente environ 2 à 9% des cas de LAM. Les blastes sont myéloperoxidase et estérase négatifs. Dans 20% des cas, il s'agit d'une altération du gène MLL en position 11q23. Les cellules leucémiques sont principalement des monoblastes, des promonocytes et des monocytes, mais on observe une proportion plus élevée de monocytes dans le sang que dans la moelle osseuse. Il existe 2 formes de LAM 5 : la LAM 5a, avec la présence de monoblastes indifférenciés et la forme 5b, avec la présence majoritairement de blastes différenciés, monocytaires.	 LAM 5a, secondaire à une chimiothérapie, avec le cytoplasme étendu et basophile, contour nucléaire régulier  LAM 5b, blastes de grandes tailles avec cytoplasme étendu, de basophilie modérée, avec de fines granulations. Le contour nucléaire est irrégulier avec des replis (Photo (Preudhomme, Llopis, et Boissel 2012))
La LAM-M6 : <u>Leucémie aiguë érythrocytaire</u>. Elle représente environ 3 à 5% des cas de LAM, et touche la voie érythrocytaire. Deux sous-types sont reconnus en fonction de la présence ou non d'une composante de cellules granuleuses : • <u>Erythroleucémie</u>, avec 50% de cellules érythroblastiques majoritaires et une composante granuleuse supérieure ou égale à 20%. • <u>Leucémie érythroïde pure</u>, prolifération uniquement de précurseurs érythroblastiques.	 Erythroblastes à divers stades de différenciation, (Photo, en ligne « Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers » 2016)

La **LAM-M7** : Leucémie aiguë mégacaryocytaire. Elle représente environ **3 à 12%** des cas de LAM, et touche la voie **plaquettaire**.



Blastes à différenciation mégacaryocytaire,
(Photo, (Preudhomme, Llopis, et Boissel 2012))

Les **LAM-M1**, **M2** et **M3** sont donc engagées puis bloquées dans la voie **granulocytaire**, les **M4** dans la voie **granulo-monocytaire**, les **M5** sont principalement **monocytaires**, les **M6** **érythrocytaires** tandis que les **M7** sont engagées dans la voie **plaquettaire** (Figure 20).

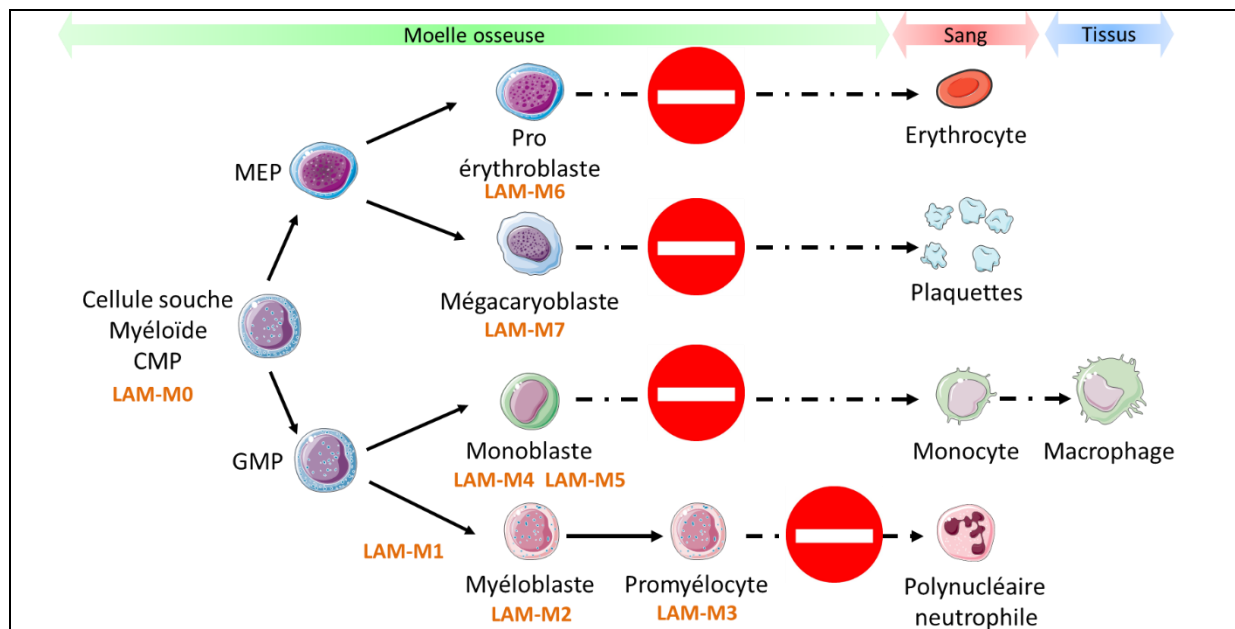


Figure 20 : Myélopoïèse et LAM type FAB

Les LAM-M0 correspondent à la forme la plus indifférenciée, la cellule souche myéloïde. Les LAM-M1, M2 et M3 sont engagées vers la voie granulocytaire, les M4 dans la voie granulo-monocytaire, les M5 sont principalement monocytaires, les M6 érythrocytaires tandis que les M7 sont engagées dans la voie plaquettaire. D'après (Bennett *et al.* 1976; Bennett *et al.* 1985a; Bennett *et al.* 1985b; Bennett *et al.* 1991)

B. Principaux réarrangements chromosomiques et mutations géniques :

Cette classification a évolué par la suite, notamment grâce aux progrès techniques en immunophénotypage et en cytogénétique. Les analyses cytogénétiques de la cellule leucémique ont permis de mettre en évidence des **aberrations chromosomiques** récurrentes. Certains de ces réarrangement sont caractéristiques d'un sous-type FAB, comme la translocation $t(15;17) (q23;q32)$, retrouvée seulement chez la LAM-M3, tandis que d'autres translocations telles que $t(8;21) (q22;q22)$ pour certaines LAM-M2, $t(8;16)$

(p11 ;p13) pour des LAM-M5, t(16;16) (p13;q22) ou l'inversion inv (16) (p13;q22) pour les LAM-M4Eo peuvent se retrouver chez des patients classés différemment en sous-type FAB. Ces sous-groupes moléculaires ont montré des caractéristiques cliniques et des réponses au traitement différentes par rapport aux patients issus du même groupe FAB, mais n'ayant pas les mêmes mutations. Ainsi, certaines de ces lésions chromosomiques ont été associées à un pronostic favorable, d'autres à des pronostics défavorables. La classification FAB des LAM n'intégrant que le stade de différenciation cellulaire s'avère donc non appropriée pour un grand nombre de cas incluant certains réarrangements chromosomiques.

Ceci a conduit l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS/WHO World Health Organization) à proposer une nouvelle classification en 2001, révisée en **2008** (*WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues / ed. by Steven H. Swerdlow [et al.] ; WHO. International Agency for Research on Cancer (IARC) 2008*). Dorénavant, le seuil de **blastose médullaire**, nombre de blastes présents dans la moelle osseuse, a été abaissé de 30 à **20 %**. Une nouvelle révision de cette classification de l'OMS 2008, vient de paraître (Arber *et al.* 2016), elle divise les LAM en 6 sous-groupes (Tableau 2) :

☞ 1. <u>Les LAM avec anomalies génétiques récurrentes</u> LAM avec t(8;21)(q22;q22.1) RUNX1/CBFa/AML1-RUNX1T1/ETO, (40%, FAB-M2) LAM avec inv(16)(p13.1q22) ou t(16;16)(p13.1q22) CBFβ-MYH11, (80%, FAB-M4Eo) LAP (Leucémie Aiguë Promyélocytaire) avec PML-RARα, (98%, FAB-M3) LAM avec t(9;11)(p21.3;q23.3) MLLT3-KMT2A, (FAB-M5) LAM avec t(6;9)(p23;q34.1) DEK-NUP214, (1%, FAB-M2) LAM avec inv(3)(q21.3q26.2) ou t(3;3)(q21.3;q26.2) GATA2, MECOM LAM (mégacaryoblastique) avec t(1;22)(p13.3;q13.3) RBM15-MKL1, (5%, FAB-M7) LAM avec BCR-ABL1 (entité provisoire) LAM avec NPM1 muté LAM avec mutation CEBPa biallélique LAM avec RUNX1 muté (entité provisoire)
☞ 2. <u>Les LAM avec anomalies associées aux myélodysplasies</u>
☞ 3. <u>Néoplasies myéloïdes post-chimiothérapie</u>
☞ 4. <u>Les LAM sans autre spécification par ailleurs (NOS), (donc non classées grâce aux anomalies génétiques présentées en (☞ 1).</u> LAM avec différenciation minimale (=FAB-M0) LAM sans maturation (=FAB-M1) LAM avec maturation (=FAB-M2) LA myélomonocytaire (=FAB-M4) LA monoblastique/ monocytaire (=FAB-M5) Leucémie érythroïde pure (=FAB-M6) LA mégacaryoblastique (=FAB-M7)

LA basophilique LA avec myélofibrose (panmyélose* aiguë)
α 5. <u>Sarcome myéloïde</u>
α 6. <u>Proliférations myéloïdes associées à la trisomie 21 constitutionnelle</u> Myélopoïèse transitoire anormale (TAM) Leucémie myéloïde associée au syndrome de Down
Tableau 2 : Classification OMS des Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM) D'après la révision de la classification de l'OMS de 2008 (Arber <i>et al.</i> 2016).

*Panmyélose : terme correspondant à un arrêt du développement ou au contraire un développement excessif de l'ensemble des éléments de la moelle osseuse.

1) Réarrangements chromosomiques principaux

Les analyses cytogénétiques ont permis la mise en évidence d'aberrations chromosomiques récurrentes. Ces différentes anomalies sont associées à un pronostic favorable, défavorable ou intermédiaire.

a) LAM avec réarrangement impliquant le facteur de transcription CBFα-CBFβ : **(t(8;21) RUNX1/AML1/CBFα-RUNX1T1/ETO, et inv(16) ou t(16;16) CBFβ-MYH11)**

Le gène RUNX1 (ou CBFα, AML-1), code la protéine CBFα qui, dans une situation normale, se lie à CBFβ. L'hétérodimère **CBFα-CBFβ** est un facteur de transcription, qui interagit directement avec une séquence d'ADN (TGTGGT) au niveau des régions régulatrices de certains gènes dont il activera la transcription, par le recrutement d'un co-activateur. Ces gènes cibles font partie des gènes essentiels au déroulement normal de l'hématopoïèse (Figure 21) (Löwenberg, Downing, et Burnett 1999).

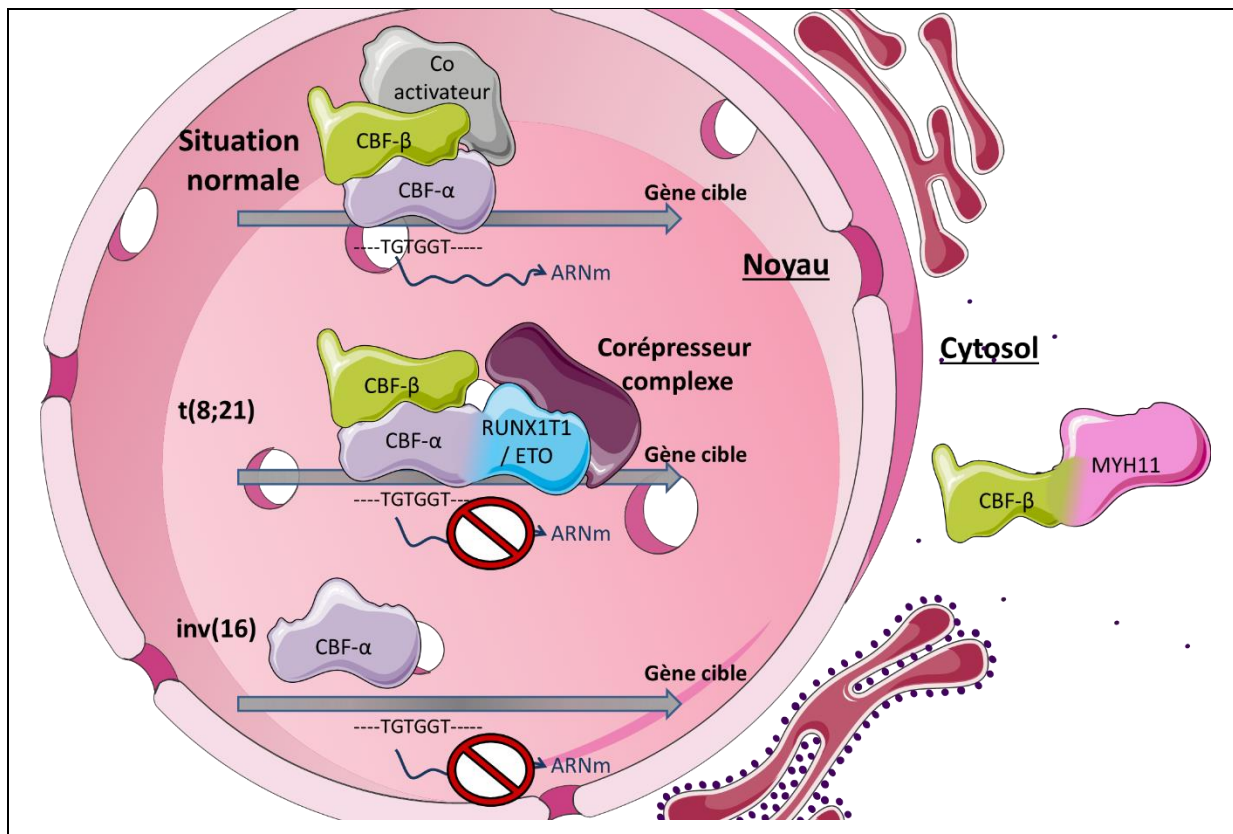


Figure 21 : Le facteur de transcription CBF-α/CBF-β, en situations normale et pathologique.

En haut, dans une situation normale, le complexe de facteur de transcription CBFα/CBFβ, via le recrutement d'un co-activateur va permettre d'activer la transcription de gène essentiel à l'hématopoïèse.

Au centre, dans le cas de certaines LAM-M2, où on observe une translocation t(8;21), une protéine chimère CBFα/RUNX1T1 sera produite. Cette protéine chimère peut toujours se lier au facteur de transcription CBFβ, et à sa séquence d'ADN cible. Mais la partie C-terminale de RUNX1T1 va interagir avec un complexe corépresseur et donc réprimer l'expression de gènes essentiels à l'hématopoïèse normale.

En bas, une inversion ou une translocation du chromosome 16, observée dans les LAM-M4Eo et d'autres sous-types, correspond à la fusion entre les gènes CBFβ et MYH11. Ce complexe va interagir et séquestrer CBFα dans le cytosol via son interaction avec CBFβ, ce qui conduira à la répression des gènes contrôlés par CBFα/CBFβ essentiels à l'hématopoïèse normale. D'après (Löwenberg, Downing, et Burnett 1999).

La translocation t(8;21), retrouvée dans 40% des LAM de type M2, joint les gènes CBFα et ETO (ou RUNX1T1). Cette fusion va engendrer la production d'une protéine chimère **CBFα-ETO**, comprenant la partie N-terminale de CBFα contenant son domaine de liaison à l'ADN et son domaine d'interaction avec CBFβ, et la partie C-terminale d'ETO. Cette protéine chimère peut toujours s'associer à la séquence d'ADN, mais la transcription sera réprimée par l'interaction entre un complexe corépresseur et la protéine ETO (Figure 21) (Löwenberg, Downing, et Burnett 1999).

L'inversion du 16 inv(16)(p13q22) ou la translocation t(16;16)(p13;q22) observées dans les LAM-M4Eo, correspondent(également observées dans d'autres cas), à la fusion

du gène *CBFβ*, localisé en 16q22, au gène *MYH11* (Myosin Heavy-chain 11) situé dans la région 16p13. Cette fusion entraîne la production d'une protéine chimère **CBFβ-MYH11**, contenant la partie N-terminale de *CBFβ* avec son domaine d'interaction à *CBFα*, et la partie C-terminale de *Myh11*. Les gènes contrôlés par le complexe *CBFα-CBFβ* ne seront pas transcrits, car la protéine chimère *CBFβ-MYH11* interagit avec *CBFα* dans le cytoplasme, et l'y séquestre (Figure 21) (Löwenberg, Downing, et Burnett 1999).

Ces translocations ou inversions, touchant le complexe de facteur de transcription *CBFα-CBFβ*, vont donc engendrer des défauts d'expression de gènes essentiels à l'hématopoïèse normale, et conduire à ces cancers de la moelle osseuse avec un blocage de la différenciation cellulaire.

b) Leucémie Aiguë Promyélocytique (LAP) avec PML-RARα

La LAP ou APL est associée à une translocation entre le gène *RARα* (Récepteur à l'acide rétinoïque α) présent sur le chromosome 17, et plusieurs autres gènes, créant une variété de fusion dites "X"*RARα*. La plus commune, présente dans 98% des cas, est la t(15;17) qui va coder pour la protéine chimère **PML-RARα**. *RARα* est un récepteur nucléaire qui fonctionne comme un interrupteur de transcription hormonodépendant. Il a des rôles divers, notamment un rôle dans la différenciation des progéniteurs myéloïdes. *PML* est une protéine impliquée dans l'organisation des corps nucléaires *PML* (*PML Nuclear Bodies*). Cette protéine *PML* forme la couche externe de ces corps et crée donc une partition dans le nucléoplasme. Les corps nucléaires *PML* peuvent recruter un nombre sans cesse croissant de protéines, et la protéine de fusion *PML-RARα* perturbe ces corps nucléaires (de Thé, Le Bras, et Lallemand-Breitenbach 2012). Le traitement de cette leucémie aiguë se fait *via* 2 agents thérapeutiques, l'acide rétinoïque et le trioxyde d'arsenic, qui ciblent respectivement les parties *RARα* et *PML* de la protéine chimère. La protéine chimère *PML-RARα*, présente sur l'ADN via le domaine de ciblage à l'ADN de *RARα*, ne peut induire la transcription des gènes clefs pour la différenciation, car cette protéine chimère interagit avec des corépresseurs. L'acide rétinoïque tout-trans (ATRA, All Trans Retinoic Acid) permet la réactivation de la transcription, et la combinaison ATRA-arsenic permet la dégradation de la protéine chimère et donc la réactivation de la transcription par dérégulation (Figure 22). Ces 2 agents thérapeutiques réinduisent la différenciation et l'élimination des cellules leucémiques

(de Thé, Le Bras, et Lallemand-Breitenbach 2012). L'induction de la différenciation permet l'obtention de cellules matures, ayant une durée de vie définie, et qui s'élimineront naturellement dans l'organisme. Ce réarrangement est donc de bon pronostic, car ces différents traitements sont très efficaces pour les LAM présentant ce réarrangement.

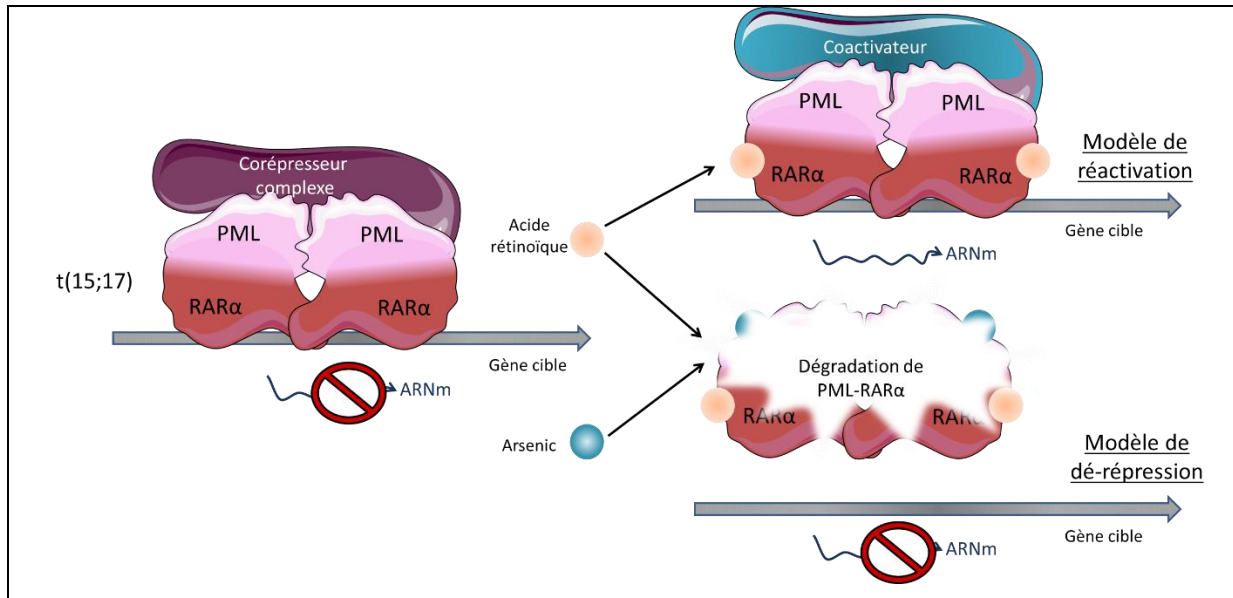


Figure 22 : Fusion PML-RAR α , et traitement à l'acide rétinoïque ou à l'arsenic.

La protéine chimère PML-RAR α , via le domaine d'interaction à l'ADN de RAR α est fixée à l'ADN mais ne peut pas transcrire les gènes cibles suite au recrutement d'un corépresseur. Le traitement à l'acide rétinoïque induit soit une réactivation de la transcription des gènes cibles via le recrutement d'un coactivateur, soit comme avec l'utilisation de l'arsenic, à la dégradation de la protéine chimère PML-RAR α . D'après (de Thé, Le Bras, et Lallemand-Breitenbach 2012).

c) Autres mutations géniques

⌘ Mutation de FLT3

Le gène FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3), localisé sur le chromosome 13q12, code pour un récepteur tyrosine kinase lié à la membrane. L'une des altérations somatiques les plus fréquentes observées dans les LAM (environ 25-45% des cas) concerne ce gène FLT3 (Renneville *et al.* 2008). Les mutations du gène FLT3 sont le plus souvent des duplications en tandem du domaine juxtamembranaire (FLT3-ITD : Internal Tandem Duplication), plus rarement des mutations ponctuelles du domaine tyrosine kinase (FLT3-TKD). Ces mutations FLT3-ITD représentent un facteur pronostique majeur pour la survie globale du patient (Tableau 3) (Döhner *et al.* 2010). FLT3 est normalement exprimé dans les progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes, mais il n'est plus exprimé dans les cellules hématopoïétiques matures. Il joue un rôle important dans la prolifération, la différenciation et la survie des cellules souches multipotentes, est sur-

exprimé dans les cellules blastiques des LAM (Renneville *et al.* 2008). Les mutations de FLT3 à elles seules n'induisent pas la tumorigénération, mais ces mutations seraient plutôt acquises en événement secondaire dans la leucémogénèse (Renneville *et al.* 2008).

☞ LAM avec NPM1 (Nucléophosmine) muté

NPM1 (Nucléophosmine ou phosphoprotéine nucléolaire B23, ou numatrine), est une phosphoprotéine nucléolaire ubiquitaire. Elle fait continuellement des navettes entre le noyau et le cytoplasme, bien que sa localisation soit à prédominance nucléaire. C'est une protéine chaperonne, impliquée dans plusieurs processus cellulaires comme la prévention de l'agrégation protéique dans le noyau, la régulation de l'assemblage et le transport des particules pré-ribosomales, la progression du cycle cellulaire suite à un stress, *etc...* Le gène NPM1 est localisé sur le chromosome 5, et il peut être affecté par divers changements :

- des translocations, par exemple dans certains lymphomes t(2;5), dans les LAP t(5;17), ou dans d'autres cas rares de LAM t(3;5).
- des mutations.

Plus de 40 mutations différentes ont été identifiées, 95 % de celles-ci consistent en une insertion de 4 pb (paire de bases). Ainsi, où qu'elles soient, toutes ces mutations conduisent à un décalage du cadre de lecture, qui se traduit par une modification de l'extrémité C-terminale de la protéine mutée. Ce changement a pour conséquence l'addition d'un signal d'export nucléaire et la perte d'un ou deux résidus essentiels à sa localisation nucléolaire. Ceci aura pour effet une localisation cytoplasmique anormale de Npm1 (Renneville *et al.* 2008). Cette mutation associée à un caryotype normal et à l'absence de la mutation FLT3-ITD est liée à un pronostic favorable, avec la mutation FLT3-ITD le pronostic devient intermédiaire (Tableau 3) (Döhner *et al.* 2010).

☞ LAM avec mutation CEBPa biallélique

Localisé sur le chromosome 19, le gène CEBPα (CCAAT/enhancer-binding protein alpha) code un facteur de transcription impliqué dans la différenciation de plusieurs types cellulaires incluant les cellules hématopoïétiques. Il joue un rôle pendant la différenciation précoce des cellules myéloïdes et il est particulièrement exprimé dans les cellules myélomonocytaires. Ces mutations ne sont pas restreintes à un sous-groupe de LAM donné, bien qu'elles soient plus observées dans les sous-groupes M1, M2 et M4.

Ces mutations peuvent être soit du côté C-terminal soit du côté N-terminal, et vont entraîner respectivement, une augmentation d'une forme alternative qui va jouer un rôle de dominant négatif de la forme complète, ou une déficience de la liaison à l'ADN (Renneville *et al.* 2008). Dans 65% des cas, les mutations C et N terminales sont bialléliques (= double mutations). Ces mutations, avec un caryotype normal, sont associées à un pronostic favorable pour le patient (Tableau 3) (Döhner *et al.* 2010).

☞ LAM avec CBF α (ou RUNX1, AML-1) muté

Le gène CBF α localisé sur le chromosome 21, déjà impliqué dans la translocation t(8;21), peut aussi être muté. Observées dans 6 à 8 % des cas sporadiques de LAM, ces mutations sont trouvées en fréquence similaire chez les LAM touchant aussi bien les enfants que les adultes. Induisant une forme tronquée dans les LAM *de novo*, elles se produisent principalement dans le domaine d'interaction avec CBF β , situé dans la partie N-terminale de la protéine, *et altèrent* ces fonctions normales par perte de l'activité de transactivation et/ou de la propriété d'hétérodimérisation (Renneville *et al.* 2008).

☞ Mutation WT1 (Wilm's Tumor 1)

Porté par le chromosome 11, le gène WT1 code pour une protéine de liaison à l'ADN à doigts de zinc. En fonction du contexte cellulaire, il peut induire ou réprimer la transcription. Son rôle précis dans l'hématopoïèse et la leucémogénèse n'est pas certain, bien qu'il puisse favoriser la prolifération des cellules souches et induire un blocage de la différenciation des cellules hématopoïétiques. WT1 est surexprimé dans plusieurs types de leucémies et notamment dans les LAM, et il peut être utilisé pour contrôler la maladie résiduelle, (MRD, *minimal residual disease*) des patients, soit après le traitement pour contrôler qu'il n'y a pas quelques cellules tumorales résiduelles qui seront à l'origine d'une rechute.

2) Facteurs pronostiques des Leucémies Aiguës Myéloïdes

Les **facteurs pronostiques** des différentes leucémies aiguës varient en fonction de **plusieurs paramètres**. Ces paramètres sont :

- 1) Le nombre de globules blancs dans le sang périphérique,
- 2) La présence d'un syndrome myélodysplasique (hémopathies clonales acquises de la cellule souche hématopoïétique médullaire, avec prolifération excessive de progéniteurs myéloïdes qui se différencient de manière anormale),

- 3) Un traitement cytotoxique antérieur pour une autre pathologie, (LAM secondaire)
- 4) Des changements cytogénétiques,
- 5) Et des changements génétiques moléculaires, aux niveaux des cellules leucémiques lors du diagnostic.

La thérapie donnée au patient est toujours dépendante de l'importance de ces facteurs pronostiques (Arber *et al.* 2016). Le premier facteur pronostique est la présence d'une **hyperleucocytose**. Les changements cytogénétiques de la cellule leucémique, par **l'étude de son caryotype**, représentent un très fort facteur pronostique pour la réponse du patient à l'induction de la thérapie et donc pour sa survie. Si le **caryotype est complexe**, le pronostic est **défavorable**, s'il est **normal** sans association à certaines mutations, il sera **favorable** (Döhner *et al.* 2010). **L'âge du patient** constitue aussi un facteur pronostique, car en fonction de l'âge, le traitement devra être adapté. En effet les patients de **60 ans et plus** ne répondent pas de la même façon au traitement, ils sont plus sensibles aux effets néfastes de la thérapie, et sont plus susceptibles de subir une mort précoce due au traitement ou de développer une résistance thérapeutique (Döhner *et al.* 2010). Différentes anomalies cytogénétiques ou de génétiques moléculaires impliquant les **sous-unités α ou β du facteur de transcription CBF** peuvent être associées à un pronostic favorable, **t(8;21)(q22;q22); CBF α -ETO**, **inv(16)(p13q22)** ou **t(16;16)(p13;q22) ;CBF β -MYH11**. Sont également associées à un pronostic favorable, les **mutations de NPM1** avec un caryotype normal en **absence de mutation FLT3-ITD**, et les **mutations de CEBP α** avec un caryotype normal. Sont associées à un pronostic intermédiaire ou défavorable les mutations ou réarrangements suivants (Tableau 3) :

Groupe pronostique	Caractéristiques
Favorable	t(8;21)(q22;q22); CBFα -ETO inv(16)(p13q22) ou t(16;16)(p13;q22); CBFB -MYH11 Caryotype normal et mutation NPM1 et absence de mutation FLT3-ITD Caryotype normal et mutation CEBPa
Intermédiaire I	Caryotype normal et mutation NPM1 et mutation FLT3-ITD Caryotype normal et absence de mutation NPM1 et mutation FLT3-ITD Caryotype normal et absence de mutation NPM1 et absence de mutation FLT3-ITD
Intermédiaire II	t(9;11)(p22;q23); MLLT3-MLL Autres anomalies non classées comme favorables ou défavorables
Défavorable	inv(3)(q21q26.2) ou t(3;3)(q21;q26.2); RPN1-EVI1 t(6;9)(p23;q34) DEK-NUP214 t(v;11)(v;q23) réarrangement MLL -5, del(5q); -7; anomalie 17p Caryotype complexe (> 3 anomalies) Hyperleucocytose/blastose (> à 100.10 ⁹ /L) 100 000 / ml Age
Tableau 3 : Classement pronostique des LAM en fonction des différents paramètres cliniques. D'après (Döhner <i>et al.</i> 2010).	

C. Traitement et évaluation de la réponse au traitement

1) Traitement:

Nous n'aborderons pas ici les traitements des LAM de l'enfant. Pour le cas particulier des LAM-M3 avec un réarrangement PML-Rar α (cf. 2^e partie.I.B.1.b, p. 58).

Pour les autres LAM, l'induction du traitement va **dépendre de l'âge du patient**. En effet, le traitement sera différent pour un adulte de 18 à 60 ans qui pourra supporter une chimiothérapie plus intensive qu'une personne de plus de 60 ans (Döhner *et al.* 2010). Le traitement se déroule en **2 étapes**, la **thérapie d'induction** et la **thérapie de consolidation/post-rémission**. Chaque **cure** est généralement composée de **2 agents associés**. Le premier est l'**anthracycline**, un antibiotique anticancéreux d'origine naturelle, produit par la bactérie *Streptomyces*. Il s'intercale entre les paires de bases azotées de l'ADN et inhibe l'activité de la topoisomérase II. Cette dernière permettant notamment d'ajouter et d'enlever des supertours dans les molécules d'ADN, elle joue un rôle essentiel lors de la réplication, la transcription, et la séparation des chromosomes. L'action de l'anthracycline, en inhibant ces processus essentiels, doit induire la mort cellulaire. Le deuxième est la **cytarabine** ou Ara-C (cytosine arabinoside), un analogue de la base azotée pyrimidine. Une fois triphosphorylée, elle inhibe la synthèse de l'ADN en prenant la place des nucléosides naturels, bloquant alors la réplication de l'ADN et la division cellulaire des cellules cancéreuses, mais aussi de

toutes les cellules en développement rapide. En effet, les molécules d'ADN ayant incorporé cet analogue de nucléotide présenteront des anomalies structurales aboutissant à des perturbations cellulaires, notamment de réplication.

La thérapie d'induction pour les individus de 18 à 60 ans, est composée de 3 jours d'anthracycline (60 mg/m²) et de 7 jours de cytarabine (100-200 mg/m²). Cette thérapie est appelé communément 3 + 7 (Döhner *et al.* 2010).

La thérapie d'induction pour les patients âgés de 60 à 74 ans, est la thérapie standard appliquée avec des doses plus faibles, si ces patients n'ont pas de co-morbidité associée, 3 jours d'anthracycline (45-60 mg/m²) et 7 jours de cytarabine (100-200 mg/m²). (Döhner *et al.* 2010).

La thérapie d'induction pour les patients âgés de plus de 75 ans, nécessite une alternative à la dose standard d'induction. Des doses faibles de cytarabine (20 mg/ m², pendant 10 jours), ou un traitement par l'hydroxyurée peuvent être proposés. Le choix de la thérapie dépendra du patient, sachant qu'il peut aussi choisir une thérapie conventionnelle en 3 + 7, (Döhner *et al.* 2010).

La thérapie de **consolidation/post-rémission** est essentielle quand la rémission du patient est atteinte, afin d'éviter tout risque de rechute et de consolider la rémission. Elle consiste à administrer 4 cures de chimiothérapie à des doses plus élevées (cytarabine 100-400 mg/m²).

Par la suite, la transplantation de moelle osseuse allogénique (donneur compatible) est la meilleure option possible pour le patient. Si aucun donneur compatible n'est trouvé, une transplantation de moelle osseuse autologue (les cellules souches du patient sont prélevées de sa moelle osseuse ou de sa circulation sanguine) sera appliquée, et enfin si une rechute est observée, une nouvelle cure de chimiothérapie sera pratiquée (Löwenberg, Downing, et Burnett 1999; Döhner *et al.* 2010).

2) Critères d'évaluation de la rémission :

Après chaque cure de chimiothérapie conventionnelle, l'évaluation de la réponse au traitement est effectuée **entre 21 à 28 jours** après le début du traitement, qui correspond à la **sortie d'aplasie** du patient. Ensuite, un suivi **des cellules de la moelle osseuse** est recommandé tous les **3 mois pendant 2 ans** et une numération de **cellules sanguines** tous les **1 à 3 mois au cours des 2 premières**

années, puis tous les 2 à 6 mois pendant 5 ans, ceci afin de suivre les traces de la maladie résiduelle (Preudhomme, Llopis, et Boissel 2012; Döhner *et al.* 2010). On peut observer plusieurs types de réponse (Döhner *et al.* 2010) :

1) la rémission complète (CR) hématologique, avec moins de 5% de blastes dans la moelle osseuse, une absence de blaste avec des corps d'Auer, une concentration de neutrophiles supérieure à 1000 /mm³ et de plaquettes supérieure à 100 000 /mm³.

La rémission complète cytogénétique, disparition de l'anomalie cytogénétique initiale (caryotype/FISH, Fluorescent In Situ Hybridization).

La rémission complète moléculaire, comparaison du taux transcrit mutant par RT-QPCR entre la cure et le diagnostic, elle sera définie si une réduction supérieure à 3 log est observée.

2) la rémission complète avec rétablissement incomplet (CRi), les critères sont les mêmes que pour la CR, mais on observe une neutropénie et/ou une thrombopénie résiduelles.

3) la rémission partielle (PR), on observe une diminution des blastes d'au moins 50% après traitement.

4) la maladie résistante (RD), échec de la rémission complète ou partielle, avec mise en évidence de cellules leucémiques dans la moelle osseuse et/ou dans le sang.

5) la rechute, 5% ou plus de blastes sont observés dans la moelle osseuse, ou dans le sang d'un patient déjà traité.

D. Réinduction de la différenciation des cellules de patients atteints de LAM :

Les cellules primaires sont des cellules leucémiques où la différenciation cellulaire est bloquée, mais des études ont montré que l'on peut aussi **réinduire** cette **différenciation in vitro**. En 1980, l'action du PMA a été testée sur des cellules de patients issues de différents types de LAM, et son effet sur la morphologie cellulaire, la phagocytose, l'activité estérase, sur l'agrégation et l'adhésion a été suivi (Pegoraro *et al.* 1980). Le PMA induit sur la plupart des cellules, après 72 h, des changements **morphologique, histologique et fonctionnel**. Il conduit à la différenciation vers un type cellulaire « monocytes/macrophages-like », **supprime la prolifération** des cellules leucémiques et il est aussi **efficace sur les précurseurs normaux** (Pegoraro *et al.* 1980). D'autres

études ont montré l'effet d'autres agents inducteurs de la différenciation pouvant être utilisés *in vivo*, comme la **vitamine A**, et une série de diterpènes naturels ayant des activités biologiques, comprenant le rétinol, l'acide rétinoïque (RA) et leurs dérivés. Normalement tous ces composés sont essentiels à l'organisme et doivent être apportés par l'alimentation. Ils participent notamment à la croissance générale, à la fonction visuelle, à la prolifération et à la différenciation de plusieurs tissus (Bollag 1983). Ainsi, le rat déficient en vitamine A présente des lésions pré-malignes épidermiques, qui sont réversibles par complémentation en vitamine A. Parmi les effets observés *in vitro* de la vitamine A, on note une inhibition de la croissance et de la prolifération cellulaire, ce qui incite à poursuivre son utilisation dans la prévention et la thérapie de certains cancers (Bollag 1983). Par ailleurs, *in vivo* le traitement avec un **dérivé d'acide rétinoïque**, l'**acide 13-cis-rétinoïque**, induit dans la plupart des cas une **rémission** des patients atteints d'une **LAM-M3** avec réarrangement PML-Rara (cf. 2^e partie.I.B.1.b, p.58), leucémie à promyélocytes à corps d'Auer en fagots caractéristique (Flynn *et al.* 1983; Hoffman et Robinson 1988). Même si les LAM-M3 sont celles qui répondent le mieux, certains autres types de LAM, peuvent répondre à ce même traitement (Hoffman et Robinson 1988). *In vivo*, l'ATRA permet la différenciation et donc à terme l'élimination des cellules leucémiques. Et *in vitro*, les cellules de patients issues de différents types de cancers, traitées à l'**acide tout-trans-rétinoïque** (ATRA) ne montrent plus aucun signe de mitose : les résultats sont similaires au traitement de la lignée promyélocytaire HL-60 (cf. 1^{re} partie, II.C.2, p. 20). L'ATRA induit donc une **différenciation terminale**, stoppe la **prolifération** et permet donc de **diminuer la charge tumorale** (Flynn *et al.* 1983).

Nous nous sommes intéressés à **quantifier l'expression du gène *GALIG*** et de ses **différents partenaires** au **diagnostic et post-cure de chimiothérapie**, chez les **patients atteints de LAM**, ainsi que son **expression au cours de la différenciation** des différentes **lignées cellulaires myéloïdes** et au cours de la **réinduction de la différenciation des cellules issues des différents patients**.

II. Dérégulation d'apoptose et de l'autophagie : cas de l'infection au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) :

Le gène *GALIG* est exprimé dans les **leucocytes circulants** (Guittaut *et al.* 2001), leucocytes composés des polynucléaires, des monocytes/macrophages, et des lymphocytes T, B et NK. Ainsi, le gène *GALIG* s'exprime au cours de l'**apoptose spontanée** des polynucléaires neutrophiles (Mollet *et al.* 2013), et sa surexpression accompagne la mort par un mécanisme similaire à l'**apoptose**. De plus, la Cytogaligine, un des produits du gène *GALIG*, **interagit** avec plusieurs partenaires impliqués dans l'**autophagie**, or autophagie et immunité antivirale sont intimement liées, par exemple pour la présentation des antigènes et l'élimination directe du pathogène par xénophagie (cf. 1^e partie.II.A.2.c, p. 32).

A. Infection par le VIH :

Le Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) est un rétrovirus, qui infecte les cellules immunitaires CD4+. Ceci conduit, après plusieurs années, à l'incapacité du système immunitaire à jouer son rôle, et aboutit au Syndrome de l'Immunodéficience Acquise (SIDA) au cours duquel plusieurs maladies dites « opportunistes » peuvent induire la mort de l'hôte. Plusieurs types de virus VIH infectent l'Homme, mais nous ne développerons ici que le cas du VIH-1.

Les **1^{ers} cas de SIDA** ont été décrits aux Etats-Unis en 1981 (Centers for Disease Control (CDC) 1981). Cette maladie, tout d'abord associée aux hommes ayant des rapports sexuels avec des hommes, puis aux drogués utilisant des dispositifs injectables, aux personnes ayant reçu des transfusions sanguines, et de la mère à l'enfant, s'est répandue au sein de **toute la population mondiale** (Fauci 1988; Barré-Sinoussi, Ross, et Delfraissy 2013), entraînant depuis le début de l'épidémie, le décès d'environ 35 millions de personnes (« Fiche d'information, Novembre 2016 | ONUSIDA » 2017)). Quelques années plus tard, **F. Barré-Sinoussi** dans l'équipe de **L. Montagnier** à l'Institut Pasteur, isole l'agent infectieux de cette maladie. Cette découverte sera récompensée par le **prix Nobel de Médecine** en 2008. Il s'agit d'un **rétrovirus** (Barre-Sinoussi *et al.* 1983) infectant les **cellules exprimant le récepteur CD4+**. En 1987, le premier antirétroviral l'AZT (azidothymidine) est testé (Fischl *et al.* 1987), et la 1^{ère} campagne de prévention est lancée en France. Toutefois son utilisation à moyen terme

induit une résistance au traitement et engendre une pression de sélection sur le virus qui va alors muter pour échapper aux traitements (Laskey et Siliciano 2014). D'autres antirétroviraux (ARV) ont été développés par la suite, et la **combinaison de plusieurs ARV (cARV)** a montré une meilleure efficacité sur le cycle viral, et moins de résistance au traitement par le virus (Laskey et Siliciano 2014; Gulick *et al.* 1997; Hammer *et al.* 1997). Puis l'ajout d'une dernière classe, les **inhibiteurs spécifiques d'enzymes virales** (anti-protéase, anti-intégrase) a permis la combinaison thérapeutique ARV hautement active (**HAART**, Highly active antiretroviral therapy).

Ces progrès thérapeutiques au cours de ces 30 dernières années ont permis de passer, dans les pays industrialisés où le traitement est accessible, d'une **maladie mortelle** à une **maladie chronique** qui a moins d'effet sur l'espérance de vie des patients (Barré-Sinoussi, Ross, et Delfraissy 2013).

1) Structure du VIH :

Le VIH est un rétrovirus, dont le matériel génétique est constitué de 2 copies d'un ARN simple brin (Laskey et Siliciano 2014). Son génome a tout d'abord été décrit comme étant composé de 9 gènes, puis un 10^{ème} gène a été mis en évidence, codant un ARN antisens, chevauchant le cadre de lecture de l'enveloppe (Miller 1988). Son existence a été controversée pendant plusieurs années, mais confirmée par la suite par une autre équipe (Cassan *et al.* 2016).

Entre les **2 séquences LTR** (Long Terminal Repeat) qui bordent le simple brin d'ARN, se trouvent plusieurs séquences codantes, (Figure 23).

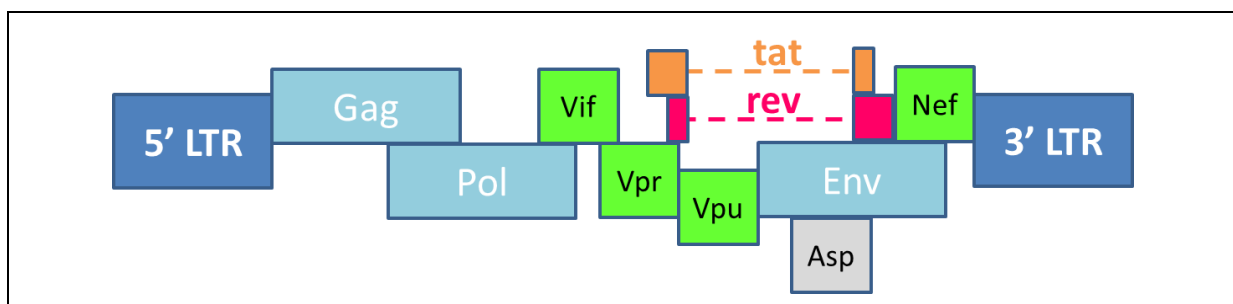


Figure 23 : Structure génomique du VIH

En bleu foncé, séquences LTR (long terminal repeat), en bleu ciel gènes classiques (*gag*, *pol* et *env*), en vert gènes de protéines dites « accessoires » (*vif*, *vpr*, *vpu* et *nef*), et en orange et rose gènes régulateurs (*tat* et *rev*). En gris, le gène antisens *Asp*, codant pour la protéine Antisens *Asp*. Adapté d'après (Fanales-Belasio *et al.* 2010; Kuiken *et al.* 2009; Cassan *et al.* 2016).

Ce matériel génétique est protégé par la **capside virale** (dont les protéines sont codées par le gène *gag*) et l'**enveloppe virale** (codée par le gène *env*) (Figure 24). L'enveloppe

est constituée principalement de lipides de la cellule infectée durant le bourgeonnement du virus, et cette enveloppe peut aussi incorporer d'autres protéines membranaires de la cellule hôte, comme le CMH (complexe majeur d'histocompatibilité) de classe I ou II, ou des protéines d'adhésion comme ICAM-1 (InterCellular Adhesion Molecule) qui peuvent faciliter l'adhésion à d'autres cellules cibles (Fanales-Belasio *et al.* 2010). L'enveloppe est aussi constituée de glycoprotéines virales qui forment un hétérodimère non covalent composé d'une sous-unité **gp120** à la surface externe et d'une sous-unité **gp41** transmembranaire (Zhu *et al.* 2006). Ces 2 éléments s'assemblent en trimère (Kuiken *et al.* 2009; Fanales-Belasio *et al.* 2010). La glycoprotéine gp120 à la surface permet notamment l'interaction avec les cellules cibles *via* son récepteur CD4 et son corécepteur (cf. 2^e partie II.A.3, p. 70) et ainsi l'entrée du virus dans la cellule hôte. A l'intérieur de l'enveloppe, se trouve la **matrice protéique virale**, composée de la protéine **p17**, et dans cette matrice, se trouve la **capside virale** composée de la protéine **p24**. La capside contient les 2 brins d'ARN complexés avec la nucléoprotéine NCp7 et les enzymes essentielles, la transcriptase inverse, l'intégrase et la protéase (Fanales-Belasio *et al.* 2010), toutes codées par le gène pol.

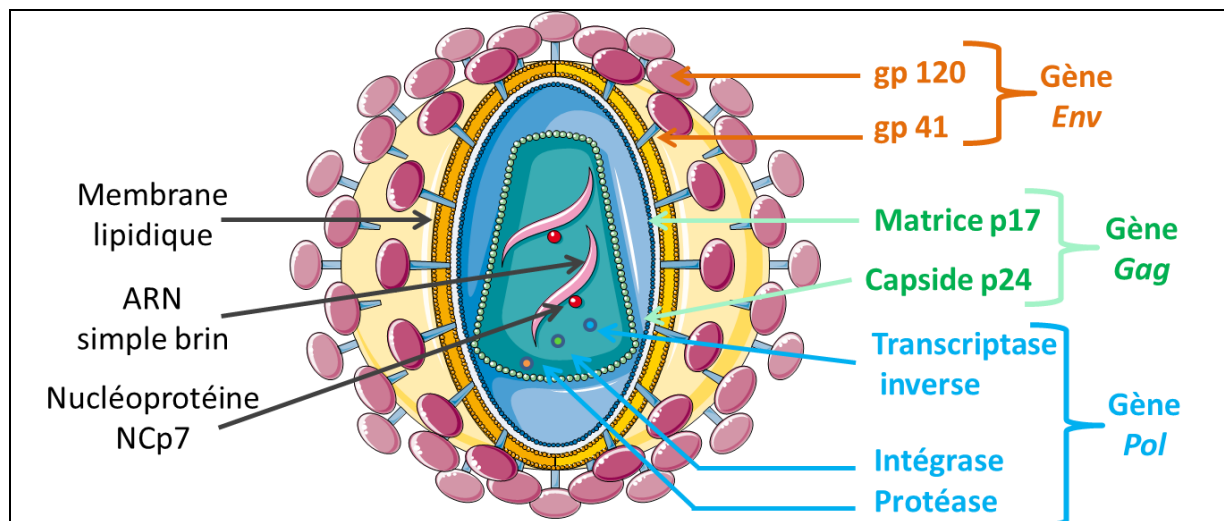


Figure 24 : Structure de la particule virale du Virus Immunodéficiência Humaine

La particule virale est composée de l'enveloppe contenant les glycoprotéines virales gp41 et gp120. A l'intérieur, se trouve la matrice protéique virale p17, et dans cette matrice se trouve la capside virale p24. La capside contient les 2 brins d'ARN, complexés avec la nucléoprotéine NCp7 et les enzymes essentielles à la réplication virale. D'après (Fanales-Belasio *et al.* 2010; Kuiken *et al.* 2009).

D'autres protéines sont essentielles pour la réplication du virus, elles sont dites régulatrices et/ou accessoires (Kuiken *et al.* 2009; Fanales-Belasio *et al.* 2010). La **protéine Tat** est exprimée très rapidement après l'infection et **favorise l'expression**

des gènes VIH. La protéine Rev permet d'assurer le transfert des ARNm du VIH et des ARN génomiques du noyau vers le cytoplasme. La protéine Vpr est impliquée dans l'arrêt du cycle cellulaire de la cellule infectée. La protéine Vpu est nécessaire pour le relargage de la particule virale, et la protéine Vif renforce l'infectivité et donc la prospérité de la particule virale. Enfin la protéine Nef a de multiples fonctions comme la transduction du signal cellulaire et la régulation négative du CD4 à la surface de la cellule infectée.

2) Tropisme :

Le virus infecte les cellules possédant à leur surface le récepteur CD4, cette glycoprotéine est présente principalement sur les lymphocytes T CD4+, mais également sur les monocytes, macrophages, cellules dendritiques et cellules microgliales du système nerveux central (Feng *et al.* 1996; Fanales-Belasio *et al.* 2010). De plus, la cellule infectée doit posséder un corécepteur (CXCR4 ou CCR5). Le CXCR4 (CXC chemokine receptor type 4) est exprimé sur plusieurs types cellulaires incluant les lymphocytes T, et le CCR5 (CC chemokine receptor type 5) est, quant à lui, exprimé sur les monocytes/macrophages, les cellules dendritiques et les lymphocytes T activés. L'utilisation de l'un ou l'autre corécepteur permet de définir le tropisme du virus : le virus utilisant le CCR5 est ainsi appelé macrophage-tropique ou encore virus R5, à l'inverse du virus utilisant le CXCR4 qui est appelé T-lymphocyte-tropique ou virus X4. La souche virale X4 émerge à un stade plus tardif de l'infection et est plus agressive, alors que la souche initiale est généralement la souche R5. Mais certains virus ont montré qu'ils pouvaient cibler aussi bien le CXCR4 que le CCR5, ils ont donc un double tropisme et sont aussi appelés virus X4R5 (Fanales-Belasio *et al.* 2010).

3) Cycle viral :

Le virus suit un cycle de réplication décrit (Figure 25).

Le virus, pour infecter la cellule, interagit avec le cluster de différenciation CD4 (1), via sa glycoprotéine de surface gp120. Après la fixation de la gp120 sur le CD4, la gp120 va subir un changement conformationnel, lui permettant d'exposer un domaine spécifique qui va pouvoir interagir avec un corécepteur, CXCR4 ou CCR5 (Choe *et al.* 1996). Grâce à la gp41, cette interaction entraîne la fusion des membranes, qui permet au virus de pénétrer dans la cellule hôte (2). Puis un relargage de l'ARN viral et des protéines

virales est effectué dans le cytoplasme de la cellule infectée, c'est la **décapsidation (3)**. La **transcriptase inverse**, se servant de l'ARN viral comme matrice, produit l'**ADN double brin proviral**. Puis il y a formation du complexe de pré-intégration composé de l'ADN proviral, de l'intégrase, de Vpr, des protéines de la matrice virale et des protéines de la cellule hôte. Ce complexe est ensuite exporté dans le noyau, où l'ADN proviral est inséré au génome de l'hôte. L'ADN proviral intégré est **transcrit** dans le noyau, à la fois en ARNm et en ARN viral (copie du génome du virus), qui seront **exportés** dans le **cytosol (4)**. Les **ARNm** viraux sont **traduits en protéines virales**, et ces dernières, ainsi que l'**ARN viral**, sont **transloquées** vers la **membrane cellulaire (5)**. Ceci permet l'**assemblage de nouvelles particules virales immatures (6)**. Ce nouveau virus **bourgeonne (7)**, et est **libéré (8)**. Le virus devient **mature (9)** grâce à la **protéase virale**, qui va cliver les polyprotéines structurales, et permettre la formation de nouveaux virus matures (Barré-Sinoussi, Ross, et Delfraissy 2013; Fanales-Belasio *et al.* 2010). Ces nouveaux virus matures vont pouvoir infecter de nouvelles cellules cibles.

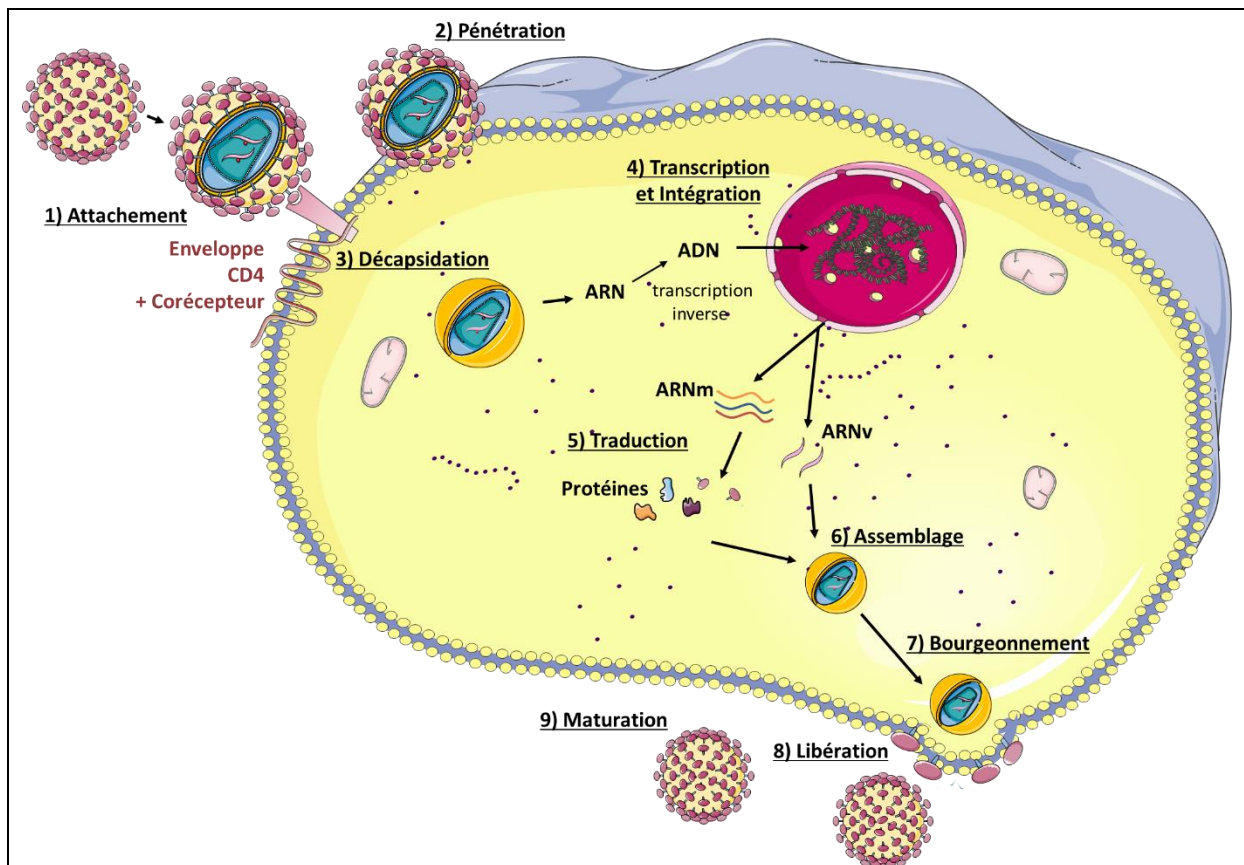


Figure 25 : Cycle de réplication virale du virus VIH-1

Le virus interagit avec le récepteur CD4 et son corécepteur CXCR4 ou CCR5, présents à la surface cellulaire (1). Cette interaction permet au virus de pénétrer dans la cellule hôte (2). La décapsidation induit le relargage de l'ARN viral et des protéines virales (3). L'ARN viral est rétro-transcrit par la transcriptase inverse en ADN double brin proviral, ceci permet la formation du complexe de pré-intégration de l'ADN viral, qui est transféré dans le noyau. L'ADN proviral dans le noyau est intégré, puis transcrit en ARNm et en ARN viral. Ces types d'ARN sont exportés dans le cytosol (4). Les ARNm viraux sont traduits en protéines, et les protéines virales et l'ARN viral sont transloqués vers la membrane cellulaire (5). A la membrane, les particules virales sont assemblées (6). Ce virus immature bourgeonne à la surface cellulaire (7), et est libéré (8). La protéase virale en clivant les polyprotéines va permettre la maturation des virus néoformés (9).

D'après (Barré-Sinoussi, Ross, et Delfraissy 2013; Fanales-Belasio *et al.* 2010).

4) Infection à VIH avec et sans traitement :

a) Evolution de l'infection sans antirétroviraux :

Lorsqu'aucun traitement n'est mis en place, l'infection par le VIH au sein de l'organisme peut être divisée en 3 stades : le stade de **primo-infection**, le stade d'**infection chronique** et le stade **SIDA**, (Figure 26), (Fanales-Belasio *et al.* 2010).

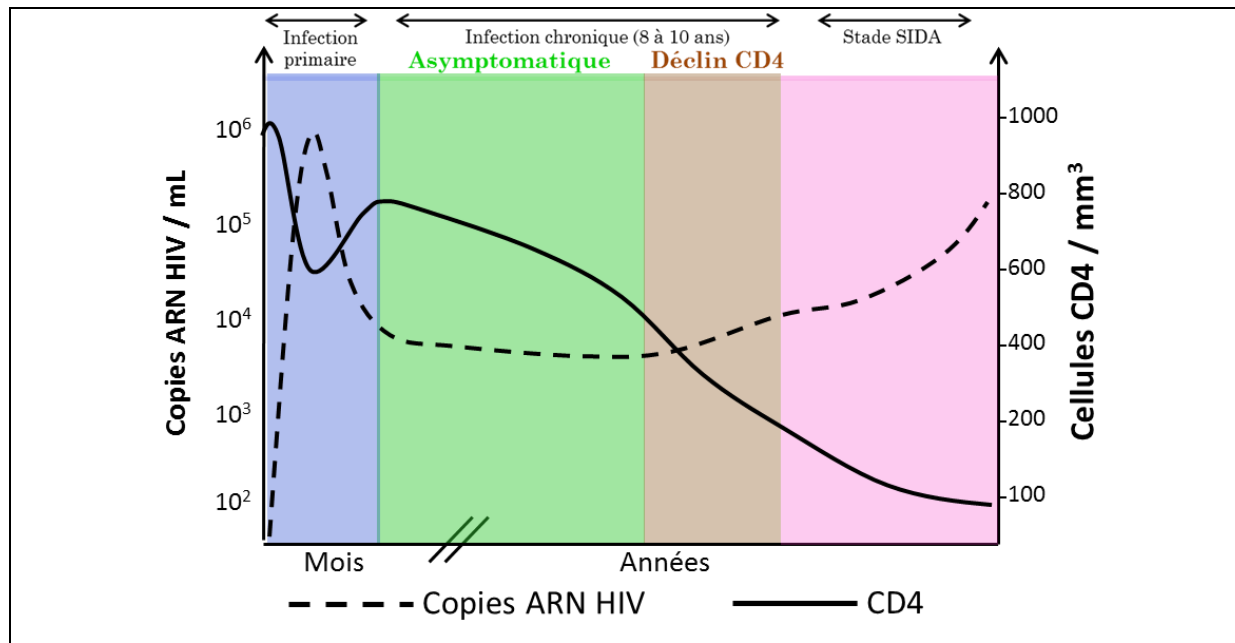


Figure 26 : Les 3 stades de l'infection par le VIH

Sur l'axe de gauche est représenté le nombre de copies ARN VIH par mL de sang, courbe en trait pointillé sur le graphique. L'axe de droite représente le nombre de LT CD4+ par mL de sang, courbe en trait plein. Les 3 stades de l'infection sont représentés dans la partie supérieure, primo-infection, infection chronique et stade SIDA, en fonction du temps après l'infection en bas du graphique. Le taux normal de CD4 est de 1000 cellules/mm³ de sang, le patient atteint le stade SIDA lorsque son compte de CD4 est inférieur à 200 cellules/mm³ de sang. D'après (Fanales-Belasio *et al.* 2010; Weiss 1993).

La primo-infection :

Dans le cas d'une infection acquise après une relation sexuelle, la première zone infectée « en général » est la muqueuse génitale ou anale. Les **LT CD4+** et les **cellules dendritiques** présentes dans ce tissu peuvent être **infectés** par le virus. Puis la circulation de ces cellules infectées va permettre d'étendre l'infection aux **ganglions lymphatiques** et par la suite à la **circulation générale** (Fanales-Belasio *et al.* 2010).

Les **cellules infectées** vont **mourir** ou se mettre au repos, ce qui permettra une infection **latente** (cf. 2^e partie.II.A.4.c, p. 77). Ainsi, les macrophages et les LT CD4+ vont alors constituer un **réservoir** permanent pour le virus (Weiss 1993; Fanales-Belasio *et al.* 2010).

Quelques jours après l'infection, l'ARN viral est détectable dans le sang de l'hôte. La **virémie** (ARN VIH/mL de sang, Charge Virale CV) **augmente rapidement** pour atteindre un pic de plusieurs millions de copies/mL de sang, au moment de la phase de **séroconversion** (détection des anticorps anti-VIH dans le sang). Durant ce stade, les patients sont sujets à des symptômes de la phase aiguë, typiques d'une grippe, qui dureront pendant 7 à 10 jours. Puis le système immunitaire parvient à contrôler la

réplication virale, notamment par la réponse des lymphocytes CD8+ cytotoxiques (LT CD8+), ce qui entraîne une **chute rapide de la CV**. Pendant ce stade, les **LT CD4+**, **cibles principale du virus**, **déclinent** dramatiquement, à environ **600 cellules/mm³ de sang**, à cause de la **réplication virale**, du taux élevé de virus et de la **réponse immunitaire**. Enfin lorsque la CV baisse, on observe une **augmentation des LT CD4+**, sans atteindre le taux de LT CD4 avant infection, qui est d'environ **1000 cellules/mm³ de sang** (Weiss 1993; Fanales-Belasio *et al.* 2010).

⌘ Le stade d'infection chronique :

L'infection chronique peut durer une **dizaine d'années**. Elle se décompose en 2 phases, la **phase asymptomatique**, entre **800 et 500 cellules/mm³ de sang** et la **phase de déclin** entre **500 et 200 cellules/mm³ de sang**.

Durant ce stade, on observe une **faible CV** circulante dans le sang (Weiss 1993), résultante de l'**activation du système immunitaire** inné et adaptatif : la production d'anticorps anti-VIH par les lymphocytes B et la réponse cytotoxique par les lymphocytes T et NK permet de contrôler une trop forte expansion du virus.

En **absence de symptômes**, durant cette phase asymptomatique le virus continue malgré tout à se répliquer, induisant un **état d'inflammation chronique**. De plus, afin **d'échapper au système immunitaire**, le virus mute au cours de sa réplication, ce qui lui permet de changer les antigènes qui sont reconnus par les lymphocytes T cytotoxiques, et les anticorps, ces derniers devant alors sans cesse s'adapter à ces nouveaux immunogènes.

L'infection par le VIH entraîne une très forte **déplétion des Lymphocytes T (LT) CD4+**. En effet, les **cellules infectées** meurent soit à cause de l'accumulation des protéines et acides nucléiques viraux dans la cellule et à la **réplication elle-même**, soit ces cellules infectées sont tuées par les cellules du **système immunitaire**, suite à l'expression des protéines virales à leur surface (Barré-Sinoussi, Ross, et Delfraissy 2013). Mais l'infection directe ne permet pas d'expliquer la perte d'autant de LT CD4+.

D'autres phénomènes peuvent expliquer cette déplétion. Le VIH est capable d'induire la mort de cellules non infectées, appelées, « **Bystander** » (Fauci 1988; Garg, Mohl, et Joshi 2012; Barré-Sinoussi, Ross, et Delfraissy 2013). Ce phénomène est en partie dû à l'interaction entre les protéines de l'**enveloppe du VIH** avec le CD4 et son

corécepteur. Cette interaction entraîne une fusion des membranes cellulaires qui peut être abortive et conduire à la mort de la cellule ou encore permettre la formation d'un **syncytium**. Le syncytium est une structure cellulaire multinucléée, formée par la fusion de plusieurs cellules. Ceci entraînera également la **mort de cette cellule gigantesque** (Fauci 1988; Garg, Mohl, et Joshi 2012; Barré-Sinoussi, Ross, et Delfraissy 2013).

Pendant cette phase asymptomatique, où le système immunitaire de l'hôte lutte contre le virus, l'hôte ne parvient pas à contenir totalement l'infection : **les LT CD4+** subissent une **lente, mais progressive diminution**, ce qui engendre une **altération du système immunitaire**, jusqu'à la **phase de déclin à 500 LT CD4+/mm³ de sang**. Durant cette phase, la progression de la maladie entraîne une destruction de l'**architecture du tissu lymphoïde** et le système immunitaire commence alors à être incapable de contrôler les infections par des **germes dits « opportunistes »** comme l'herpès ou la tuberculose qui peuvent se développer à ce stade. Les LT CD4+ continuent de diminuer jusqu'à atteindre un **niveau inférieur à 200 cellules/mm³ de sang**, taux limite qui définit l'entrée au stade **SIDA** (Weiss 1993; Fanales-Belasio *et al.* 2010).

⌘ Le stade SIDA :

La progression de la maladie va dépendre de la capacité de l'hôte à contenir la réplication virale et à mobiliser un pool de lymphocytes T effecteurs s'adaptant aux continues mutations du virus. Si l'hôte ne parvient pas à contenir le virus, le **système lymphoïde va continuer à être détruit** et le **niveau de LT CD4+ va encore diminuer**. D'autres germes opportunistes vont alors pouvoir se développer, qu'ils soient bactériens (mycobactérie atypique), fongiques (Aspergillose), parasitaires (Toxoplasmose) ou viraux (HHV-8 responsable du sarcome de Kaposi et Cytomégalovirus). Ce stade est associé à un gonflement diffus des ganglions lymphatiques, une sévère perte de poids (cachexie), de la fièvre, des symptômes respiratoires et gastro-intestinaux, et enfin des encéphalopathies, toutes ces conséquences augmentant le risque de mortalité de l'hôte de maladies liées au SIDA (Weiss 1993; Fanales-Belasio *et al.* 2010).

b) Mise sous traitement Anti Rétroviral (ARV) :

Différentes classes d'**ARV bloquent** le cycle viral à différentes étapes (Figure 27). Le premier médicament mis sur le marché a été l'**AZT** en 1987 (Fischl *et al.* 1987), qui est un analogue nucléosidique bloquant l'action de la **transcriptase inverse**. Toutefois

une résistance à l'AZT est rapidement développée par le virus. Puis sont venus s'ajouter d'autres **inhibiteurs de la RT**, de types nucléosidiques et non-nucléosidiques, ainsi que des **inhibiteurs de la protéase**. Et enfin des **inhibiteurs de l'entrée**, de la **fusion** et de l'**intégrase** sont venus compléter ces médicaments (Barré-Sinoussi, Ross, et Delfraissy 2013). Il est généralement recommandé **d'associer différentes classes d'ARV**, par exemple : 2 inhibiteurs nucléosidiques de la transcriptase inverse avec un inhibiteur de la protéase, mais bien sûr tout va dépendre des réactions du patient. En effet, les différents traitements peuvent engendrer plusieurs **effets secondaires** et/ou **indésirables**, le traitement sera alors adapté pour chaque patient.

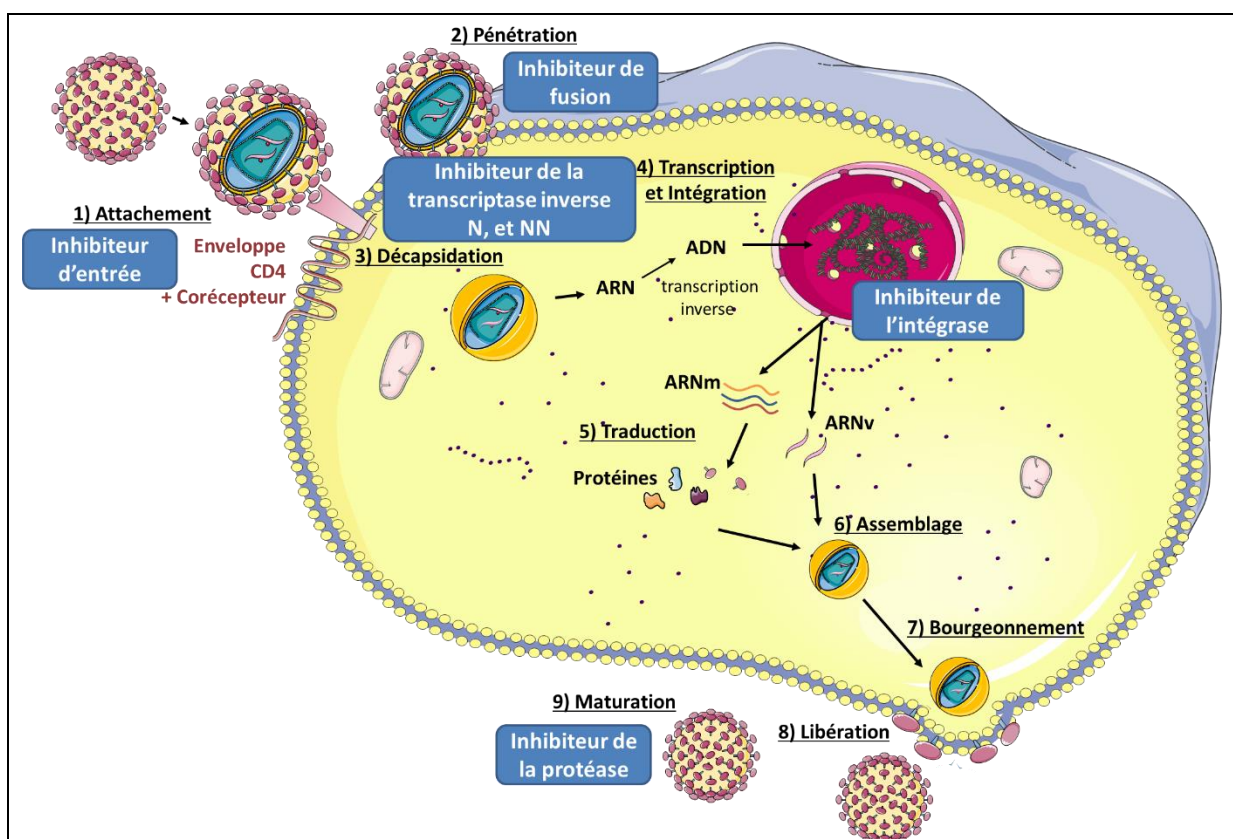


Figure 27 : ARV et cycle viral

Les différents carrés bleus montrent quelle étape du cycle viral est inhibée par le médicament. Les inhibiteurs d'entrée empêchent l'attachement du virus à la cellule cible (1). Les inhibiteurs de fusion empêchent les membranes de fusionner et ainsi empêchent la pénétration du virus dans la cellule (2). Les inhibiteurs de la transcriptase inverse nucléosidiques et non-nucléosidiques, ainsi que de l'intégrase empêchent la transcription et l'intégration du génome du VIH dans le génome de l'hôte (4). Et enfin les inhibiteurs de la protéase empêchent la maturation des nouvelles particules virales (9). D'après .

L'activation de l'immunité innée et adaptative permet de contrôler l'infection pendant la primo-infection et l'infection chronique, avec notamment des **taux élevés en cytokines pro-inflammatoires** dans le sérum des patients. Cette **longue activation** peut

entraîner un **épuisement** du système immunitaire, conduisant à une **perte des fonctions effectrices**, et de la **capacité proliférative des LT mémoires** (Mohan *et al.* 2014). La mise sous traitement va permettre d'éradiquer le nombre de virus circulants, et donc le nombre de cellules infectées et détruites. La mise sous traitement pendant la phase asymptomatique va permettre également à l'organisme de **reconstituer** son pool de **lymphocytes T**, avec dans un premier temps les **LT CD4+ mémoires**, puis les **LT CD4+ naïfs**, reflétant une reprise d'une activité thymique, ainsi qu'une diminution de l'activation du système immunitaire (Autran *et al.* 1997). Peu importe le nombre de LT CD4+ au moment du diagnostic, la mise sous traitement va permettre une augmentation du taux de LT CD4+, rapide pendant les premiers mois, puis plus lente, mais toujours progressive (Autran *et al.* 1997; Guihot *et al.* 2011). Ceci permet au système immunitaire de **remplir son rôle** en cas d'infection par de nouveaux pathogènes. Le **traitement antirétroviral (ARV) efficace** mis en place de nos jours contre le VIH, permet de stopper drastiquement la réplication virale, atteignant des niveaux dits « **indétectables** » avec **moins de 20 à 50 copies d'ARN viral par mL de sang**.

Mais au cours de sa dissémination dans l'organisme, le virus a établi un réservoir viral, qui lui permet de se répliquer à la suite d'un arrêt du traitement ARV. Ainsi la thérapie antirétrovirale introduite pendant la phase asymptomatique, doit donc être maintenue tout au long de la vie (Hocqueloux *et al.* 2013; Barré-Sinoussi, Ross, et Delfraissy 2013; Laskey et Siliciano 2014).

c) Traitement et réservoir VIH :

Le **réservoir** du virus est constitué de **cellules souvent non prolifératives, infectées par le virus**, qui est en **période de latence**. Ces cellule sont donc à l'**abri du système immunitaire**, mais peuvent à n'importe quel moment **produire de nouveaux virus**.

Les **macrophages infectés** peuvent être un important réservoir pour le virus en dehors du compartiment sanguin, et représentent une porte pour le virus dans différents organes comme les **poumons, le cerveau, l'intestin**. De plus, ces macrophages matures, non prolifératifs, peuvent soutenir *in vitro* la production du virus, sans être tués par lui (Weiss 1993), et donc constituer une source illimitée de production virale. Les **LT CD4+ mémoires**, qui ont un faible taux de prolifération, sont également une

source de réservoir VIH. Or ces cellules mémoires peuvent survivre dans l'organisme pendant des années (Chomont *et al.* 2009).

Ce réservoir du virus dans l'organisme reste un **véritable enjeu scientifique, clinique et médical**. Il forme la **principale barrière pour éradiquer l'infection HIV** : ce réservoir **persiste indéfiniment** et lorsque le traitement HAART est interrompu, la charge virale augmente, signe que le virus se réplique, d'où l'importance de maintenir un traitement à vie (Laskey et Siliciano 2014).

L'importance du réservoir défini par le niveau d'ADN VIH, augmente dès les premières semaines suivant l'infection. C'est donc dès les premiers temps de l'infection qu'il constitue le réservoir. Des études ont montré **qu'introduire le traitement très tôt, pendant la primo-infection**, permet de **diminuer l'établissement de ce réservoir viral** (Hocqueloux *et al.* 2013). Ces patients ont suivi un traitement ARV, initié pendant la phase de primo-infection, pendant **plusieurs années** (médiane 3 ans). Lorsque ces patients ont **arrêté leurs traitements**, ils ont pu **maintenir leurs taux de LT CD4+** et **contenir leur charge virale pendant plusieurs années** (médiane 7 ans) (Hocqueloux *et al.* 2010; Sáez-Cirión *et al.* 2013). Instaurer le traitement le plus rapidement possible peut représenter de réel bénéfice pour le patient.

B. Inhibition de l'autophagie par le VIH :

L'autophagie est un des **mécanismes de défense** contre les **pathogènes intracellulaires**, dont le VIH, qui a pour but, notamment par xénophagie d'entraîner la dégradation du virus (cf. 1^{re} partie III.B.3, p. 32). Les interactions entre les produits viraux, protéines et acides nucléiques, et les protéines impliquées dans l'autophagie peuvent également améliorer sa réplication.

Le VIH infecte les cellules CD4 + comme les LT, les monocytes/macrophages et les cellules dendritiques, mais il n'induit pas les mêmes réponses dans ces différentes cellules. Il **bloque l'autophagie** dans les cellules dendritiques et les macrophages, **empêchant la présentation de l'Ag viral** (Blanchet et Pigué 2010), permettant aussi au virus **d'échapper au système immunitaire** de l'hôte. Dans les LT CD4+ infectés qui répliquent le virus, l'autophagie est **inhibée**, alors que pour un LT CD4+ non infecté, le contact avec l'**enveloppe** induit une **augmentation de l'autophagie** conduisant à leur **mort par apoptose** (Espert *et al.* 2006).

1) Contact avec les glycoprotéines de l'enveloppe virale :

Les glycoprotéines de l'enveloppe sont composées des deux glycoprotéines gp120 et gp41. La **fixation de la gp120** se déroule en **deux temps**, et induit une transduction de signal, et une augmentation de l'autophagie. Mais c'est la **glycoprotéine fusogénique gp41** qui est **essentielle à l'induction de l'autophagie** des cellules Bystander (Denizot *et al.* 2008). L'interaction entre une cellule exprimant à sa surface ces 2 glycoprotéines et une cellule exprimant le récepteur et le corécepteur conduit soit, à une **fusion transitoire incomplète**, ou hémifusion (également appelée « kiss and run »), soit à une **fusion complète** des membranes et à la **formation d'un syncytium**.

Quelle que soit la fusion, la **fixation de l'enveloppe virale** sur le récepteur CD4 et le corécepteur CXCR4 de la cellule cible induit une **activation de l'autophagie**, comme une augmentation du nombre de vésicules autophagiques, de LC3b, de bécline1. Mais sont aussi mises en évidence des activités liées à l'**apoptose**, comme la caspase-3 et l'augmentation du pourcentage de cellules positives à l'iodure de propidium et à l'annexine-V (Espert *et al.* 2006; Sagnier *et al.* 2015).

Les **cellules** présentes dans le **syncytium** montrent également une **augmentation des vésicules autophagiques** et des marqueurs de **mort cellulaire** (Denizot *et al.* 2008).

L'**inhibition des caspases** dans les cellules non infectées conduit malgré tout à leur **mort**, alors que l'**inhibition de l'autophagie** permet de **préserver ces cellules de la mort**. L'enveloppe induit donc une **mort dépendante ou non des caspases**, et l'**autophagie** est nécessaire pour induire cette mort (Espert *et al.* 2006).

L'**augmentation de l'autophagie** est **transitoire** : elle atteint un pic, *in vitro*, après 4 h de contact, mais elle est **rapidement inhibée après 48 h**. De plus, l'autophagie est **inversement corrélée** au **pourcentage de cellules infectées**, ce qui suggère que l'autophagie est induite pendant la **phase précoce** de l'infection, pour être complètement **inhibée** pendant la **phase tardive**, permettant ainsi la **réplication du virus** (Sagnier *et al.* 2015).

2) Les protéines virales Tat, Vif et Nef :

a) La protéine Tat (Trans Activating Factor) :

Le **Trans-activateur Tat** est une petite protéine nécessaire à la transcription de l'ADN viral dans les **régions LTR** (cf. Figure 23, p68). Elle peut être **sécrétée** par la

cellule et **capturée** par la suite par des cellules Bystander, ce qui induira leur mort par apoptose. Elle peut également moduler l'expression de protéines, notamment des cytokines pro-inflammatoires (Sagnier *et al.* 2015). Suite à l'induction de l'autophagie dans les cellules *in vitro*, **Tat se trouve être dégradée**, alors que **Gag, Vif et Nef ne le sont pas** et on observe une diminution de production virale. La dégradation de Tat est notamment due à son **interaction avec p62**, Tat étant d'ailleurs la seule **protéine virale** capable d'interagir avec **p62** (Sagnier *et al.* 2015).

En conclusion, la protéine Tat, nécessaire à la réplication virale, est dégradée par autophagie. Le virus a donc mis aux point **différentes stratégies** afin d'**inhiber l'autophagie** induite par **son entrée** dans la cellule, pour ainsi **permettre sa réplication**.

b) La protéine Vif (Viral Infectivity Factor) :

La protéine Vif est une petite protéine virale, qui permet de **favoriser l'infection**. En effet, **Vif** interagit simultanément avec la **protéine antivirale** de la cellule hôte, **APOBEC3** (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide-like 3G), et une **E3-Ligase**. Cette E3-ligase permet l'ubiquitination et la **dégradation d'APOBEC3**, par le système ubiquitine protéasome, grâce au rapprochement de ces deux éléments *via* Vif. **Vif** se lie également à **LC3b** mais de façon LIR-indépendante. De plus, elle interagit avec d'autres membres ATG8, comme LC3c, et ces interactions interfèrent avec leurs rôles physiologiques (Borel *et al.* 2015). Vif, en fixant sur LC3b, la séquestre, **bloquant la formation des autophagosomes**, et inhibe ainsi l'autophagie, même déclenchée par un inducteur. Cette interaction n'entraîne pas la dégradation de LC3b (Borel *et al.* 2015), mais sa séquestration, ce qui a notamment été mis en évidence dans le complexe Gag où on retrouve Vif et LC3. Vif peut interagir avec LC3b tout le long de sa **chaîne de conjugaison** et donc inhiber l'autophagie de façon durable, et sa concentration dans les cellules infectées permet à la fois d'**inhiber l'autophagie**, et également de **dégrader APOBEC3** (Borel *et al.* 2015).

Vif permet donc au virus d'initier une **autre voie d'inhibition de l'autophagie** à une étape très précoce de son déroulement. Elle permet également la dégradation de la protéine antivirale APOBEC3, en **utilisant**, cette fois, **le système ubiquitine protéasome** de l'hôte.

c) La protéine Nef (Negative Regulatory Factor) :

La **protéine Nef** est une des protéines essentielles à la réplication virale. Elle a de multiples fonctions, comme la **régulation négative de l'expression du récepteur CD4** à la surface de la cellule infectée, afin d'éviter un nouveau contact avec la protéine de l'enveloppe gp120 par une cellule infectée ou un nouveau virus. Elle initie également une **régulation négative** de l'expression à la membrane du **CMH de classe I**, par la cellule infectée. Cette diminution du CMH-I protège la cellule abritant le virus de la mort induite par un lymphocyte T **cytotoxique**, mais elle rend les cellules infectées **plus sensibles aux cellules NK**, qui tuent normalement les cellules dès lors qu'elles perdent le CMH-I (Fackler et Baur 2002).

La protéine Nef peut donc jouer sur l'expression à la surface cellulaire de récepteur pouvant entraîner la mort de la cellule, mais elle interagit également avec la **machinerie autophagique**.

Dans les macrophages, Nef induit une **augmentation du nombre d'autophagosomes**, et **inhibe leur fusion** avec les lysosomes : elle permet donc **d'améliorer le rendement** de la production virale, en inhibant leur dégradation. Ainsi, l'**autophagie basale**, son **induction** et l'**inhibition de la dégradation**, dans les macrophages, améliorent la réplication virale. De plus, **Nef co-localise** avec les protéines **ATG7** (activation LC3-I), **ATG12** et **Bécline** (complexe PI3K), et avec le complexe protéique **HIV-Gag et LC3** au niveau des **virus bourgeonnant** à la membrane cellulaire (Kyei *et al.* 2009). Nef interagit avec **Bécline** au niveau des **aa 267-284** qui correspondent à une zone très conservée au cours de l'évolution. Cette séquence permet en effet à **Bécline** d'interagir avec **GAPR-1** (Golgi-associated plant pathogenesis-related protein 1) (Shoji-Kawata *et al.* 2013), une protéine associée aux radeaux lipidiques du feuillet cytosolique de l'appareil de Golgi. Cette association **GAPR-1-Bécline** séquestre Bécline au niveau de l'appareil de Golgi. La protéine Nef agit donc au niveau de Bécline comme un **régulateur négatif de l'autophagie**, par blocage de la maturation des autophagosomes, en séquestrant Bécline (Kyei *et al.* 2009; Shoji-Kawata *et al.* 2013; Kang *et al.* 2011).

De plus, dans une **cellule au repos**, **mTORC1 est actif**, et inhibe ainsi l'autophagie par **séquestration des kinases ULK**, et par la **phosphorylation du facteur**

de transcription TFEB (Transcription Factor EB) (cf. 1^{re} partie.III.B.3, p. 32). Ceci conduit à son inhibition, par sa séquestration dans le cytoplasme. En effet, ces phosphates induisent un recrutement de protéines qui vont masquer le signal d'adressage nucléaire de TFEB. Lorsque **mTORC1 est inactif**, une déphosphorylation de TFEB permet son exportation dans le noyau et ainsi **l'activation transcriptionnelle** des gènes de protéines **autophagosomales** et **lysosomales** (Martina *et al.* 2012). Lorsque le **VIH entre dans la cellule**, il induit une **déphosphorylation de TFEB** et donc sa translocation nucléaire : l'autophagie est alors activée, comme cela a déjà été décrit pour un grand nombre de virus. Mais **Nef, en ciblant Bécline**, induit une **activation de mTORC1**, qui va pouvoir phosphoryler et induire la **séquestration de TFEB** dans le cytosol, et donc inhiber l'autophagie (Campbell *et al.* 2015).

Nef est une **protéine essentielle** pour la réplication virale et la progression de maladie, en agissant à la fois sur les **récepteurs de surface cellulaire**, sur la **maturation des autophagosomes**, et sur **l'expression des protéines** impliquées dans l'autophagie. Nef permet ainsi d'éviter, la **réinfection d'une cellule infectée**, et **d'échapper au système immunitaire**.

En conclusion, le virus a mis au point **différentes stratégies**, lui permettant de **se répliquer**, de maintenir la **survie de la cellule infectée** et **d'échapper au système immunitaire**, en utilisant la machinerie cellulaire de l'hôte. **L'inhibition de l'autophagie** par le virus après son entrée dans la cellule est une des **étapes capitales**, ce qui entrainera sa **dissémination dans l'organisme**. L'inhibition du processus d'autophagie nous a conduits à nous intéresser à la **quantification de l'expression du gène GALIG** et de ses **différents partenaires** dans le cas de l'infection par le VIH.

Objectifs de ma thèse :

Le gène ***GALIG*** est faiblement exprimé dans les cellules immatures de la moelle osseuse, et plus fortement dans les cellules matures du sang (Guittaut *et al.* 2001), et il est sous-exprimé dans les cellules leucémiques de patients atteints de LAM (Mollet *et al.* 2013) (cf. 2^e partie I, p. 48). Sa surexpression induit une mort cellulaire avec des caractéristiques de l'apoptose, comme l'exposition des phosphatidylsérines, par ailleurs, la co-transfection des protéines anti-apoptotiques Bcl-X_L (Duneau *et al.* 2005) et Mcl-1 (Mollet *et al.* 2013) permet d'inhiber la mort induite par les Galigines (cf. 1^{re} partie II.A.2.e, p.13). De plus, au cours de ma thèse, les études d'interactions protéiques par des expériences de double hybride ont montré que la Cytogaligine interagit avec plusieurs protéines impliquées dans les différents systèmes de recyclage cellulaire (cf. 1^{re} partie III.C, p. 43).

Le premier objectif de ma thèse a été d'étudier l'expression des gènes ***GALIG*** et ***MCL-1***, par RTqPCR pendant la différenciation de lignées cellulaires myéloïdes, en « monocytes/macrophages like » ou en « polynucléaires neutrophiles-like ». La différenciation cellulaire étant qualifiée d'apoptose incomplète (cf. 1^{re} partie II.B, p. 14), avec une activation contrôlée et temporaire des caspases, qu'en est-il de l'expression du gène pro-apoptotique ***GALIG*** lors de ce phénomène ?

Le deuxième objectif a été de quantifier l'expression de ***GALIG*** et ses différents partenaires, par droplet digital PCR (ddPCR, technique plus sensible, qui permet la détection d'un nombre de copies très faible) dans les cellules mononucléées de la moelle osseuse et du sang de patients atteints de différents types de leucémie aiguë myéloïde au diagnostic et après la cure de chimiothérapie. Dans ce deuxième objectif, j'ai aussi étudié l'expression de ***GALIG*** après induction de la différenciation en « monocytes/macrophages-like » via le PMA.

Le troisième et dernier objectif de ma thèse a été de quantifier l'expression du gène ***GALIG*** et de ses partenaires chez des patients porteurs du VIH, traités depuis au moins 4 ans et sans aucune charge virale détectable. Dans ce cas pathologique où la macro-autophagie est inhibée par le virus, qu'en est-il de l'expression de ces gènes lorsqu'aucune charge virale n'est détectable ?

Résultats

Résultats : 1^{re} partie : *GALIG* en conditions physiologiques

« normales »

I. Introduction :

Un **différentiel d'expression** du gène *GALIG* a été observé : une **expression faible** dans les **cellules immatures** de la moelle osseuse et une **expression forte** dans les leucocytes, **cellules matures** du sang ont été mises en évidence (Guittaut *et al.* 2001). De plus une **sous-expression de *GALIG*** a été décrite dans les cellules issues de patients atteints de **LAM de type 2** (myéloblastes) (Mollet *et al.* 2013), pathologie associée à un **blocage de la différenciation**. Cette différence de niveau **d'expression** entre cellules **matures** et **immatures**, ainsi que cette **sous-expression dans les LAM** soulèvent la question d'une possible implication du gène *GALIG* au cours de la différenciation myéloïde.

Ce premier article et les données complémentaires suivantes apportent des résultats concernant notamment le profil d'expression de *GALIG* au cours de la différenciation myéloïde de lignées cellulaires et de monocytes issus de donneurs sains en macrophages.

II. Article et données complémentaires :

Dans un premier temps, nous avons quantifié l'expression de *GALIG* dans les myéloblastes de **patients atteints de LAM de type M2 et les promyélocytes M3** (article 1-Fig. 1). Ces cellules issues de patients atteints de LAM correspondent à 2 **états de différenciation, arrêtée** à des étapes différentes de maturation.

C'est pourquoi dans un deuxième temps, nous avons également étudié l'expression du gène *GALIG* au cours de l'induction *in vitro* de la différenciation myéloïde.

Nous avons choisi d'évaluer le niveau d'expression de *GALIG* au cours de la différenciation dans différents modèles, qui ont été présenté p. 20, (Etude de la différenciation myéloïde *in vitro*) :

œ Quatre modèles de différenciation vers les monocytes/macrophages

Lignée cellulaire HL-60 par ajout de PMA (article 1-Fig. 2)

Lignée cellulaire THP-1 par ajout de PMA (données complémentaires-Fig.29)

Lignée cellulaire U937 par ajout de PMA (données complémentaires-Fig.29)

Monocytes issus de donneurs sains par ajout de M-CSF (données complémentaires-Fig.30)

œ Un modèle de différenciation vers les polynucléaires neutrophiles

Lignée cellulaire HL-60 par ajout de DMSO (article 1-Fig.2)

La différenciation cellulaire s'accompagne d'autres phénomènes, comme par exemple, **l'arrêt de la prolifération cellulaire** (article 1-Fig.3), **l'acquisition de la capacité à phagocyter pour les macrophages** (données complémentaires-Fig.32), **l'activation de la caspase pro-inflammatoire 1** (article 1-Fig.3) et de caspases « pro-apoptotiques », notamment les caspases -9, -8 et -3 (Berg *et al.* 2001; Sordet *et al.* 2002; Rébé *et al.* 2007) (article 1-Fig.2). Nous avons donc mesuré, en plus du niveau d'expression de *GALIG*, l'évolution de ces différents paramètres au cours de la différenciation myéloïde induite *in vitro*. Enfin, nous avons suivi **l'expression du gène anti-apoptotique *MCL1*** (article 1-Fig.2C), **oncogène majeur**, décrit également comme étant **rapidement exprimé** au cours de la **différenciation en macrophage** (Thomas, Lam, et Edwards 2010), et capable de **contrecarrer la mort cellulaire induite par *GALIG*** (Mollet *et al.* 2013).

A. Article :

Article soumis.

Expression increase of the proapoptotic *GALIG* gene during myelopoiesis and in different subtypes of myeloid leukemic cells suggests a role in myeloid differentiation

Amandine Serrano*, Saïd El Haddad*, Martine Dubois*, Bastien Proust*, Stéphane Charpentier*, Chloé Robin*, Thierry Normand*, Fabienne Brulé*, Francine Garnache-Ottou², Pierre-Simon Rohrlisch¹, Alain Legrand*, Lucile Mollet*

* Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, affiliated with the Université d'Orléans - Pôle Universitaire Centre Val de Loire, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France.

¹ INSERM UMR 1098, Besançon, France / Université de Franche-Comté EA-2284 France, 2 Bd Fleming, 25030 Besançon Cedex, France

² Service d'Hématologie CHU Besançon, France / INSERM UMR 1098, Besançon, France / Université de Franche-Comté EA-2284 France, 2 Bd Fleming, 25030 Besançon Cedex, France

Keywords: *GALIG*, MCL-1, Apoptosis, Myeloid differentiation, Acute Myeloid Leukemia

Abstract

GALIG, an internal gene to *LGALS3*, the human *GALECTIN-3* gene, encodes two distinct proteins through translation of a unique mRNA in two overlapping alternative reading frames. If such a gene has been previously described as unconventional, recent studies challenge the fundamental concept that mature eukaryotic mRNAs contain only a single coding sequence. *GALIG* overexpression induces apoptosis in cultured cells through a pathway still under investigation. *GALIG* is also highly expressed in leukocytes and its expression increases substantially during spontaneous neutrophil apoptosis.

We report here that in bone marrow and peripheral blood cells from patients with Acute Myeloid Leukemia, the transcription rate of *GALIG* is statistically lower in M2 myeloblastic cells than in the more differentiated M3 promyelocytic cells. These results prompted us to investigate whether *GALIG* transcription rate increases with myeloid cell maturation status.

In both of our HL-60 differentiation models - monocyte/macrophage-like and granulocyte-like cells - we found a significant augmentation of *GALIG* mRNA expression. This activation goes with the overexpression of MCL-1, a pro-survival factor of myeloid cells, and caspases activation. The augmentation of *GALIG* transcription usually antecedes terminal differentiation hallmarks such as cell cycle arrest and caspase-1 activation.

These data indicate that *GALIG*, like caspases, could on one hand be a key player in the cell death pathway, and on the other hand, be involved in myeloid lineage differentiation. A role of *GALIG* in myeloid homeostasis and malignancies can be proposed as well.

Introduction

The *LGALS3* locus exhibits an unusual genetic organization characterized by the presence of a gene embedded within the galectin-3 gene. This gene, named *GALIG* (standing for GAlectin-3 Internal Gene), is expressed from an internal promoter located within the second intron of *LGALS3* (1). This alternate promoter drives production of a transcript containing two translated, entirely distinct and overlapping open reading frames, both of which are out of frame with the galectin-3 encoding sequence (1, 2). This type of genetic organization is not as atypical as historically assumed, as demonstrated by recent studies (3) and may suggest expanded coding capacity of genomes.

GALIG can be considered as a novel cell death gene (4, 5) although its mechanism of action is not completely understood. The balance between pro- and anti- apoptotic members determines the fate of the cells in many systems, and the programmed cell death decision is achieved when the pro-apoptotic protagonists take over from the anti-apoptotic ones. The most potent inhibitor of *GALIG*-induced cell death is MCL-1 (6), a pro-survival member of the Bcl2 family that plays a critical role in neutrophil resistance to apoptosis and differentiation of myeloid cells. Thus, during spontaneous neutrophil apoptosis, a substantial increase in *GALIG* gene expression is observed: while polymorphonuclear neutrophils naturally die, *GALIG* still opposes MCL-1 (6).

Apoptosis-associated caspases can have non-apoptotic functions (7) and instead of being destructive, they can play a major role in myeloid differentiation (8, 9). Two main pathways were shown to trigger caspase activation. Briefly, activation of downstream effector caspases such as caspases-3 can be mediated through the intrinsic pathway, which requires disruption of the mitochondrial outer membrane leading to the activation of the initiator caspases-9 into the apoptosome. Activation of caspase-3 can also be mediated through the extrinsic pathway, which involves plasma membrane death domain multimerization leading to the activation of an initiator caspase, mainly caspase-8. Proteolysis due to caspase activation results in T-cell activation and in the establishment of a mature macrophage phenotype (7–9). To date, caspase activation during granulocyte differentiation, has not been reported.

GALIG is a tightly regulated gene whose expression is most abundant in normal peripheral blood leukocytes, though only slightly detectable in normal bone marrow (BM) (2). In other words, *GALIG* expression is weak in immature marrow cells and becomes higher in terminally differentiated blood cells. Acute Myeloid Leukemia (AML) is a heterogeneous but aggressive group of malignancies resulting from the unrestrained proliferation of maturation-arrested leukemic cells (10) and leading to an increasing number of undifferentiated blasts in the bone marrow. In 1976, the first uniform system of AML classification, established by a French-American-British (FAB) expert panel, was based on the differentiation lineage and the maturation degree of the leukemic blasts (11). In 2008, recurrent major genetic abnormalities prompted the World Health Organization (WHO) to propose a new AML classification (12) which is regularly revised, but regarding our differentiation study, we decided to measure *GALIG* level in different FAB classified AML. The level of *GALIG* transcripts is massively down-regulated in AML type 2 (AML-M2) cells when compared to their normal counterparts (6). Therefore we hypothesized a vital function during myeloid differentiation for the *GALIG* apoptotic gene. Two different ways were used to test this assumption. First, we quantified the level of *GALIG* mRNA in different FAB subtypes of AML cells (11). Secondly, we questioned *GALIG* expression in the well described and frequently used HL-60 differentiation models. Phorbol ester (PMA) induces macrophagic terminal differentiation while DMSO triggers a granulocyte-like maturation (13). In these two *in vitro* models the activities of caspases-9, -3 and -8, proliferation arrest and inflammatory caspase-1 function were used to precisely determine when the terminally differentiated stages were reached.

Results and Discussion

***GALIG* mRNA level intensifies in accordance with FAB differentiation status of AML cells.**

In previous work performed on myeloblasts from BM and PBMC of patients with acute myeloid leukemia type 2 (AML-M2), we found the level of *GALIG* transcripts being largely down-regulated when compared to healthy samples where more differentiated cells coexist (6). These results lead us

to question the homogeneity of *GALIG* expression in immature cells at the various stages of their maturation. Therefore, using the Acute Myeloid Leukemia FAB classification (11), in which AML are subdivided based on morphological and cytochemical criteria, we selected 14 acute myeloblastic leukemia with maturation (FAB-M2) and 6 acute promyelocytic leukemia (FAB-M3) patients to analyze *GALIG* expression. Classical quantitative RT-PCR as well as RT-Droplet Digital PCR (ddPCR) were performed, and, in order to maintain homogeneity, *HPRT1* was used as the reference gene in both techniques. As indicated in Figure 1, regardless of which method is carried out, *GALIG* transcripts in FAB AML-M2 are present in significantly lower amounts than in FAB AML-M3 with $p < 0.039$ (qRT-PCR) and $p < 0.02$ (RT-ddPCR) (Fig. 1 left panel and middle panel). Moreover *GALIG* expression measured by qRT-PCR scales positively with *GALIG* expression *via* RT-ddPCR ($p < 0.00008$, $r = 0.905$) (Fig. 1, right panel). These results suggest that the *GALIG* expression rate increases with cell maturation.

Since 2008, the WHO has proposed regularly updated AML classifications based on genetic abnormalities (12). The goal is to establish rules to create groups of AML patients displaying homogenous response assessment and treatment outcomes. However, nowadays, some AMLs still lay in the NOS “Not Otherwise Specified” category and are still distinguished by morphological and enzymatic criteria, *i.e.* by applying the former FAB classification (11). In addition, other acquired genetic abnormalities such as FLT3, NPM1 and CEBPA mutations (16, 17) help give prognostic information. Thus, one can expect that the level of expression of *GALIG* is also a clinical identifier of prognostic value for homogenous groups of AML. However, a larger cohort is required to test this hypothesis.

Caspase-9 activity is detected during both monocytic and granulocytic differentiation

To confirm that apoptosis features such as caspase activation and *GALIG* expression increase with cell maturation, we explored the phenomenon in the common HL-60 myeloid differentiation models. HL-60 leukemic cell line originated from a female patient with acute myeloid leukemia. Initially characterized as a FAB AML-M3 promyelocytic leukemia (18), this cell line was later reclassified more appropriately as an acute myeloblastic leukemia with maturation, FAB AML-M2 (19). PMA induces its macrophagic terminal differentiation (Fig. 2, left) while the polar-planar compound DMSO triggers its granulocyte-like maturation (Fig. 2, right) (13).

Two day post PMA treatment, the significant caspase-9 activity that is detected increases with time, reaching 18% of the cell population after 4 days (Fig. 2A, left). For the HL-60 exposed to DMSO, the same activity is detected but only three days after the stimulation and while it also increases with time, solely 8% of the cell population are positive after 4 days (Fig. 2A, right). Therefore the intrinsic pathway initiator caspase-9 is activated during both monocytic and granulocytic maturation although with different kinetics and upper limits (Fig. 2A).

Caspase-3 activity can only be detected in PMA-treated HL-60 (Fig. 2B). Present three days after treatment in 9.1% of cells, it increases with time to 13.1% cells at day 4 (Fig. 2B, left). The activation pattern of initiator caspase-8 activity is similar (data not shown): 8.6% of caspase-8 positive cells contribute to the monocytic differentiation two days post PMA induction and this phenomenon increases with time (day 3: 9.7 %, day 4: 14.3%) while no caspase-8 activity can be detected at any time point in granulocyte-differentiating HL-60.

Expression of both pro-apoptotic *GALIG* and anti-apoptotic *MCL-1* genes rapidly strengthen as myeloblastic cells differentiate either to monocyte/macrophage-like or to granulocyte-like cells

With activation of the pro-apoptotic caspases during both granulocytic and mono-macrophagic HL-60 differentiation as one result, and with higher *GALIG* levels of expression in AML promyelocytic cells than in AML myeloblastic cells as another result, we then investigated whether the expression of the apoptotic *GALIG* gene is also induced during HL-60 differentiation. *GALIG* mRNA levels were then quantified by qRT-PCR after the cells were treated with PMA or DMSO. Concurrently, we also monitored and compared the expression of *MCL-1*, an anti-apoptotic gene and an important regulator of *GALIG* (6), our reasoning being that along with the activation of *GALIG*, there must be some mechanism preventing cell death.

As HL-60 undergoes granulocyte-like differentiation, the expression of *MCL-1* increases 1.7 fold by day 1 to reach 3 fold by day 4 (Fig. 2C, right). Simultaneously, a significant 12-fold augmentation in *GALIG* expression can be observed at day 3 (Fig. 2D, right). A higher effect occurs when HL-60 is differentiated into monocytes. With an 18-fold change in the expression rate of the anti-apoptotic gene 24 hours post PMA induction (Fig. 2C, left), a concomitant increase in the mRNA levels of the pro-apoptotic gene is measured with 170 fold and 280 fold, at day 1 and day 2, respectively (Fig. 3D, left).

In summary, after three days into granulocyte-like differentiation, HL-60 cells show a low but significant activity of the initiator caspases-9, but none for the initiator caspases-8 and the effector caspases-3. At the same time, the pro-apoptotic *GALIG* expression rate is 12-fold above basal level and comes after a feeble anti-apoptotic *MCL-1* augmentation. However, when monocyte-like differentiation is induced, HL-60 demonstrate the three caspase activities till day 2 and a massive increase in *GALIG* mRNA level. Its more than 100 fold increase comes with the augmentation of the anti-apoptotic *MCL-1* gene expression.

HL-60 macrophagic and granulocytic differentiations have different kinetics of proliferation arrest

Cell cycle arrest and consequently proliferation stop are features associated with terminal differentiation. Following the fluorescent dye CFSE dilutions, the HL-60 proliferation rate was monitored for at least 4 days (Fig. 3A). As a control, untreated HL-60 cultures were monitored as well

(Fig. 3A, left boxes). Most of the unstimulated cells divided once after a one day culture (84%), twice after 2 days (76%), 3 times after 3 days (59%) and 4 times after 4 days (63%). Thus as expected, untreated HL-60 divided around once a day.

Figure 3A shows that, as soon as day 1, the proliferation kinetics are different for PMA-treated HL-60 (Fig. 3A, middle boxes): only 71% divide once after a one day culture, 35% twice after 2 days, 16% 3 times after 3 days, and only 9% are able to divide 4 times after 4 days. Interestingly, this induction of macrophage-like maturation shows a significant reduction of cell proliferation from day one, and this phenomenon develops with time. Of note, and as already reported (8), the adhesion capability of the PMA treated cells starts from day 1 (data not shown). Thus, the timing of cell cycle arrest appears to be similar to the adhesion kinetics.

When neutrophil-like differentiation is induced (Fig. 3A, right boxes), cell division is comparable to untreated cells from day 1 to day 3. But after 4 days of culture, only up to 26% of DMSO treated cells have the ability to divide 4 times. In fact, it takes at least 4 days to obtain a significant reduction of the proliferation rate. No cell adhesion was observed in that case (data not shown).

Caspase-1, the IL-1 β -activating enzyme, is active after both HL-60 macrophagic and granulocytic differentiations

Mature macrophages and neutrophils are IL-1 β secretor leucocytes, and since this cytokine is processed by caspase-1, we anticipated that the activation of caspase-1 is a characteristic of *in vitro* macrophagic and granulocytic maturation. Figure 3B reports the caspases-1 activation levels in the two HL-60 differentiation models. During at least 4 days no caspase-1 activity above background level can be detected in unstimulated cells (1.2 to 2%, data not shown). As far as granulocyte-like differentiation is concerned, a caspases-1 cleavage occurs starting day 3 (3.9% and 6.8% at day 3 and day 4, respectively) (Fig. 3B, upper panel). Furthermore, 20 % of PMA-stimulated cells are actually caspase-1 positive as soon as day 2, and this percentage significantly increased at day 3 (46%) and day 4 (58%). Interestingly, a greater caspase-1 activity appears when looking at HL-60 macrophage-like differentiation (Fig. 3B, lower panel).

In brief, after three days of stimulation, caspase-1 is concomitantly activated during both monocytic and granulocytic maturation although with different upper limits. Significant induction of mature features, such as cell proliferation arrest, emerge at day 1 for monocytic-like differentiation, and later for granulocytic-like HL-60-derived cells, between day 3 and day 4.

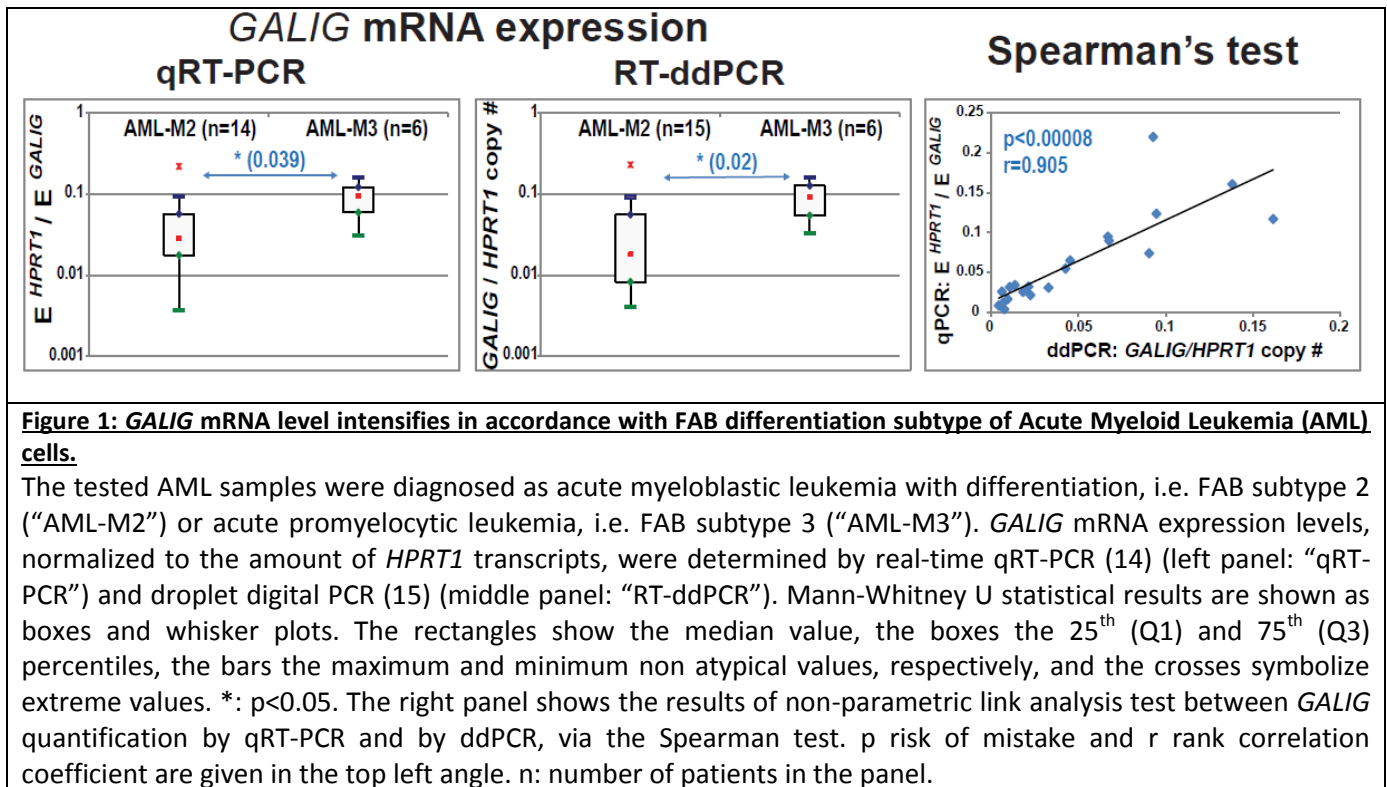
By using the dual HL-60 human monocytic and granulocytic model systems exposed to PMA and DMSO, respectively, the present study confirms, as previously described during monocyte differentiation, an activation of the procaspase-8 (9), -9 and -3 (8). It also identifies that during neutrophil differentiation, the sole detectable caspase activity is the initiator caspase-9, involved in the intrinsic mitochondrial pathway of apoptosis. Although *GALIG* overexpression in neutrophil

engages spontaneous apoptosis (6), we show herein that the proapoptotic *GALIG* mRNA increase can guide another cell fate choice. Thus, like caspases, it has become increasingly clear that *GALIG*, far from being merely a cell death effector, could have another function within the monocytic cells and to a lesser extent within granulocytic counterparts.

Conclusion:

During monocytic and granulocytic differentiations, the acquisition of the two mature phenotypes, cell cycle arrest and caspase-1 activation, is preceded by an early stage which includes apoptotic characteristics such as caspase activation and *GALIG* gene expression. Hence caspase activation and *GALIG* expression, that have been previously reported in the literature as apoptotic features (4, 21), could actively contribute to mono- and granulo-differentiation, but their action must be tightly regulated to avoid premature death of cells committed to differentiate. Our results indicate that MCL-1 may fulfill the role of such a regulator. Its overexpression, as we have reported, could prevent extensive apoptotic-like leakage from the outer mitochondrial membrane. *GALIG* expression in the erythro- and megacaryo-lineages will be interesting to test, for instance using the K562 differentiation model (20).

Whatever the precise function of *GALIG* mRNA and proteins in the maturation process, the differentiation of myeloblastic cells into monocyte/macrophage or granulocyte is associated with increasing *GALIG* expression. Proteins arising from *GALIG* translation can have numerous locations in the cell. Mitogaligin, a tryptophan-rich protein, can be found in mitochondria (2, 4) where it destabilizes membranes through interaction with cardiolipin, and in the nucleus (22). Cytogaligin displays multiple subcellular locations as well. It is evidenced in the cytosol, in the nucleus, (2) and at the inner membrane of mitochondria (A. Legrand, manuscript in preparation). Deciphering the precise mechanism of action of cytogaligin and mitogaligin will be the next step.



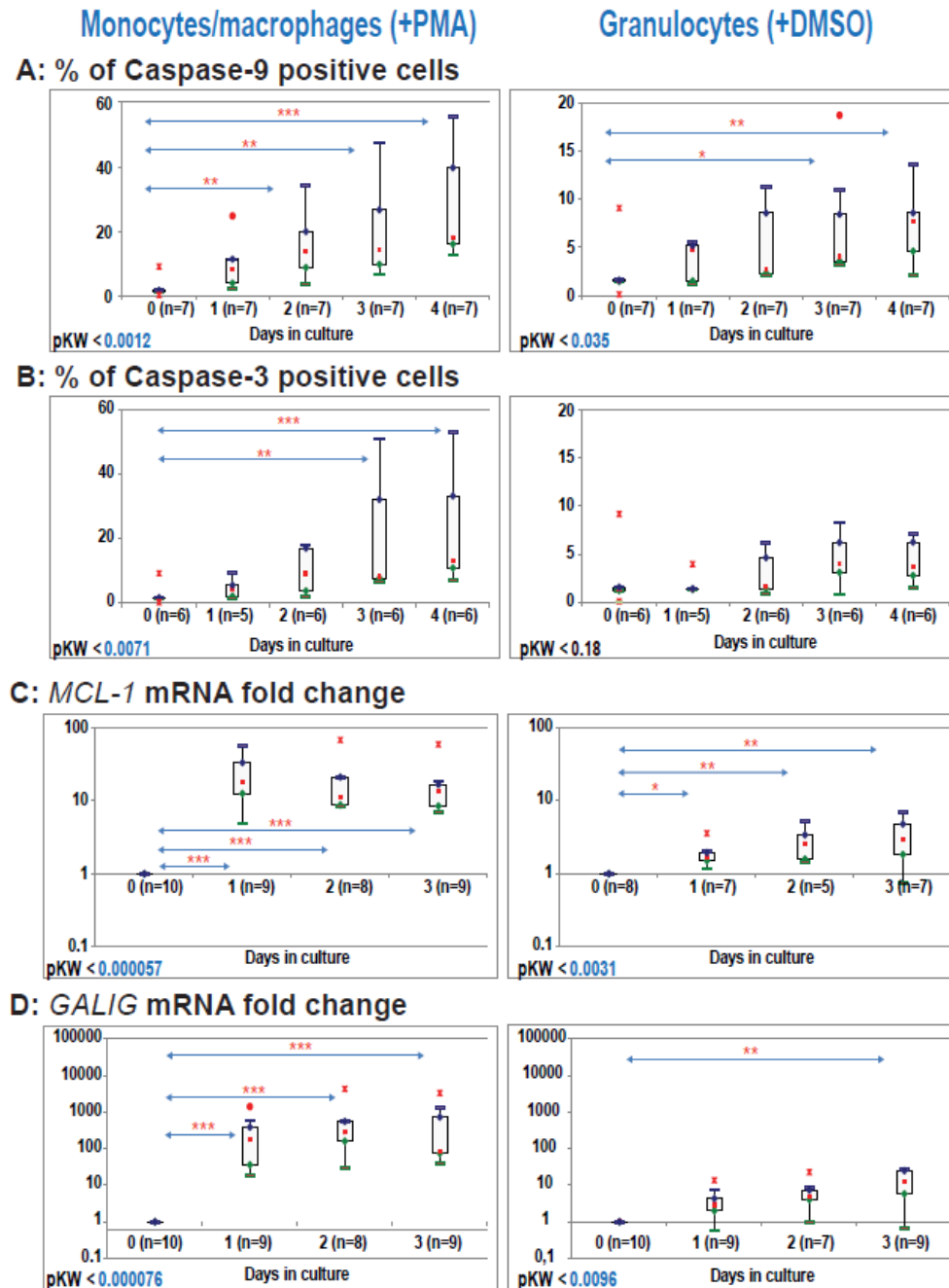


Figure 2: Expression of the *GALIG* pro-apoptotic gene rapidly strengthens as the myeloblastic cell line HL-60 is induced to differentiate either to monocyte/macrophage-like or to neutrophil-like cells.

HL-60 were induced to differentiate in monocyte/macrophage-like (left panels) and neutrophil-like (right panels) cells. Percentages of cells which expressed the apoptotic caspases-9 and -3 (A: “% of Caspase-9 positive cells” and B: “% of Caspase-3 positive cells”) were daily measured during 4 days. Meanwhile relative *GALIG* and *MCL-1* mRNA expression ratio of the target genes *MCL-1* (C: “*MCL-1* mRNA fold change”) and *GALIG* (D: “*GALIG* mRNA fold change”) were calculated based on the real-time PCR efficiencies E and the crossing point deviation of the tested sample (day 1, day 2 or day 3) versus the day 0 control and expressed in comparison to the reference gene HPRT (14). p values of Kruskal-Wallis tests are indicated in lower left corners (“pKW”) and post-hoc non-parametric Mann-Whitney U test statistical results are shown as boxes and whisker plots. The rectangles show the median value, the boxes the 25th (Q1) and 75th (Q3) percentiles, the bars the maximum and minimum non atypical values, respectively, and the dots symbolize outliers. * A, B: p<0.013 and C, D: p<0.017, **: p<0.01; ***: p<0.001. n: number of times each experiment was independently performed.

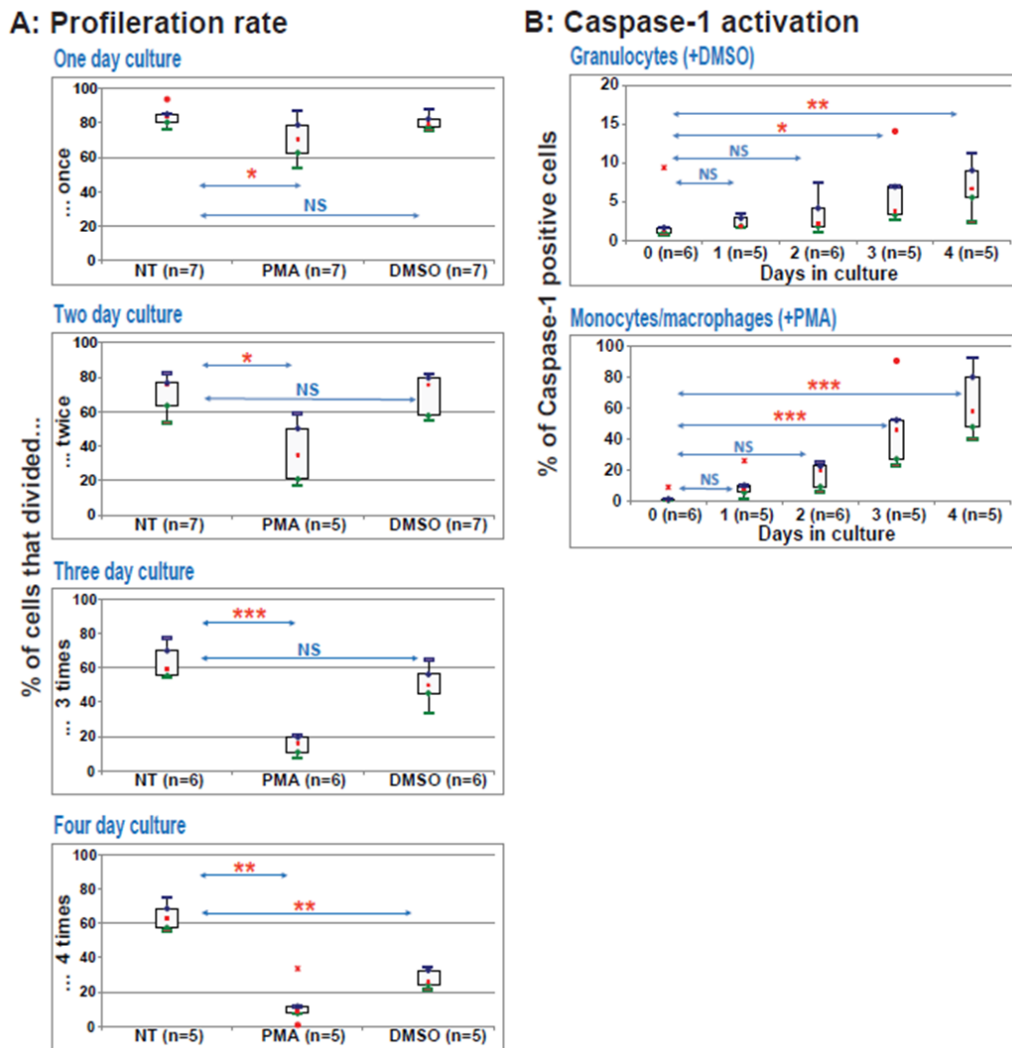


Figure 3: Induction of HL-60 myeloid cell line *in vitro* differentiation induces both proliferation arrest and inflammatory caspase-1 function.

A- Proliferation rate. After CFSE labelling, HL-60 were cultured without treatment (“NT”), or with induction of monocyte/macrophage-like (“PMA”) and neutrophil-like (“DMSO”) differentiation and harvested every 24 h. On day one, suitable instrument settings were fixed as follow: a forward scatter (FSC)/side scatter (SSC) dot plot was set up to allow a clear distinction of untreated and treated HL-60, then a region was drawn to outline the live cell gate and used for an FL-1 histogram to show CFSE peaks. These settings were saved and used for all time points in an experiment. As each cell division resulting in a sequential halving of fluorescence, gates were drawn for each CFSE peak: histogram plots of CFSE fluorescence were analyzed individually but checked between time points. We postulate that HL-60 cells grow with a doubling time of 24 h, and compare this theoretical doubling time with our CFSE time-course data: on the “one day culture” plot, the percentages of cell that divided once, after PMA and DMSO induction was compared with the untreated HL-60 (“NT”). Mann-Whitney U test statistical results are shown as boxes and whisker plots. The rectangles show the median value, the boxes the 25th (Q1) and 75th (Q3) percentiles, the bars the maximum and minimum non atypical values, respectively, and the dots symbolize outliers. *: p<0.05, **: p<0.01; ***: p<0.001. Cell stimulation comparisons were also made after a “two day culture” (percentage of cell that divided twice), a “three day culture” and a “four day culture” (percentage of cell that divided 3 and 4 times, respectively).

B. Caspase-1 activation. Meanwhile the differentiation grade was monitored by the percentage of cell displaying active pro-inflammatory caspase-1 (“% of Caspase-1 positive cells”). p values of Kruskal-Wallis tests are indicated in lower left corners (“pKW”) and post-hoc non-parametric Mann-Whitney U test statistical results are shown as boxes and whisker plots as described above. *: p<0.013, **: p<0.01; ***: p<0.001. n: number of times each experiment was independently performed..

Materials and Methods

Cell lines and differentiation

HL-60 cells (CCL-240TM) were obtained from the American Type Culture Collection. For a maximum of 9 weeks, HL-60 were cultivated at 200,000 cell/mL in IMDM (Gibco) supplemented with 20% FCS, 1% Glutamax and antibiotics, and the culture was supplemented with PMA (10 µg/mL, Sigma- Aldrich) for differentiation into macrophage-like cells and DMSO (1.3%, Sigma-Aldrich) for differentiation into granulocyte-like cells.

Caspase activity measurement

Between 0.5 and 1 million cells were incubated with 10 µM substrate solution (Caspalux®1, 8, 9 and Phiphilux®3, Oncolmmunin, Inc.) during 30 minutes at 37°C. Cells were washed and resuspended in 500 µl of PBS, and caspases activities were evaluated by flow cytometry. Cell morphology was evaluated by plotting the side scatter (SSC) against forward scatter (FSC) signals with linear amplification. Data were acquired (15,000 events) using a FACSsort cytometer (Becton Dickinson) equipped with a 488 nm laser line (FL-2 filter: 585/42) and were analyzed using Cell Quest Software (Becton Dickinson).

Cell proliferation assay

Five million cells were resuspended in PBS and labeled 5 minutes with CFSE (5 µM, Sigma) before differentiation inductions (PMA and DMSO vs untreated control cultures). Every day a 0.5 to 1 million cell aliquot was analyzed by cytometry. Data were acquired (15,000-20,000 events) using a FACSsort cytometer (Becton Dickinson) equipped with a 488 nm laser line (FL-1 filter: 530/30). Cell morphology was evaluated by plotting the side scatter (SSC) against forward scatter (FSC) signals with linear amplification. Data were analyzed using Cell Quest Software (Becton Dickinson). On day one, suitable instrument settings were fixed and these settings were saved and used for all time points in an experiment. During analysis, gates were drawn for each CFSE peak: histogram plots of CFSE fluorescence were analyzed individually and checked between time points. We postulate that HL-60 cells grow with a doubling time of 24 h, and compare this theoretical doubling time with our CFSE time-course data, i.e. for instance, after one day of culture, the percentages of PMA- and DMSO-treated cells that divided once, were compared with the untreated HL-60 that divided once.

Blood and bone marrow samples and RNA isolation

Bone marrow (BM) and peripheral blood mononuclear cells (PBMC) were from Acute Myeloid Leukemia patients (Centre Hospitalier Universitaire de Besançon, France) after obtaining their informed written consent. All informed consent followed ethical guidelines set by the Declaration of Helsinki (1964).

Acute Myeloid Leukemia samples were collected at the initial diagnosis before the administration of treatment. Our panels encompass 14 AML-M2 (12 BM cells and 2 PBMC) and 6 AML-M3 (2 BM cells and 4 PBMC). BM cells and PBMC were purified after Ficoll-hypaque separation (PAA laboratories), washed and frozen at -80°C before being stored in liquid nitrogen, then thawed just before RNA isolation. RNAs were extracted using a NucleoSpin RNA II kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel).

Real time qRT-PCR

Reverse transcriptions and qPCR were performed with a Verso™ SYBR® Green 2-step QRT-PCR Fluorescein kit according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific, ABgene). Specific primers for quantitative PCR were previously listed (6). PCR were conducted on a MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) as previously described (6). All analyses were conducted with Bio-Rad IQ5 2.0 standard edition software. Levels of mRNA were calculated using the Pfaffl method (14) using the expression of *HPRT1* for sample normalization. mRNA fold changes were determined by the same mathematical model and therefore were expressed in a sample versus the zero-day control in comparison to *HPRT1* reference gene transcript.

Droplet Digital PCR (ddPCR)

RNA concentration was measured using a spectrophotometer (260 nm, NanodropOne™) and cDNA synthesis was performed with 500 ng of RNA and the Maxima 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) at 25°C for 10 min, 50°C for 15 min, followed by heat inactivation of the reverse transcriptase for 5 min at 85°C. The concentration was then adjusted to 5 ng/μl.

The ddPCR mix consisted of: 10 μl 2x QX200 ddPCR™ EvaGreen supermix (Bio-Rad), 100 nM of the primers used for qRT-PCR (6), 4 μl (20 ng) of the cDNA template into a final volume of 20 μl. The total mix was placed into the 8 channel cartridge, 70 μl of droplet generating oil was added and droplets were formed in the QX200™ droplet generator (Bio-Rad). Droplets in oil suspensions were transferred to an Eppendorf® 96 well plate (Eppendorf) and placed into a conventional PCR machine. Cycling conditions were as follows: 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 sec, 55°C for 30 sec and 72°C for 30 sec and an terminal extension cycle 72°C for 5 min. The droplets were stabilized by an ultimate step: 4°C for 5 min, and 90°C for 5 min. All steps had a ramp rate of 2°C/second. The droplets were subsequently read automatically by the QX200™ droplet reader (Bio-Rad) and the data was analyzed with the QuantaSoft™ analysis software (Bio-Rad).

The copy number of each cDNA was normalized with the amount of RNA (ng) used for reverse transcription (15).

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using StatEL software (www.adscience.eu).

For proliferation and mRNA rate analyses in AML cells, we used the non-parametric Mann-Whitney U test. The criterion of significance was set as 5%: the results were considered statistically significant at p-value <0.05 (*), <0.01 (**), or <0.001 (***).

For multiple comparison from independent groups, we used the non-parametric Kruskal-Wallis test. When p-value < 0.05, the test was followed by post-hoc non-parametric Mann-Whitney U tests, with comparison to the day zero data reference group. The Bonferroni correction was applied so that the familywise error is maintained < 0.05 (Caspase-1, 9, 8 and 3: p <0.013 and *MCL-1* and *GALIG* mRNA fold change: p<0.017).

The non-parametric measure of statistical dependence between two variables (*GALIG* rate by qPCR, the independent Y variable, *versus GALIG* rate by ddPCR, the dependant X variable) was analyzed by the Spearman's non-parametric link analysis test, using the Spearman's non-parametric rank correlation coefficient. The results were considered statistically significant at p-value <0.05.

References

11. Raimond, J., F. Rouleux, M. Monsigny, et A. Legrand. 1995. The second intron of the human galectin-3 gene has a strong promoter activity down-regulated by p53. *FEBS Lett* 363: 165- 169.
2. Guittaut, M., S. Charpentier, T. Normand, M. Dubois, J. Raimond, et A. Legrand. 2001. Identification of an internal gene to the human Galectin-3 gene with two different overlapping reading frames that do not encode Galectin-3. *J. Biol. Chem* 276: 2652- 2657.
3. Moulleron, H., V. Delcourt, et X. Roucou. 2016. Death of a dogma: eukaryotic mRNAs can code for more than one protein. *Nucleic Acids Res.* 44: 14- 23.
4. Duneau, M., M. Boyer-Guittaut, P. Gonzalez, S. Charpentier, T. Normand, M. Dubois, J. Raimond, et A. Legrand. 2005. Galig, a novel cell death gene that encodes a mitochondrial protein promoting cytochrome c release. *Exp. Cell Res* 302: 194- 205.
5. Gonzalez, P., P. Robinet, S. Charpentier, L. Mollet, T. Normand, M. Dubois, et A. Legrand. 2009. Apoptotic activity of a nuclear form of mitogaligin, a cell death protein. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 378: 816- 820.
6. Mollet, L., P. Robinet, M. Dubois, A. Aurouet, T. Normand, S. Charpentier, A. Sureau, C. Grandclement, F. Garnache-Ottou, E. Deconinck, F. Brulé, P. S. Rohlich, et A. Legrand. 2013. Opposing Mcl-1, the GALIG proapoptotic gene is upregulated as neutrophils die and underexpressed in Acute Myeloid Leukemia cells. *Molecular Immunology* 56: 123- 128.
7. Zeuner, A., A. Eramo, C. Peschle, et R. De Maria. 1999. Caspase activation without death. *Cell Death Differ.* 6: 1075- 1080.
8. Sordet, O., C. Rébé, S. Plenchette, Y. Zermati, O. Hermine, W. Vainchenker, C. Garrido, E. Solary, et L. Dubrez-Daloz. 2002. Specific involvement of caspases in the differentiation of monocytes into macrophages. *Blood* 100: 4446- 4453.
9. Rébé, C., S. Cathelin, S. Launay, R. Filomenko, L. Prévotat, C. L'Ollivier, E. Gyan, O. Micheau, S. Grant, A. Dubart-Kupperschmitt, M. Fontenay, et E. Solary. 2007. Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kappaB in monocytes undergoing macrophagic differentiation. *Blood* 109: 1442- 1450.
10. Löwenberg, B., J. R. Downing, et A. Burnett. 1999. Acute myeloid leukemia. *N. Engl. J. Med* 341: 1051- 1062.
11. Bennett, J. M., D. Catovsky, M.-T. Daniel, G. Flandrin, D. a. G. Galton, H. R. Gralnick, et C. Sultan. 1976. Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias French-American-British (FAB) Co-operative Group. *British Journal of Haematology* 33: 451- 458.
12. Campo, E., S. H. Swerdlow, N. L. Harris, S. Pileri, H. Stein, et E. S. Jaffe. 2011. The 2008 WHO classification of lymphoid neoplasms and beyond: evolving concepts and practical applications. *Blood* 117: 5019- 5032.
13. Birnie, G. D. 1988. The HL60 cell line: a model system for studying human myeloid cell differentiation. *Br. J. Cancer Suppl.* 9: 41- 45.
14. Pfaffl, M. W. 2001. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29: e45.
15. Hindson, B. J., K. D. Ness, D. A. Masquelier, P. Belgrader, N. J. Heredia, A. J. Makarewicz, I. J. Bright, M. Y. Lucero, A. L. Hiddessen, T. C. Legler, T. K. Kitano, M. R. Hodel, J. F. Petersen, P. W. Wyatt, E. R. Steenblock, P. H. Shah, L. J. Bousse, C. B. Troup, J. C. Mellen, D. K. Wittmann, N. G. Erndt, T. H. Cauley, R. T. Koehler, A. P. So, S. Dube, K. A. Rose, L. Montesclaros, S. Wang, D. P. Stumbo, S. P. Hodges, S. Romine, F. P. Milanovich, H. E. White, J. F. Regan, G. A. Karlin-Neumann, C. M. Hindson, S. Saxonov, et B. W. Colston. 2011. High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Anal. Chem.* 83: 8604- 8610.

16. Renneville, A., C. Roumier, V. Biggio, O. Nibourel, N. Boissel, P. Fenaux, et C. Preudhomme. 2008. Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia* 22: 915- 931.
17. Port, M., M. Böttcher, F. Thol, A. Ganser, R. Schlenk, J. Wasem, A. Neumann, et L. Pouryamout. 2014. Prognostic significance of FLT3 internal tandem duplication, nucleophosmin 1, and CEBPA gene mutations for acute myeloid leukemia patients with normal karyotype and younger than 60 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann. Hematol.* 93: 1279- 1286.
18. Gallagher, R., S. Collins, J. Trujillo, K. McCredie, M. Ahearn, S. Tsai, R. Metzgar, G. Aulakh, R. Ting, F. Ruscetti, et R. Gallo. 1979. Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood* 54: 713- 733.
19. Dalton, W. T., M. J. Ahearn, K. B. McCredie, E. J. Freireich, S. A. Stass, et J. M. Trujillo. 1988. HL-60 cell line was derived from a patient with FAB-M2 and not FAB-M3. *Blood* 71: 242- 247.
20. Koefler, H. P., et D. W. Golde. 1980. Human myeloid leukemia cell lines: a review. *Blood* 56: 344- 350.
21. Gonzalez, P., M. Duneau, S. Charpentier, T. Normand, L. Mollet, M. Dubois, et A. Legrand. 2007. Destabilization of membranes containing cardiolipin or its precursors by peptides derived from mitogaligin, a cell death protein. *Biochemistry* 46: 7374- 7382.
22. Robinet, P., L. Mollet, P. Gonzalez, T. Normand, S. Charpentier, F. Brulé, M. Dubois, et A. Legrand. 2010. The mitogaligin protein is addressed to the nucleus via a non-classical localization signal. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 392: 53- 57.

Acknowledgments

We are thankful to EFS Centre-Atlantique members, healthy volunteers and AML patients who have contributed to this study.

We thank Dr Valerie Berthelier from 4Publication (<http://4publication.com/>) for critically reading, proofreading this manuscript and providing English editorial assistance.

Footnotes:

1- Source of support:

This work was supported by grants from the Conseil Départemental du Loiret (CD45).

2- Nonstandard abbreviations:

AML: Acute Myeloid Leukemia

ddPCR: digital droplet PCR

GALIG: GAllectin-3 Internal Gene

qRT-PCR: quantitative RT-PCR

3-Correspondence address:

Lucile Mollet

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301

Rue Charles Sadron

CS 80054

45071 Orléans Cedex 2, France

4-§ Current address:

Pierre-Simon Rohrlisch,

Groupe hospitalier l'Archet (Nice)

Hématologie Pédiatrique

151 Rte Saint Antoine Ginestiere BP 79

06202 Nice Cedex 3

B. Données complémentaires :

1) Matériels et méthodes :

a) Lignées THP-1 et U937:

Les cellules THP-1 et U937 sont des lignées cellulaires humaines de type monocytaire. Les THP-1 sont issues du sang d'un patient atteint de leucémie aiguë monoblastique (LAM type 5), alors que les U-937 proviennent de l'effusion pleurale d'un patient atteint de lymphome histiocytaire. Ces cellules ont une morphologie de type monocyte.

Ces deux lignées cellulaires sont entretenues dans du milieu RPMI complet (Roswell Park Memorial Institute Medium, Gibco®) supplémenté avec 10% de SVF (Sérum de veau fœtal, Sigma®), 1% de PS (pénicilline streptomycine, Gibco®), 1% de pyruvate de sodium, Gibco® et 0,05 mM de β -mercaptoéthanol, Sigma®. Elles sont remises en suspension à 200 000 cellules / mL tous les 3 jours.

b) Monocytes issus de donneurs sains après tri par déplétion sur billes magnétiques

Une convention de cession de produits issus du sang à but non-thérapeutique avec l'Etablissement Français du Sang (EFS) Centre Atlantique nous a permis d'obtenir des prélèvements de sang de donneurs sains, en tube EDTA. Le sang est dilué dans une solution tampon de PBS (Phosphate Buffered Saline) 1 X. Puis les cellules mononucléées sont isolées par centrifugation dans un gradient de densité de Ficoll (Ficoll-Paque PREMIUM, GE Healthcare Life Sciences®). Les monocytes sont triés négativement par déplétion des cellules non-monocytaires à l'aide d'anticorps couplés à des billes magnétiques, selon le protocole du fournisseur (Dynabeads® Untouched™ Human Monocytes Kit, ThermoFisher Scientific). Les monocytes après tri sont cultivés en milieu RPMI supplémenté avec 10% de SVF (Sérum de veau fœtal, Sigma®), 1% de PS (pénicilline streptomycine, Gibco®), 1% de pyruvate de sodium, Gibco® et 1% d'acides aminés non essentiels, Gibco®, à raison de 500 000 cellules par mL. Ce tri, contrôlé par cytométrie en flux à l'aide des marqueurs de surface CD14/CD45, nous permet d'obtenir une pureté minimum de 98% en monocytes.

c) Induction de la différenciation myéloïde vers les monocytes/macrophages :

Pour les lignées THP-1 et U937, l'induction de la différenciation est la même que celle utilisée pour la lignée HL-60 (cf. article 1).

Les monocytes (500 000 cellules) issus de donneurs sains sont traités par ajout de 100 ng/mL de M-CSF (Macrophage - Colony Stimulating Factor, R&D systems®).

d) Acquisition de la capacité à phagocyter :

Des bactéries contenant un plasmide exprimant la GFP (Green Fluorescent protein), sous le contrôle d'un promoteur procaryote inducible à l'IPTG (isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside), sont mises en culture en milieu LB (Luria-Bertani) avec 1 mM d'IPTG, à 37°C toute la nuit. Cent microlitres de cette suspension bactérienne sont ajoutés sur les cellules avant et en cours de différenciation, aux temps indiqués. Ces cellules sont alors (re)mises en culture pendant 30 minutes à 37°C, puis lavées 2 fois au PBS 1X, et observées au microscope (Axiovert 200, grossissement x400, Zeiss). Les données sont acquises à la fois en lumière blanche et « laser bleu » (excitation 488nm ; émission 520nm) puis analysées avec le logiciel AxioVision (Zeiss). Sont énumérés manuellement le nombre de cellules totales par champs, ainsi que le nombre de cellules

ayant ingéré des bactéries (cellules « vertes ») afin de calculer le pourcentage de cellules ayant la capacité de phagocyter.

e) Extraction des ARN et dosage par RTqPCR :

L'extraction et le dosage des ARNm par RTqPCR suivent le même protocole que celui détaillé dans l'article 1.

2) Résultats :

a) Expression de GALIG et MCL1 par RTqPCR :

L'augmentation de l'expression des gènes *GALIG* et *MCL1* durant la différenciation en monocytes/macrophages, des lignées HL-60, THP-1 et U937, ainsi qu'au cours de la différenciation terminale du monocyte, ont été quantifiées par RTqPCR, en utilisant le gène de référence HPRT1.

⊗ Au cours de la différenciation des HL-60 en monocytes/macrophages :

L'article 1 nous a permis de mettre en évidence que la quantité d'ARNm de *GALIG* augmente rapidement et fortement, d'un facteur 100 dès le premier jour, lors de la différenciation des HL-60 en monocytes/macrophages (article 1-Fig. 2). Le premier temps évalué a été après 24 h de stimulation. Cette forte augmentation, nous a incités à étudier plus finement l'expression de *GALIG* sur des temps plus courts afin de connaître la cinétique d'expression des gènes *GALIG* et *MCL1*. Sur la Figure 28 on observe les variations de l'expression des gènes apoptotique *GALIG* à gauche, et anti-apoptotique *MCL1* à droite pendant la différenciation en monocytes/macrophages de la lignée HL-60 de 0 à 24 heures.

L'expression de l'ARNm de GALIG augmente significativement après 2 heures d'induction de la différenciation, **de 3,5 fois**. Puis après 4 heures il est **17 fois** plus exprimé qu'au temps initial, et continue d'augmenter graduellement pour **atteindre plus de 100 fois après 24 heures**.

Dès la 1^{ère} heure de la différenciation, **l'expression de l'ARNm de MCL1** s'accroît significativement (X3) puis **continue de s'amplifier après 2 heures** pour atteindre environ **10 fois** puis semble **se stabiliser** pendant la différenciation.

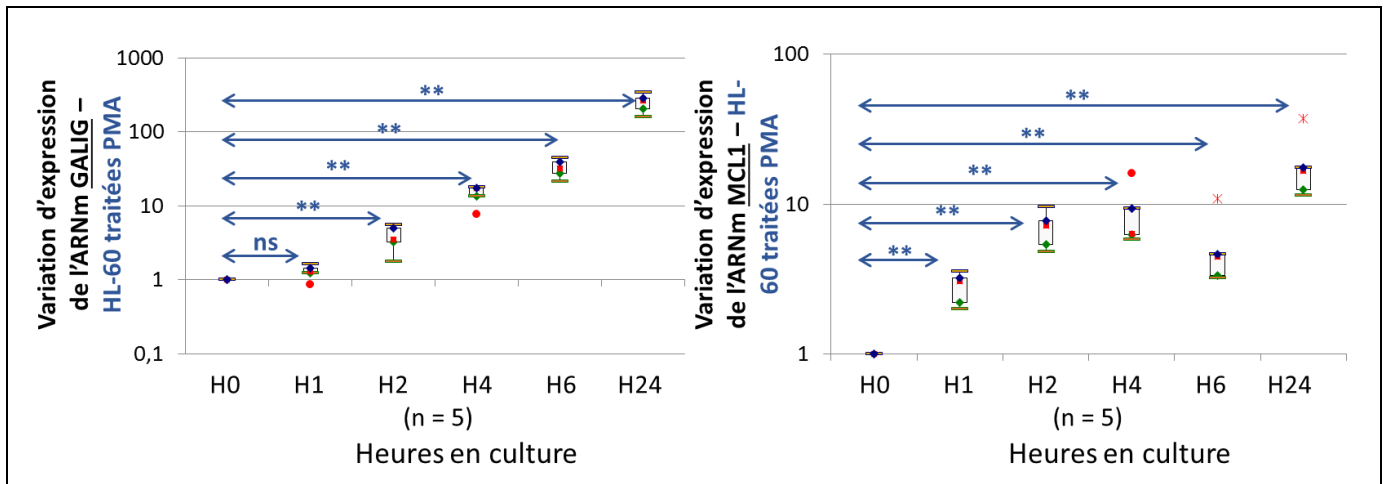


Figure 28 : Variation d'expression des gènes *GALIG* et *MCL1* au cours des premiers temps de la différenciation en monocytes/macrophages de la lignée HL-60

Variation de l'expression des ARNm *GALIG* (à gauche) et *MCL1* (à droite) par RTqPCR, au cours de la différenciation en monocytes/macrophages de la lignée HL-60, en heures, par rapport au gène de référence HPRT1.

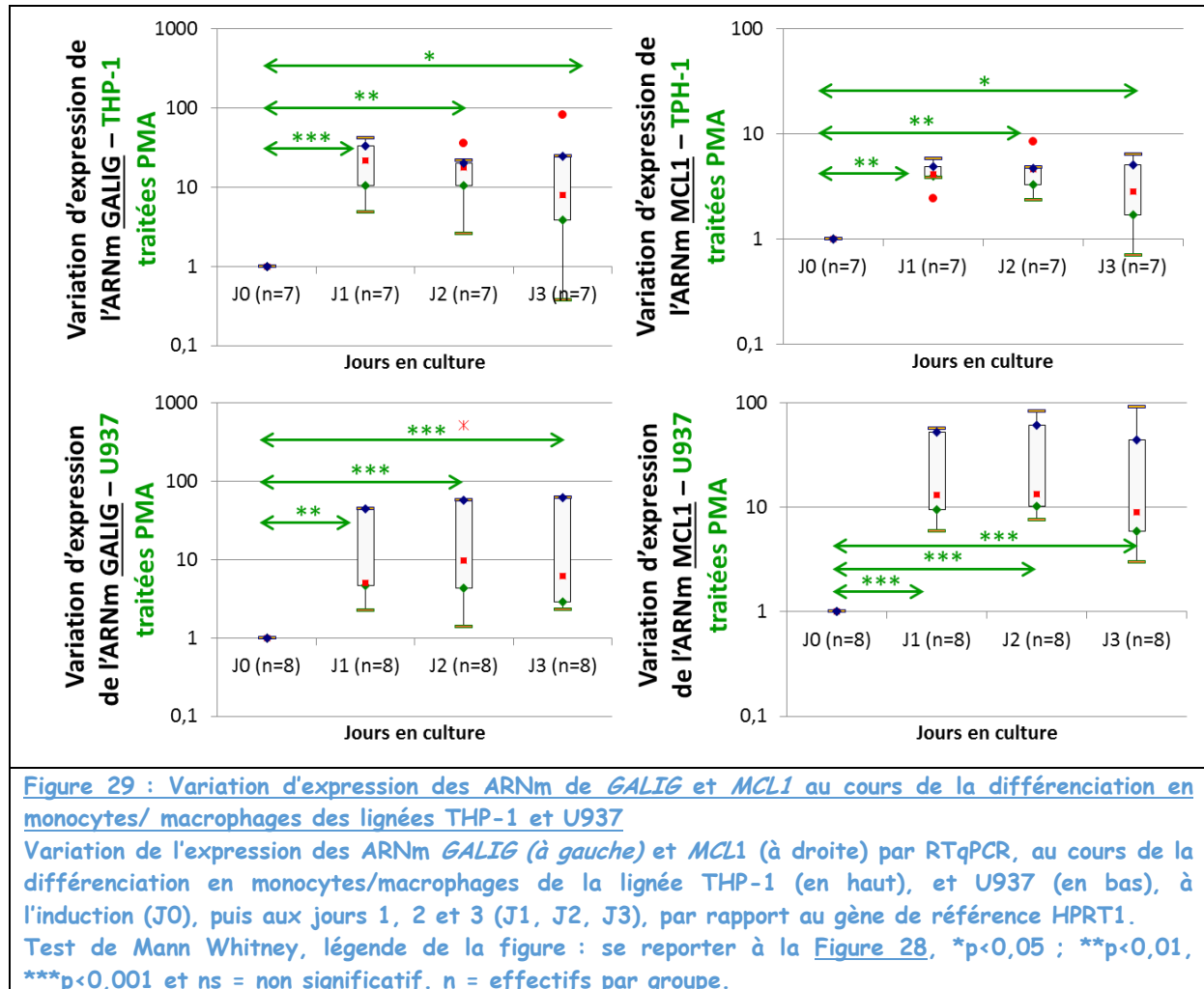
Test de Mann Whitney, les résultats sont présentés sous la forme de boîte à moustache, les carrés rouges représentent la médiane, les boîtes, le 25^{ème} et 75^{ème} quartile, les barres, les valeurs maximum et minimum non-atypiques. Les ronds rouges représentent les valeurs atypiques et les étoiles rouges les valeurs extrêmes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et ns = non significatif. n = effectifs par groupe, sur 5 expériences indépendantes.

En conclusion, nous avons pu montrer qu'au cours de la différenciation en monocytes/macrophages, l'expression du **gène anti-apoptotique *MCL1* augmente précocement, dès la première heure** après l'induction de la différenciation et se stabilise tout le long de la différenciation avec une expression de 10 fois par rapport au jour d'induction. Quant au **gène pro-apoptotique *GALIG***, il augmente non seulement **rapidement, soit dès 2 heures** après l'induction de la différenciation, mais également **très fortement, puisqu'il augmente d'un facteur 100 fois** par rapport au niveau initial.

§ Au cours de la différenciation en macrophages des lignées THP1 et U937

Aucune variation significative n'est observée dans une culture de 3 jours sans inducteur de différenciation (données non montrées). On observe sur la Figure 29, la différenciation en monocytes/macrophages, au cours du temps en jours, de la lignée THP-1 (en haut), et de la lignée U937 (en bas). Le profil d'expression pour ces 2 lignées est identique : pour l'ARNm de *GALIG*, à gauche, on note une **augmentation significative, dès le premier jour** de différenciation, de 21 fois pour les THP-1 et de 5 fois pour les U937. Le niveau d'expression reste ensuite stable durant les trois jours

de différenciation. Quant à l'ARNm de *MCL1*, à droite, il augmente également au cours de ces 2 différenciations d'environ 8 à 10 fois, dès le premier jour et reste stable pendant les 3 jours de différenciation.



En conclusion, on observe également une **augmentation de l'expression de l'ARNm de *GALIG***, pendant la différenciation en monocytes/macrophages des lignées THP-1 et U937. Significative dès le 1^{er} jour, cette augmentation, de 10 fois, est plus modeste que celle mise en évidence avec la lignée plus immature HL-60. **L'expression de l'ARNm du gène anti-apoptotique *MCL1* augmente** elle aussi au cours de ces 2 différenciations, avec une amplitude et une cinétique comparables à celles observées pour la différenciation de la lignée HL-60.

⌘ Au cours de la différenciation en macrophages de monocytes issus de donneurs sains

Nous nous sommes également intéressés à la différenciation de monocytes issus de donneurs sains en macrophages. Cette étude de différenciation de cellules primaires représente un modèle de différenciation plus physiologique, via des cytokines. De plus, à la différence des différenciations précédentes, c'est une différenciation qui s'effectue sans prolifération cellulaire.

Après déplétion des populations lymphocytaires T, B et NK par billes magnétiques, les monocytes sont différenciés par ajout de M-CSF. Sur la Figure 30, l'expression de l'ARNm de *GALIG*, à gauche, **augmente** de façon **significative** de 5 fois **dès le premier jour** de différenciation. A l'inverse, l'expression de l'ARNm de *MCL1*, à droite, quant à lui, **diminue** au cours de la différenciation d'environ **5 fois** et ce dès le premier jour de différenciation.

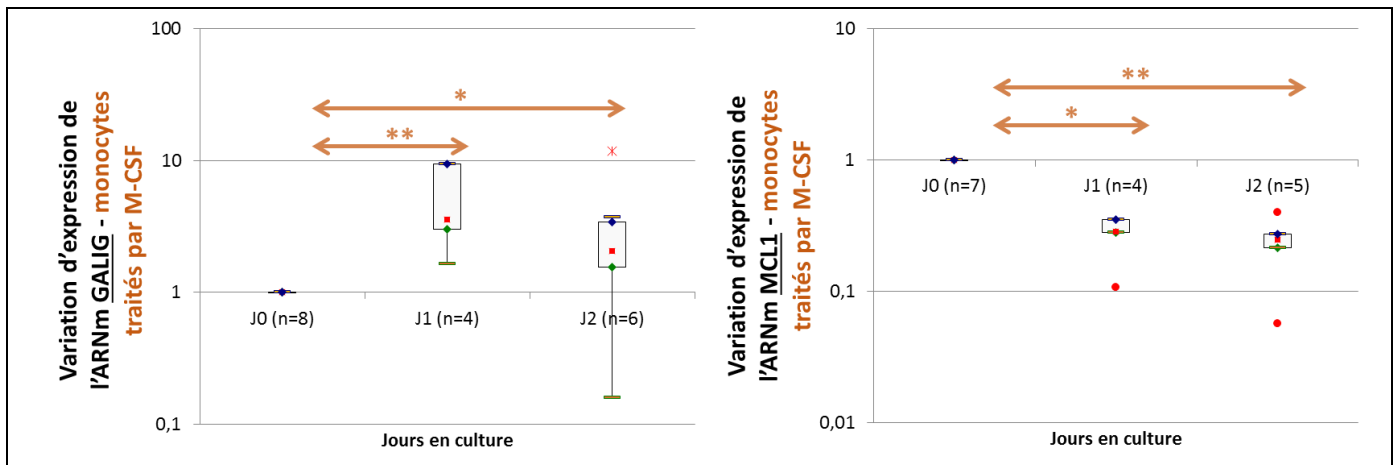


Figure 30 : Variation de l'expression des ARNm *GALIG* et *MCL1*, différenciation des monocytes issus de donneurs sains en macrophages

Variation de l'expression des ARNm *GALIG* (à gauche) et *MCL1* (à droite) par RTqPCR, au cours de la différenciation en monocytes/macrophages de monocytes issus de donneurs sains, à l'induction (J0), puis aux jours 1 et 2 (J1, J2), par rapport au gène de référence HPRT.

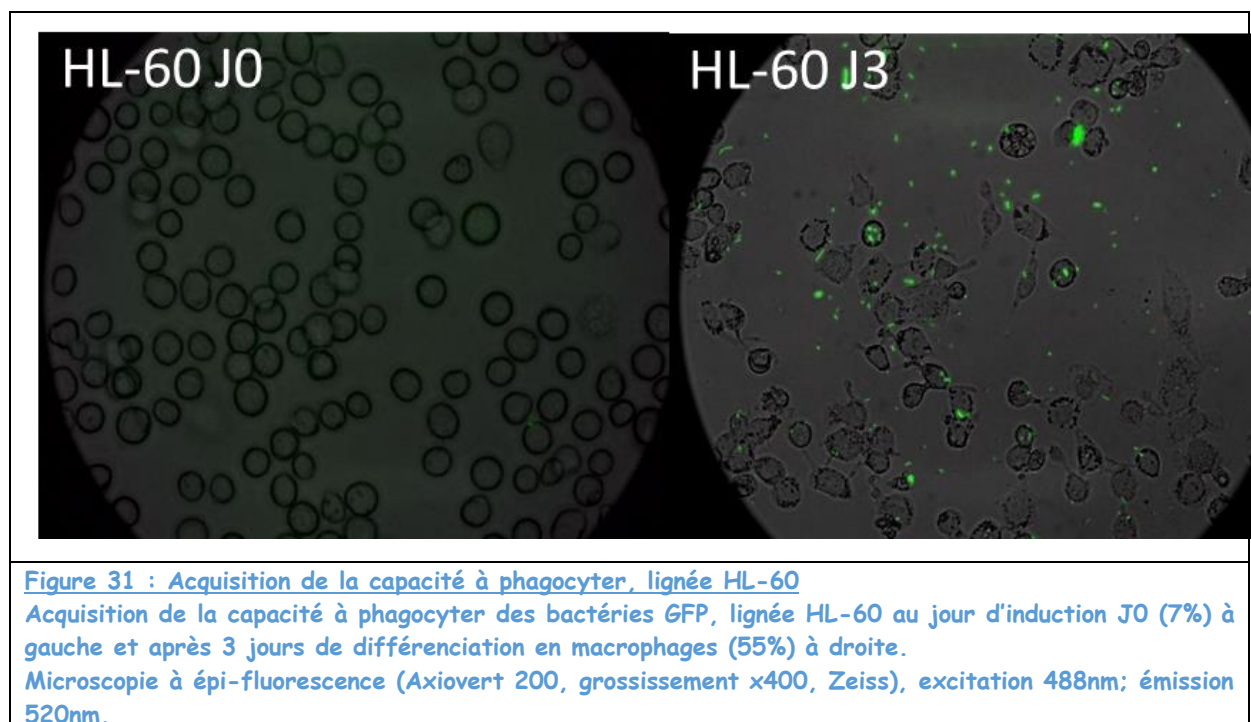
Test de Mann Whitney, légende de la figure se reporter Figure 28, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et ns = non significatif. n = effectifs par groupe.

En conclusion, au cours de la différenciation terminale, sans prolifération, du monocyte en macrophage, l'augmentation modeste de l'expression de l'ARNm *GALIG*, s'accompagne cette fois-ci d'une légère diminution de l'expression de l'ARNm *MCL1*.

b) Acquisition de la capacité à phagocyter :

Les macrophages sont une des principales cellules phagocytaires de l'organisme. Il nous a donc semblé intéressant d'étudier l'acquisition de cette capacité à phagocyter

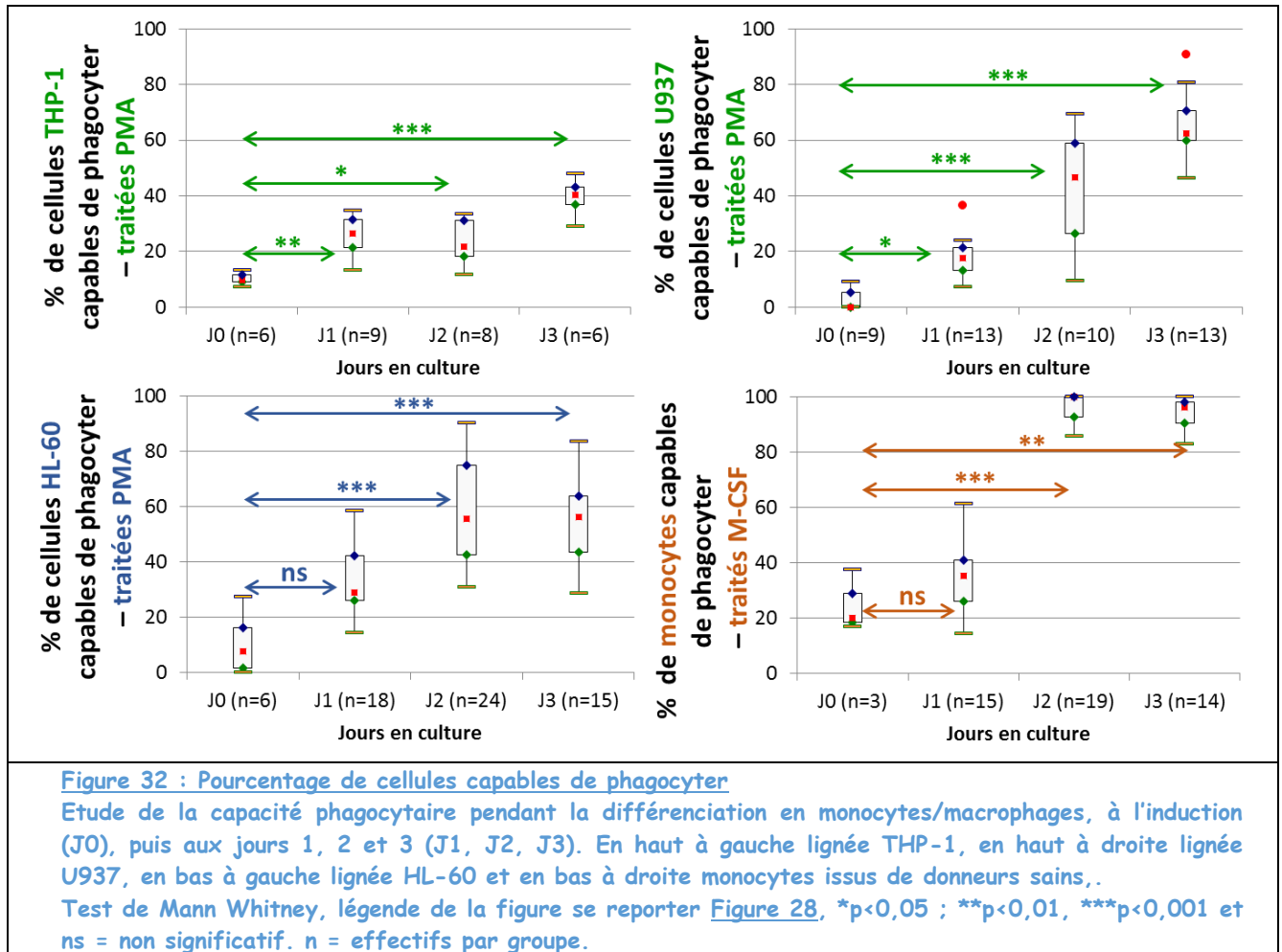
dans ce modèle de différenciation du monocyte *in vitro*, notamment pour évaluer un peu plus précisément la cinétique de maturation terminale en macrophage (Figure 31, image en microscopie et Figure 32, analyse en pourcentage).



Pour les monocytes, cellules primaires issues de donneurs sains (en bas, à droite), le taux initial de cellules capables de phagocyter, comme attendu est faible (20%). On note une augmentation significative de ce pourcentage après le deuxième jour de différenciation en macrophages. Le fort pourcentage observé, 85%, reste stable jusqu'au troisième jour de différenciation.

Pour les lignées THP-1 et U937 (Figure 32, haut), les profils d'acquisition de phagocytose sont similaires. Ainsi, dès le 1^{er} jour après induction de la différenciation, on observe une augmentation significative du pourcentage de cellules capables de phagocyter des bactéries (respectivement de 11 à 26% pour les THP-1, et de 0 à 17% pour les U937). Ce pourcentage continue à augmenter pour atteindre, après 3 jours de culture, respectivement 40% pour la lignée THP-1 et 62% pour la lignée U937.

Pour la lignée HL-60, plus immature que les 2 premières, une augmentation significative du pourcentage de cellules douées de phagocytose n'est mise en évidence qu'à partir du 2^{ème} jour de différenciation : initialement de 7,7%, le taux passe à 55%. Ce pourcentage se maintient au troisième jour de différenciation.



Pour conclure, lorsqu'on induit la différenciation *in vitro* en monocytes/macrophages les cellules induites acquièrent rapidement la capacité à phagocyter des bactéries. Les lignées THP-1 et U937, les plus matures des lignées testées, en sont capables dès le premier jour de différenciation et la lignée HL-60 et les monocytes issus de donneurs sains le sont après 2 jours de différenciation.

III. Conclusion :

Nous avons tout d'abord montré que le niveau d'expression de *GALIG* est différent dans des cellules issues de patients atteints de 2 types de LAM correspondant à 2 états de différenciation différents. Ainsi le niveau d'expression de *GALIG* est plus faible dans les myéloblastes de LAM de type M2 par rapport aux promyélocytes de LAM de type M3. *GALIG* est donc moins exprimé dans les cellules leucémiques les plus immatures (LAM-M2) que dans celles plus matures (LAM-M3) (article 1- Fig. 1).

Nous avons ensuite étudié l'expression de *GALIG*, ainsi que différents paramètres, dans plusieurs modèles de différenciation *in vitro*, soit depuis des lignées cellulaires d'origine myéloïde soit depuis des monocytes purifiés (Tableau 4).

	Vers Macrophages				Vers PN
	HL-60	THP-1	U937	Monocytes	HL-60
ARNm anti-apoptotique <i>MCL-1</i>	x10 à J1 x3,2 à 1 h	x5 à J1	x1,3 à J1	x0,2 à J1	x1,9 à J1
ARNm pro-apoptotique <i>GALIG</i>	x100 à J1 x3,5 à 2 h	x10 à J1	x10 à J1	x5 à J1	x4,9 à J2
Caspases apoptotiques -8, -9 et -3	8% à J2 13% à J2 8% à J3	Non fait	Non fait	Non fait	ns 2,7% à J2 ns
Caspase inflammatoire -1	46% à J3	Non fait	Non fait	Non fait	3,9% à J3
Arrêt de prolifération	J1	Non fait	Non fait	Non fait	J4
Acquisition de la phagocytose	55% à J2	26% à J1	21% à J1	100% à J2	Non fait

Tableau 4 : Récapitulatifs des paramètres étudiés dans différents modèles de différenciation myéloïde.

Variations des différents paramètres observées pendant la différenciation, 1^{re} différence observée, J1, J2 et J3 (jours après induction de la différenciation), h : heure après induction de la différenciation, PN : polynucléaire neutrophile, ns : non significatif, x : fois, / : divisé.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence que le niveau d'expression de *GALIG* augmente au cours de la différenciation en monocytes/macrophages (article 1-Fig. 2), (Figure 29 et Figure 30), et en polynucléaires neutrophiles (article 1-Fig. 2).

De plus, cette augmentation d'expression de *GALIG* pour la différenciation en macrophage est d'autant plus importante que la cellule initialement induite est immature. Cette augmentation d'expression du gène pro-apoptotique *GALIG* s'accompagne également de l'augmentation de l'expression du gène anti-apoptotique *MCL1* (article 1-Fig. 2), (Figure 29). Dans le cas particulier de la différenciation des HL-60 en monocytes/macrophages, une cinétique d'expression à des temps plus précoces a été réalisée. Elle montre que l'augmentation du niveau du gène anti-apoptotique *MCL1*, observable dès une heure de stimulation, précède donc d'une heure, l'augmentation d'expression du gène pro-apoptotique *GALIG*.

A l'inverse, on observe une diminution de l'ARNm *MCL1* au cours de la différenciation terminale du monocyte d'environ 5 fois (Figure 30).

Il a été établi que les caspases impliquées dans l'apoptose jouent également un rôle dans la différenciation cellulaire. Au cours de la **différenciation en macrophages** nous retrouvons les résultats de la littérature (Sordet *et al.* 2002; Rébé *et al.* 2007; Droin *et al.* 2008), à savoir une **activation des caspases-3** (article 1-Fig. 2), -8 (données non montrées) et -9 (article 1-Fig. 2) dès le **deuxième jour** de différenciation. Quant à la **différenciation en polynucléaire neutrophile**, aucune donnée n'est disponible dans la littérature. Nous montrons que la **caspase-9** (article 1-Fig. 2) est la seule à être **activée** et cela également dès le **deuxième jour** de différenciation.

La différenciation cellulaire met en place d'autres processus, comme l'**arrêt de la prolifération cellulaire** (article 1-Fig. 3), l'**activation de la caspase pro-inflammatoire 1** (article 1-Fig. 3), et l'acquisition de la **capacité à phagocyter** pour les **macrophages** (Figure 32).

Pour la différenciation en **polynucléaire neutrophile** de la lignée HL-60, on note un **ralentissement de la prolifération cellulaire** après 4 jours de différenciation (article 1-Fig. 3). La **caspase pro-inflammatoire 1** est activée après 3 jours de différenciation, bien que le pourcentage de cellules l'exprimant soit plus faible (4%) que pour la différenciation en macrophages (46%) (article 1-Fig. 3). La capacité à phagocyter des bactéries n'a pas été évaluée au cours de cette différenciation.

On note pour la **différenciation en monocytes/macrophages** de la lignée HL-60 un ralentissement de la prolifération cellulaire dès le premier jour de différenciation, conduisant à un arrêt total du cycle cellulaire, puisque seules 16% des cellules se divisent encore après 3 jours et seulement 9% après 4 jours (article 1-Fig. 3). De plus, **après 3 jours de différenciation 46% des cellules ont une caspase-1 active**, et sont donc capables de produire de l'interleukine-1 β (article 1-Fig. 3). Le dernier facteur de différenciation étudié est l'acquisition pour ces cellules différenciées, de la capacité à phagocyter (Figure 32). Les **cellules HL-60** acquièrent cette capacité **après 2 jours d'induction** de la différenciation, **comme les monocytes issus de donneurs sains**. Pour les lignées **THP-1 et U937** cette capacité est **acquise dès le premier jour d'induction** de la différenciation en macrophages.

En résumé, l'augmentation d'expression du gène ***GALIG*** au cours de ces différenciations semble être **assez précoce** puisqu'elle précède l'arrêt de la **prolifération**, l'**activation des caspases** et l'**acquisition de la capacité à phagocyter** qui sont mis en évidence plus tardivement. Ainsi, cette augmentation de ***GALIG***, gène **pro-apoptotique** peut entraîner un **destin cellulaire**, autre que la mort (Duneau *et al.* 2005; Gonzalez *et al.* 2009; Mollet *et al.* 2013). Comme les caspases, le gène ***GALIG***, pourrait donc avoir dans les cellules monocytaires et granulocytaires des fonctions autres que l'induction de l'apoptose. Cependant, l'absence de **mort prématurée** des cellules en différenciation, pourrait être liée notamment à un contrôle de l'expression de ***GALIG*** en parallèle à une expression très précoce du gène **anti-apoptotique *MCL1***.

Résultats : 2^e partie : GALIG en conditions pathologiques

Défaut de différenciation : cas des leucémies Aiguës Myéloïdes :

I. Introduction :

Afin de compléter les données obtenues sur la différenciation des lignées cellulaires et d'augmenter la **diversité des échantillons**, nous avons établi une collaboration avec le service **d'hématologie clinique de l'Unité d'hématologie** et le **Service de génétique** du Centre Hospitalier Régional d'Orléans (CHRO). Cette collaboration nous a permis d'étudier l'**expression de GALIG** et de ses **partenaires**, dans la **moelle osseuse** et le **sang**, au **diagnostic** de la LAM, ainsi **qu'après cure de chimiothérapie**.

II. Matériel et méthode :

A. Les patients :

Le panel de patients comprend différents types de LAM, des LAM *de novo*, ainsi que des LAM secondaires à différentes pathologies, voir Tableau 5 prélèvements de moelle osseuse et Tableau 6 prélèvements de sang, pour les informations cliniques relatives aux patients. Pour les LAM de types M0, M1, M2, M3 et M4 (groupe M0-M4), on observe une moyenne d'âge de 60 ans, avec 6 hommes et 6 femmes, et un pourcentage de blastes dans la MO compris entre 29% - 83%. Pour les LAM de type M5 (groupe M5), on observe une moyenne d'âge de 64 ans, avec 6 hommes et 5 femmes, et un pourcentage de blastes dans la MO compris entre 13% - 92%. Nous avons obtenu un seul prélèvement de LAM-M6, un homme avec 82% de blastes, et nous n'avons obtenu aucun prélèvement de LAM-M7.

	Age	Sexe	Num Leuco (10 ⁹ /L)	Caryotype	% de blastes	prélèvement post-cure			type de LAM	de novo ou secondaire	commentaires
LAM001	57	F	208	Normal	82	J38			1	de novo	Surexpression WT1. Mutation NPM1
LAM002	44	F	172	Normal	73	J44	J120		4	de novo	Surexpression WT1. Mutation NPM1
LAM003	81	H	1	Complexe	33				2	Secondaire	X
LAM004	25	F	X	X	X	J55	J89	J172	3	X	Non reçu au diagnostic
LAM005	72	F	4	X	81				1 ou 5	X	Inclassable / Décès
LAM006	35	F	3	Normal	48	J46	J57		5a	Secondaire	Rechute LAM5a Mutation CEPBA biallélique.LAM5a
LAM007	67	H	8	Complexe	13	J50			5	Secondaire	Surexpression WT1
LAM009	56	F	7	Normal	83	J42	J201		1	de novo	Surexpression. WT1 Mutation NPM1
LAM011	59	F	18	Normal	29	J63	J141	J202	0	Secondaire	Surexpression WT1
LAM012	45	F	3	Normal	34				2	de novo	X
LAM013	77	H	2	Normal	36				2	de novo	Surexpression WT1
LAM014	39	H	14	Complexe	68				5	Secondaire	Transloc ou inv du 16 : CBFb/MYH11 / Surexpression WT1
LAM015	81	H	3	Intermédiaire	48				5a	de novo	(10% monocytes matures) / 5a / Mutation NPM1
LAM016	79	F	78	X	66				5	de novo	X
LAM017	43	F	6	Normal	86				5	de novo	Rémission juillet 2015
LAM018	70	H	7	X	61				5	de novo	Rémission juillet 2015
LAM019	66	H	14	X	80				5a	de novo	Mutation FLT3 et NPM1 Surexpression WT1
LAM020	64	H	4	Normal	45				2	de novo	Surexpression WT1 / décès (péritonite)
LAM022	64	F	19,7	X	92				5	X	5b (10 monoblastes + 82 monocytes +/- différenciés
LAM023	47	H	105	Normal	72	J60			3	X	LAM "3" pas de corps d'Auer / BCR-ABL
LAM024	79	H	3,3	Complexe	31				2	Secondaire	X
LAM026	68	H	1,4	Complexe	82				6	X	82% Erythroblastes (57%MYELO-MONO)
LAM028	88	H	1,4	X	X				5	X	X
LAM029	46	H	39,1	Normal	94,6				3	X	type 3 variant à confirmer
LAM030	69	F	1,4	Normal	75	J39			1	de novo	X

Tableau 5 : Tableau clinique des patients, prélèvements de moelle osseuse

Colonne 1 : n° d'anonymat, colonne 2 : âge du patient au diagnostic, colonne 3 : sexe, colonne 4 : numération leucocytaire dans le sang au diagnostic (norme 4-10. 10⁹ cellules/L), colonne 5 : interprétation du caryotype, colonne 6 : % de blastes dans la moelle osseuse au diagnostic, colonne 7 : temps en jours du prélèvement post-cure, colonne 8 : type de LAM classification Franco-Américano-Britannique, colonne 9 : type de LAM *de novo* ou secondaire, colonne 10 : commentaires divers, WT1 : Wilm's Tumor 1, NPM1 : Nucléophosmine, Transloc : translocation, inv : inversion, CBFb : Core-binding factor subunit β, MYH11 : Myosin Heavy-chain 11, FLT3 : FMS-like tyrosine kinase 3, BCR-ABL : Breakpoint Cluster Region-Abelson.

	Age	Sexe	Num Leuco (10 ⁹ /L)	Caryotype	% de blastés	prélèvement post- cure			type de LAM	de novo ou secondaire	commentaires
LAM001	57	F	208	Normal	92	J38			1	de novo	Surexpression WT1. Mutation NPM1
LAM002	44	F	172	Normal	64	J44			4	de novo	Surexpression WT1. Mutation NPM1
LAM003	81	H	1	Complexe	18				2	Secondaire	X
LAM004	25	F		X	X	J55	J89		3	X	Non reçu au diagnostic
LAM005	72	F	4	X	56				1 ou 5	X	Inclassable / Décès
LAM006	35	F	3	Normal	9	J46			5a	Secondaire	Rechute LAM5A Mutation CEPBA biallélique.LAM5a
LAM007	67	H	8	Complexe	1	J50			5	Secondaire	Surexpression WT1
LAM008	68	H	2	X	11				0	de novo	de novo / Surexpression. WT - départ Paris
LAM009	56	F	7	Normal	70	J42			1	de novo	Surexpression. WT1, Mutation NPM1
LAM011	59	F	18	X	26	J63	J141	J202	0	Secondaire	Surexpression WT1
LAM012	45	F	3	Normal	11				2	de novo	X
LAM013	77	H	2	Normal	X				2	de novo	Surexpression WT1
LAM014	39	H	14	Complexe	74				5	Secondaire	Transloc ou inv du 16 : CBFb/MYH11 / surexp WT1 en 2013
LAM015	81	H	3	Intermédiaire	X				5	de novo	(10% monocytes matures) / 5a / mut NPM1
LAM016	79	F	78	X	65				5	de novo	X
LAM017	43	F	6	Normal	90				5	de novo	Rémission juillet 2015
LAM018	70	H	7	X	1				5	de novo	Rémission juillet 2015
LAM019	66	H	14		59				5	de novo	Mutation FLT3 et NPM1 Surexpression WT1
LAM020	64	H	4	Normal	2				2	de novo	Surexpression WT1 / décès (péritonite)
LAM022	64	F	19,7	X	3				5	X	5b (10 monoblastes + 82 monocytes +/- différenciés
LAM023	47	H	105	Normal	50	J60			"3"	X	LAM "3" pas de corps d'Auer / BCR-ABL
LAM024	79	H	3,3	Complexe	< 1				2	Secondaire	X
LAM025	60	H	1,6	X	34,9				X	X	marqueur monocyttaire
LAM028	88	H	1,4	X	X				5	X	X
LAM029	46	H	39,1	Normal	94,6				3	X	type 3 variant à confirmer
LAM030	69	F	1,4	Normal	43				1	de novo	X

Tableau 6 : Tableau clinique des patients, prélèvements sanguins

Colonne 1 : n° d'anonymat, colonne 2 : âge au diagnostic, colonne 3 : sexe, colonne 4 : numération leucocytaire dans le sang au diagnostic (norme 4-10. 10⁹ cellules/L), colonne 5 : interprétation du caryotype, colonne 6 : % de blastés dans le sang au diagnostic, colonne 7 : temps en jours du prélèvement post-cure, colonne 8 : types de LAM classification Franco-Américano-Britannique, colonne 9 : type de LAM *de novo* ou secondaire, colonne 10 : commentaires divers : WT1 : Wilm's Tumor 1, NPM1 : Nucléophosmine, Transloc : translocation, inv : inversion, CBFb : Core-binding factor subunit β , MYH11 : Myosin Heavy-chain 11, FLT3 : FMS-like tyrosine kinase 3, BCR-ABL : Breakpoint Cluster Region-Abelson.

B. Comité d'éthique CHRO :

Le comité d'éthique du CHR d'Orléans a donné un avis favorable le 30 juin 2014, à l'étude (2014.01 : Implication du gène *GALIG* dans les Leucémies Aiguës Myéloïdes et les pathologies impliquant l'oncogène *MCL1*). Tous les patients ont donné leur consentement éclairé écrit, qui suit l'ensemble des principes éthiques établis par la Déclaration d'Helsinki (1964).

C. Différenciation cellulaire, extraction des ARN totaux et dosage par ddPCR

La purification des cellules mononucléées du sang et de la moelle osseuse, la différenciation en monocytes/macrophages des cellules de patients atteints de LAM, la lyse et l'extraction des ARN totaux sont les mêmes que celles utilisées pour la différenciation des lignées cellulaires décrites [article 1](#). La technique de dosage par ddPCR des différents gènes étudiés pour les cellules issues de patients atteints de LAM est la même que celle utilisée pour l'étude des patients atteints du VIH [article 2](#).

III. Résultats :

A. Groupe M0-M4 :

1) [Expression du gène *GALIG* et des gènes impliqués dans l'autophagie :](#)

a) [Au niveau de la moelle osseuse](#)

Nous avons quantifié l'expression de *GALIG* dans le groupe M0-M4, ainsi que l'expression des différents partenaires de *GALIG*, *GABARAP*, *GABARAPL1*, Bécline-1/*BECN1*, *LC3b* et *p62/SQSTM1*, dans les cellules mononucléées de la moelle osseuse (Figure 33).

On observe une **sous-expression significative du gène *GALIG*** ($p = 0,0065$) dans les cellules de la moelle osseuse de patients atteints de LAM au diagnostic (médiane = 40 copies) par rapport au prélèvement **post-cure de chimiothérapie** (médiane = 113 copies) (Figure 32, en haut à gauche).

Pour les gènes *LC3B*, *GABARAP*, *GABARAPL1*, Bécline-1/*BECN1* et *p62/SQSTM1*, nous n'avons observé **aucune différence** d'expression entre le diagnostic et le traitement post-cure dans le groupe de LAM M0-M4 (Figure 32).

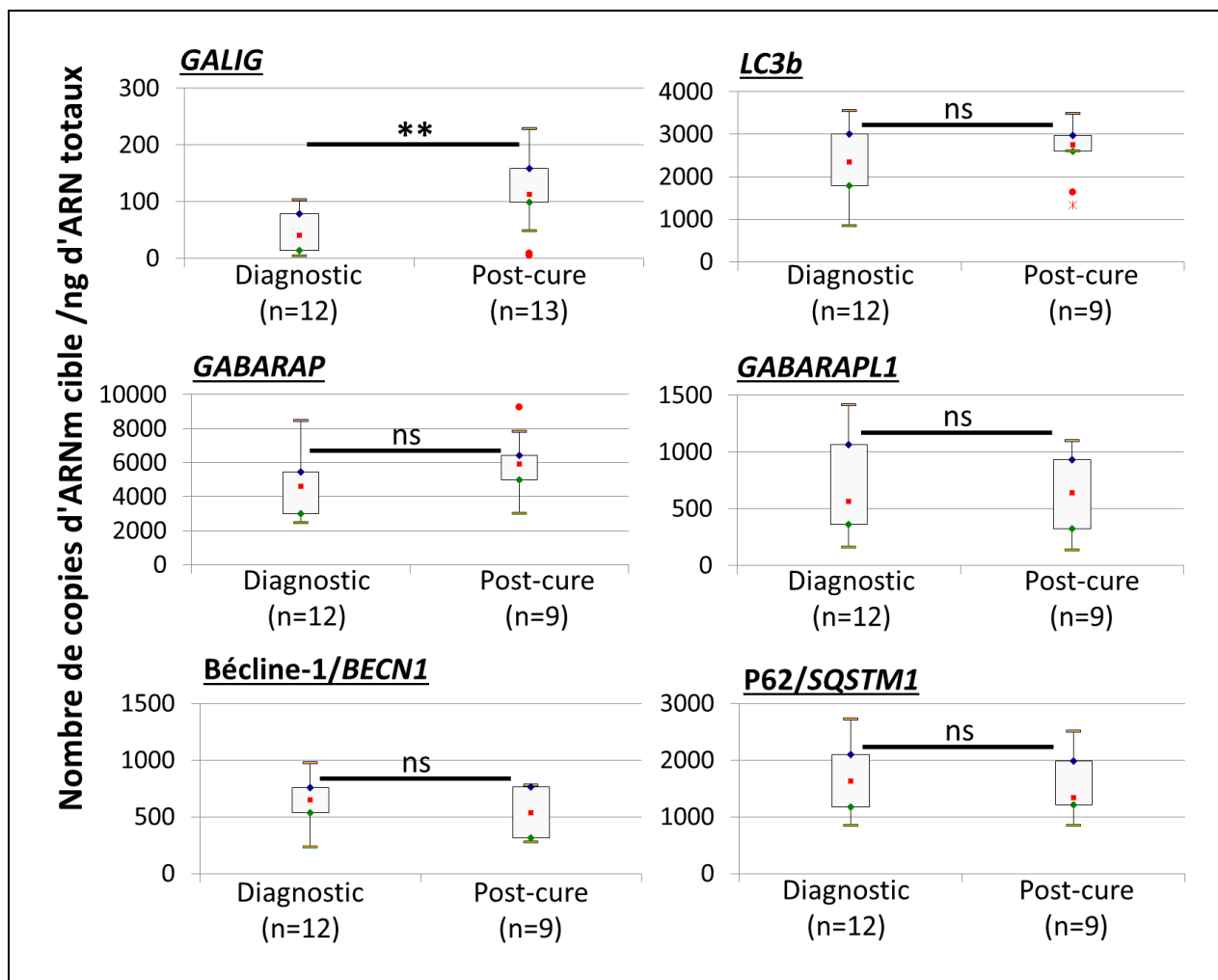


Figure 33 : Expression de *GALIG* et des gènes impliqués dans l'autophagie, dans la moelle osseuse du groupe MO-M4

Le nombre de copies d'ARNm par ng d'ARN totaux a été mesuré par ddPCR, dans les cellules de la moelle osseuse (MO), au diagnostic (Diagnostic) et post-cure de chimiothérapie (Post-cure).

ARNm *GALIG* en haut à gauche, ARNm *LC3B* en haut à droite, ARNm *GABARAP* au milieu à gauche, *GABARAPL1* au milieu à droite, ARNm Bécline-1/*BECN1* en bas à gauche et ARNm p62 en bas à droite.

Test de Mann Whitney, légende de la figure se reporter Figure 28, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et ns = non significatif. n = effectifs par groupe.

En conclusion, au niveau du groupe qui représente les blocages de différenciation allant du myéloblaste avec différenciation minimale (M0) au myélomonocyte (M4) nous n'avons observé **aucune différence significative** d'expression des gènes impliqués dans l'autophagie au **diagnostic** de la LAM et après le **traitement de chimiothérapie**. Le seul niveau d'expression **significativement différent** concerne celui du gène *GALIG*, qui est quant à lui très **inférieur** dans la moelle leucémique, comparé à celui observé **après la cure de chimiothérapie**.

b) Au niveau du sang :

De la même façon, nous avons quantifié l'expression de *GALIG* et des gènes *GABARAP*, *GABARAPL1*, Bécline-1/*BECN1*, *LC3B* et *p62/SQSTM1*, impliqués dans l'autophagie, dans les cellules mononucléées du sang des patients du groupe M0-M4 (Figure 34). Nous avons également pu comparer ces prélèvements à des prélèvements-contrôles issus de donneurs sains.

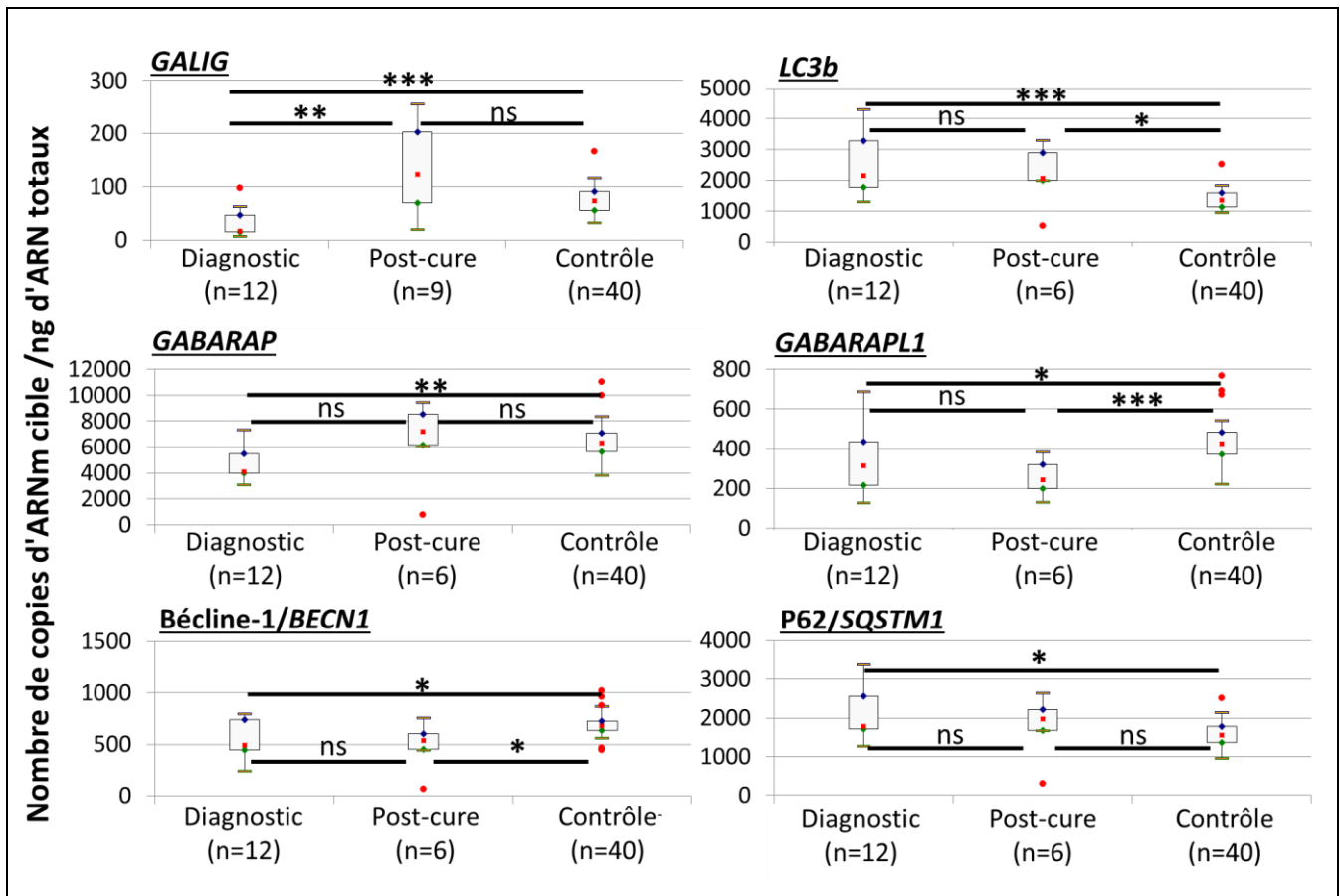


Figure 34 : Expression de *GALIG* et des gènes impliqués dans l'autophagie, dans le sang du groupe M0-M4

Le nombre de copies d'ARNm par ng d'ARN totaux a été mesuré par ddPCR, dans les cellules du sang, au diagnostic (Diagnostic), post-cure de chimiothérapie (Post-cure) et chez les donneurs sains (Contrôle). ARNm *GALIG* en haut à gauche, ARNm *LC3B* en haut à droite, ARNm *GABARAP* au milieu à gauche, *GABARAPL1* au milieu à droite, ARNm Bécline-1/*BECN1* en bas à gauche et ARNm *p62/SQSTM1* en bas à droite.

Test de Mann Whitney, légende de la figure se reporter Figure 28, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ et ns = non significatif. n = effectifs par groupe.

⌘ Comparaison entre les prélèvements sanguins au diagnostic et post-cure de chimiothérapie :

Comme observé dans les cellules de la moelle osseuse, on note une **sous-expression significative de *GALIG*** ($p = 0,000047$) dans le sang au diagnostic (médiane

= 16 copies), par rapport aux **prélèvements post-cure** (médiane = 123 copies) (Figure 33, en haut à gauche). Par contre, **aucune différence significative** n'est observée, entre les **taux d'expression au diagnostic** et ceux **après le traitement post-cure** de chimiothérapie pour les gènes dosés impliqués dans l'autophagie. (Figure 34, haut/gauche)

↻ Comparaison entre les prélèvements sanguins au diagnostic et issus de donneurs sains :

On note également une sous-expression de GALIG ($p = 0,00017$), observée lorsqu'on compare son taux **au diagnostic** (médiane = 16 copies) par rapport au **sang issu de donneurs sains** (médiane = 74 copies). De plus, on observe une **sous-expression au diagnostic** de la leucémie en comparaison aux **donneurs sains** pour les gènes GABARAP, GABARAPL1, et Bécline/BECN1, et une **surexpression** des gènes LC3B et p62/SQSTM1, au diagnostic par rapport aux donneurs sains (Figure 34).

↻ Comparaison entre les prélèvements sanguins post-cure et issus de donneurs sains :

Par contre, on n'observe aucune différence significative entre le dosage du sang de patients après la cure de chimiothérapie et celui de donneurs sains pour les gènes GALIG, GABARAP et p62/SQSTM1. Par contre, comme pour le sang au diagnostic et celui des donneurs sains, LC3B est surexprimé post-cure de chimiothérapie en comparaison au sang contrôle, et Bécline-1/BECN1 et GABARAPL1 sont quant à eux sous-exprimés.

En conclusion, l'envahissement du compartiment sanguin par les blastes immatures en excès de la MO conduit inévitablement à des différences significatives d'expression pour ces 6 gènes étudiés entre le diagnostic de la LAM et le sang contrôle. L'expression de GALIG, GABARAP, GABARAPL1 et BECLINE est **diminuée**, alors que l'expression de LC3B et p62 est **plus forte**. Après **chimiothérapie** seul les gènes GABARAP, p62 et GALIG retrouvent le **même taux d'expression** que le sang contrôle.

B. Groupe M5 :

Le groupe des LAM de type M5 est un groupe très hétérogène en termes de population cellulaire. En effet, dans la **LAM 5a**, on observe la présence de **monoblastes indifférenciés** et dans la **forme 5b**, la présence majoritaire de **blastés différenciés**,

monocytaires. Le taux d'expression de ***GALIG*** dans la moelle osseuse varie pour ces patients de 6 copies à 394 copies par nanogramme d'ARN, (Tableau 7). Nous observons également de très forte hétérogénéité d'expression pour les gènes impliqués dans l'autophagie : ***LC3B*** (1178-3280 copies par ng d'ARN), ***GABARAPL1*** (204-1031 copies par nanogramme d'ARN), ***p62*** (984-3420 copies par nanogramme d'ARN), ***BECLINE*** (492-1390 copies par nanogramme d'ARN) et ***GABARAP*** (3080-10960 copies par nanogramme d'ARN).

	% de blastes	types FAB	<i>GALIG</i>	<i>LC3</i>	<i>GABARAPL1</i>	<i>p62/SQSTM1</i>	<i>Bécline-1/BECLIN1</i>	<i>GABARAP</i>
LAM028	X	5	142	2680	371	1860	650	7060
LAM005	81	1 ou 5	117	3280	583	3160	684	5700
LAM007	13	5	321	1614	538	1690	643	7300
LAM014	68	5	10	1178	204	1046	516	4160
LAM015	48	5	255	2260	534	1882	835	4860
LAM016	66	5	226	2620	867	2420	602	8040
LAM017	86	5	6	1356	281	1666	621	3080
LAM018	61	5	113	2400	767	1284	492	5480
LAM019	80	5	12	1980	420	1660	624	5080
LAM022	92	5	394	2760	1031	3420	1390	10960
LAM006	48	5a	35	2200	496	984	536	3300
MEDIANE			117	2260	534	1690	624	5480
25 ^{ème} quartile			23	1797	395	1472	569	4510
75 ^{ème} quartile			240	2650	675	2151	667	7180

Tableau 7 : Nombre de copies d'ARNm/ng d'ARN totaux dans les cellules de patients atteints de LAM-M5
 Colonne 1 : n° d'identification de la LAM, colonne 2 : % de blastes dans la moelle osseuse au diagnostic, colonne 3 : types de LAM selon la classification FAB (Franco-Américano-Britannique), colonne 4 à 9 : nombres de copies d'ARNm par nanogramme d'ARN totaux, les cases blanches correspondent aux valeurs minimum et maximum. En bas, les médianes, le 25^{ème} et 75^{ème} quartile correspondant aux différents gènes dosés.

Nous ne pouvons donc malheureusement pas conclure quant à l'expression de ***GALIG*** et ses partenaires dans les LAM-M5 en raison du très fort taux de variation d'expression de ces gènes.

C. Groupe M6 :

Pour le groupe des LAM de type M6 nous n'avons obtenu qu'un seul prélèvement issu de la moelle osseuse de ce patient. Ce patient a un pourcentage d'**érythroblastes de 82%** dans la moelle osseuse. Le taux d'expression de ***GALIG*** reste faible, avec **47 copies** d'ARNm par nanogramme d'ARN totaux (Tableau 8), au même niveau que celui observé pour le groupe des LAM-M0 à LAM-M4. De plus, l'expression des gènes dosés, impliqués

dans l'autophagie semble être **inférieure à celle des LAM-M0 à LAM-M4**, de **2 fois** pour *LC3B* et *GABARAPL1* et de **4 fois** pour *Bécline*, *p62* et *GABARAP*.

N° de LAM	% de blastes	Types FAB	Nombre de copies d'ARNm /ng ARN totaux					
			<i>GALIG</i>	<i>LC3</i>	<i>GABARAPL1</i>	<i>p62/SQSTM1</i>	<i>Bécline-1/BECN1</i>	<i>GABARAP</i>
LAM026	82	6	47	1624	248	442	136	1210

Tableau 8 : Nombre de copies d'ARNm dans les cellules du patient atteint d'une LAM-M6
 Colonne 1 : n° d'identification de la LAM, colonne 2 : % de blastes dans la moelle osseuse au diagnostic, colonne 3 : types de LAM selon la classification FAB (Franco-Américano-Britannique), colonne 4 à 9 : nombres de copies d'ARNm par nanogramme d'ARN totaux.

GALIG et plusieurs gènes impliqués dans l'autophagie semblent s'exprimer plus faiblement dans cette leucémie érythrocytaire. Mais sans donnée complémentaire, comme d'autres prélèvements de LAM-M6 et le retour post-cure de ce patient, nous ne pouvons pas conclure quant au taux d'expression de ces gènes.

D. Réinduction de la différenciation :

Nous avons également étudié la cinétique d'expression de *GALIG* et de ses partenaires, au cours de la **réinduction de la différenciation cellulaire** de cellules issues de la moelle osseuse de patients atteints de **3 types LAM de novo** différentes (Figure 35) : une **LAM-M1** (myéloblastes sans différenciation) très immature, une **LAM-M2** (myéloblastes avec différenciation) peu différenciée et enfin une **LAM-M4** (myélomonocytes) plus avancée dans la différenciation.

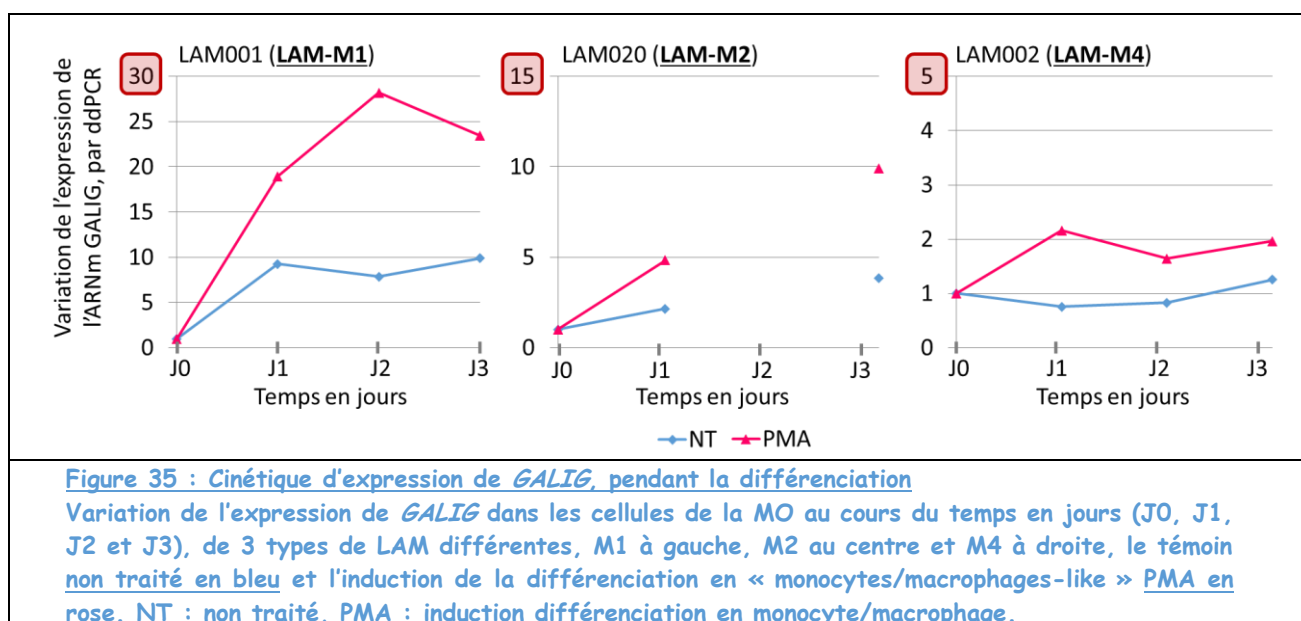
1) Variation d'expression du gène *GALIG* :

On peut observer Figure 35, la variation d'expression de l'ARNm de *GALIG* au cours du temps, pendant la différenciation en monocytes/macrophages après ajout de PMA et le témoin non traité.

Pour la **LAM-M1**, on observe une légère variation d'expression de *GALIG*, stable au cours du temps, pour le témoin d'expérience : on note une augmentation de **9 fois** par rapport au jour initial. Par contre l'induction de la différenciation induit **une augmentation forte et rapide, de *GALIG* de 19 fois** dès le premier jour de différenciation, et atteint **28 fois** au deuxième jour de différenciation avant de légèrement redescendre.

Pour la **LAM-M2**, plus différenciée que la **LAM-M1**, on observe une augmentation de **3,8 fois** pour le **témoin non traité**. L'augmentation de *GALIG* quant à elle est **moins forte** que pour la **LAM-M1**. En effet, elle n'est seulement que de **10 fois** au troisième jour de différenciation en monocytes/macrophages.

Pour la **LAM-M4**, la plus mature des **LAM** étudiées, l'expression de *GALIG* **oscille très légèrement** pour le **témoin non traité**. Par contre, lorsqu'on induit la différenciation en monocytes/macrophages, l'augmentation de *GALIG* est **plus faible**, que pour les 2 cas précédents, (seulement **2 fois** au troisième jour de différenciation).



Tout comme après traitement chimio-thérapeutique, l'expression de l'ARNm de *GALIG* **augmente** donc également au cours de la **réinduction de la différenciation** de cellules **issues de patients** atteints de LAM. On peut également observer que l'augmentation d'expression lors de la différenciation en monocytes/macrophages est d'autant plus faible que l'avancée dans la différenciation de la cellule induite est importante. En effet, le niveau de *GALIG* augmente de **28 fois** pour la **LAM-M1**, et passe à **9 fois** pour la **LAM-M2**, plus différenciée et à **2 fois** pour la **LAM-M3**, la **plus mature des LAM** testées. L'augmentation d'expression de *GALIG* au cours de la réinduction de la différenciation des LAM semble donc être inversement corrélée au degré de différenciation cellulaire initial.

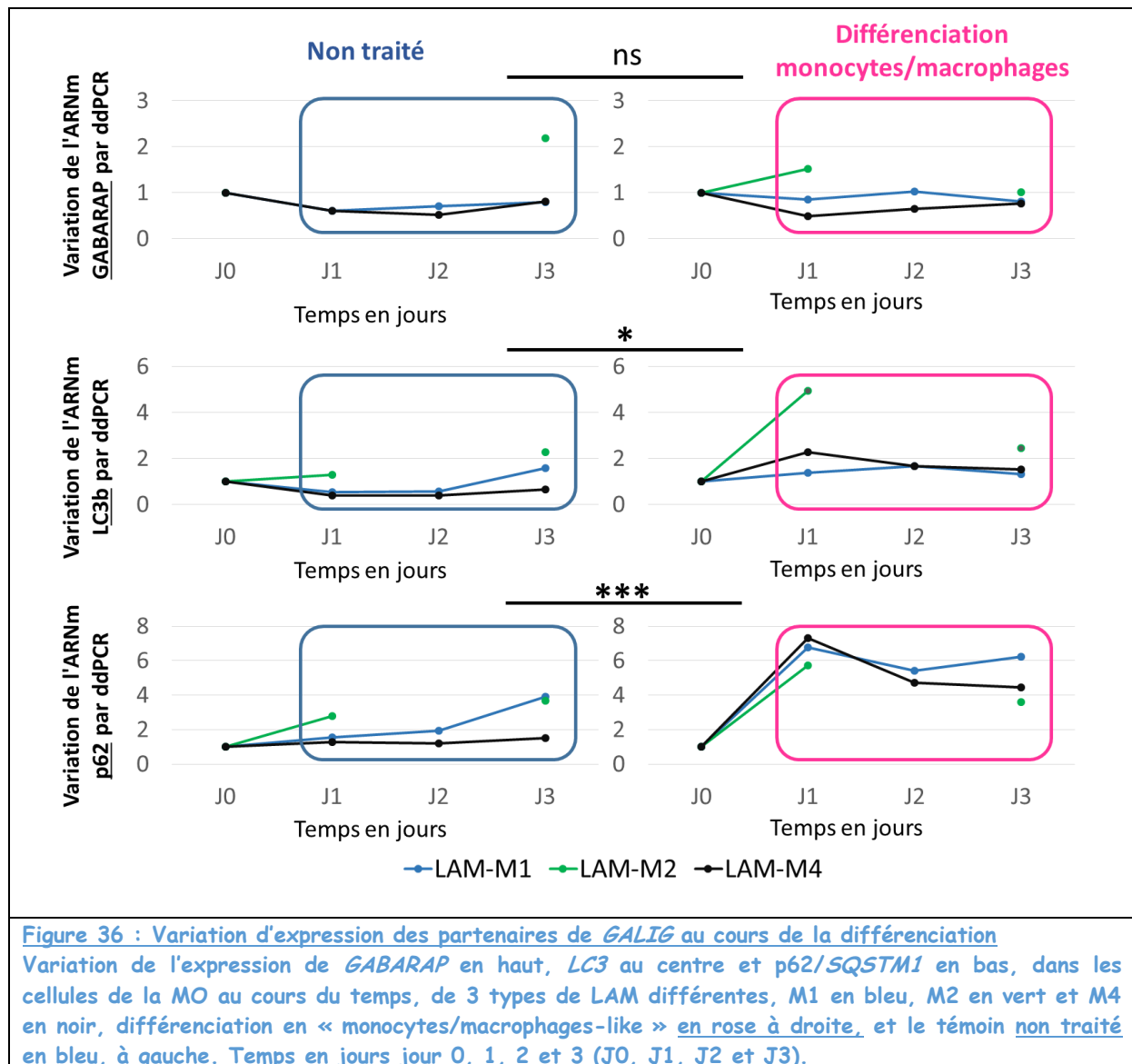
2) Variation d'expression des partenaires de GALIG :

On peut observer sur la Figure 36, les **variations d'expression** des gènes *GABARAP*, *LC3B* et *p62/SQSTM1*, dans les cellules issues des patients atteints d'une LAM de type M1, M2 et M4, **non traitées à gauche** ou différenciées en monocytes/macrophages (**PMA**) à droite.

On n'observe **aucune différence significative** d'expression du gène *GABARAP* pour les conditions non traitées et traitées au PMA entre les jours 1 à 3, quel que soit le type de LAM (Figure 36, haut).

En absence de traitement, on observe très peu de variation d'expression du gène *LC3B*. Lorsqu'on induit la différenciation en monocyte/macrophage, on peut observer une **augmentation de 5 fois pour la LAM-M2**, alors que les 2 autres types de LAM ne montrent que **peu de variation**. Mais lorsque l'on teste s'il existe des variations d'expression entre le temps initial et les jours 1 à 3, on montre **une différence significative** entre ces 2 conditions non traitées et traitées ($p = 0,014$). (Figure 36, centre).

On n'observe aucune variation d'expression de *p62/SQSTM1* en condition non traitée pour la LAM-M4, et une faible augmentation, de 4 fois, au troisième jour pour la LAM-M1 et M2. Par contre, lorsqu'on induit la différenciation en monocytes/macrophages, tous les types de LAM suivent le même profil d'expression, avec une **augmentation d'environ 6 fois** dès le premier jour de différenciation (suivie d'une légère diminution). De plus, on observe également une différence significative entre ces 2 conditions de traitement entre le jour initial et les jours 1 à 3 ($p = 0,0006$) (Figure 36, bas).



Ces expériences préliminaires, réalisées sur un faible échantillonnage, montrent qu'au cours de la différenciation en monocytes/macrophages on observe une augmentation du gène *p62/SQSTM1* de la même façon pour les 3 types de LAM, une légère augmentation pour le gène *LC3B*, et aucune variation pour le gène *GABARAP*. Ceci reste à confirmer sur une cohorte plus importante de stimulation.

IV. Conclusion :

Nous avons pu observer pour les LAM de type MO, M1, M2, M3 et M4 que l'expression de *GALIG* est diminuée dans les cellules de la MO et du sang des patients atteints de LAM. Dans notre panel d'étude aucune différence d'expression des gènes impliqués dans l'autophagie n'a été observée pour ces patients dans la MO.

Nous avons pu montrer également qu'après le traitement de chimiothérapie, dans le sang, le niveau d'expression de *GALIG*, *GABARAP* et *p62/SQSTM1* « retourne à la norme ».

Pour les LAM de type M5, nous ne pouvons malheureusement pas conclure sur l'expression des gènes étudiés car le niveau d'expression des gènes testés est très hétérogène pour ces patients.

Les études préliminaires de réinduction de la différenciation en monocytes/macrophages nous ont permis de montrer que, comme pour les lignées cellulaires, l'expression du gène *GALIG* augmente, et que cette augmentation semble également être fonction de l'état de différenciation initial de la cellule induite. De plus, celle des gènes *p62/SQSTM1* et *LC3B* paraît augmenter également au cours de ces différenciations, ce qui n'est pas le cas pour le gène *GABARAP*.

Dérégulation d'apoptose et de l'autophagie : cas de l'infection au Virus de l'Immunodéficience Humaine (VIH) :

I. Introduction

Le VIH afin d'échapper au système immunitaire et d'effectuer son cycle viral, inhibe l'autophagie (Borel, Espert, et Biard-Piechaczyk 2012; Campbell *et al.* 2015; Dinkins, Pilli, et Kehrl 2015).

Dans la mesure où la **macro-autophagie est inhibée par le virus**, qu'en est-il de l'expression de ces gènes lorsqu'aucune charge virale n'est détectable ? Pour tenter de répondre à cette question, nous nous sommes intéressés **au niveau d'expression du gène *GALIG* et de ses différents partenaires** dans le cas de l'infection par le VIH. Le troisième et dernier objectif de ma thèse a été de les **quantifier** chez des **patients atteints du VIH, traités depuis au moins 4 ans et sans aucune charge virale détectable**.

II. Article :

Article Soumis

GALIG and *ATG* genes are dysregulated in PBMC of efficiently treated HIV-infected patients

Amandine SERRANO¹, Saïd EL HADDAD¹, Frédéric MOAL², Thierry PRAZUCK³, Eric Legac⁴, Chloé ROBIN¹, Fabienne BRULE¹, Stéphane CHARPENTIER¹, Thierry NORMAND¹, Alain LEGRAND¹, Laurent HOCQUELOUX², Lucile MOLLET¹

¹ CBM - Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, affiliated with the Université d'Orléans - Pôle Universitaire Centre Val de Loire, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France.

² LIFO - Laboratoire d'Informatique Fondamentale d'Orléans, Université d'Orléans, Orléans, France.

³ Service des Maladies Infectieuses et Tropicales, Centre Hospitalier Régional d'Orléans-La Source CHRO, Orléans, France.

⁴ Unité d'Hématologie, Centre Hospitalier Régional d'Orléans-La Source CHRO, Orléans, France.

Corresponding author and reprint request:

Lucile Mollet

e-mail: lucile.mollet@cnrs-orleans.fr

Address: Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301,

Rue Charles Sadron

CS 80054

45071 Orléans Cedex 2

Tel (33) 2 38 25 55 92 - Fax (33) 2 38 63 15 17

Source of support:

This work was supported by grants from the Conseil Départemental du Loiret (CD45).

Short title to be used as a 'running head': Autophagy alteration under antiretrovirals

Abstract and keywords

Objective: To investigate impaired basal autophagy function in HIV infected patients effectively treated with combined antiretroviral therapy (cART) by comparing the expression levels of the pro-apoptotic *GALIG* and anti-apoptotic *MCL1* genes with those of the autophagy genes *BECN1*, *MAP1LC3B*, *ATG9a*, *P62/SQSTM1*, *GABARAP*, *GABARAPL1* and *GABARAPL2*.

Design: Monocentric pilot study conducted on PBMC of 40 uninfected donors and 27 HIV positive patients effectively treated by cART for at least 4 years.

Methods: Expression levels of the various genes were quantified by RT-qPCR and RT- droplet digital PCR, and compared using the standard statistical methods Mann-Whitney U test and area under the ROC curve (AUC), and machine learning algorithms.

Results: A concomitant overexpression of *GALIG* and *MCL1* is detected in PBMC of effectively cART-treated patients. Overexpression of *MAP1LC3B* and *GABARAPL1* is also measured. However, *BECN1* is under-expressed.

GABARAPL1 mRNA shows an optimal ROC AUC cut-off value of 0.997. *GALIG* mRNA has a ROC AUC value of 0.910. Finally, accurate classification (94.5%) of our PBMC samples as HIV negative donors or HIV positive cART-treated is obtained in 3 separate machine-learning algorithms with *GABARAPL1* and *ATG9a* as input variables.

Conclusions: With under expression of *BECN1* and *ATG9a*, both key actors in the formation of mammalian autophagosome, the basal autophagy mechanism in PBMC of cART-treated HIV positive patients appears to be severely impaired - even though the mRNA level of some ATG8 family members increases. Such important autophagy dysfunction could lead to premature aging and chronic inflammation.

Key Words

GALIG, *ATG*, Apoptosis, Autophagy, Antiretroviral therapy.

Introduction

The mRNA of the atypical *GALIG* gene – as it is embedded in another gene termed galectin-3 gene [1] - contains two distinct and overlapping open reading frames that translate into Mitogaligin and Cytogaligin [2]. *GALIG* is a novel cell death gene [3,4] whose role in initiating apoptosis has been shown to be counteracted by overexpression of *BCL-X_L* and *MCL1*, two anti-apoptotic members of the BCL-2 family, while expression of *BCL2* has no effect [3,5]. During spontaneous neutrophil apoptosis, a substantial increase in *GALIG* gene expression can also be observed, underscoring an action opposite to that of *MCL1* [5]. However, we recently found that early transcripts of *GALIG* are present concomitantly with *MCL1* overexpression in myeloid differentiation models, indicating that the apoptotic inducer *GALIG* can also be an active player in myeloid lineage differentiation (A. Serrano, to be published).

To date, the mechanism of *GALIG*'s action is not fully understood. Previously, our team has shown that Mitogaligin interacts with Cardiolipin, the signature phospholipid of mitochondrial membranes, causing membrane destabilization, aggregation, and content leakage [6]. More recently, we pointed out *via* protein-fragment complementation assays [7] that *GALIG*'s second protein, Cytogaligin, can interact with LC3B/MAP1LC3B (Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3B), p62/SQSTM1 (Sequestosome-1) and GABARAP (GABA_A-receptor-associated protein), three proteins belonging to the macro-autophagy pathway (A. Legrand, personal communication).

Macro-autophagy, hereafter referred to as autophagy, is a key regulated process occurring in cells allowing destruction and recycling of cellular components. It results in the sequestration of cytosol portions into specific vesicles, called autophagosomes, that are delivered into lysosomes for degradation and recycling [8]. Linked to inflammatory responses [9] and programmed cell death pathways [10], autophagy also plays a major role in immune responses against pathogens [11]. During an ongoing HIV infection, CD4 T lymphocytes, whether infected or not, are largely depleted, notably by apoptosis [12] and autophagy [13,14]. To avoid its destruction, HIV inhibits autophagy [15] *via* several mechanisms [16–18]. Autophagy, whether at basal level or stress-induced, involves a set of core autophagy-related (ATG) proteins [8]. Among them are ATG6/Beclin-1 encoded by *BECN1*, which is essential to autophagosome initiation and the ATG8 family with LC3B, GABARAP, GABARAPL1 and GABARAPL2, encoded by *MAP1LC3B*, *GABARAP*, *GABARAPL1* and *GABARAPL2* (GABARAP like protein 1 and 2), respectively, which is crucial for autophagosome elongation and maturation. Also important are the ATG9 proteins that are responsible for phagophore expansion by bringing part of membranes to the site of autophagosome formation. In addition, autophagy requires the participation of non-ATG proteins such as p62, an adapter that can drive selected substrates to the autophagosomes [19].

Little is known about autophagy in cART (combined antiretroviral therapy)-treated patients. To date, a unique study shows a significant decrease of autophagy in CD4 T cells of such individuals when compared to HIV-negative donors [20]. Here, we investigate if this impaired autophagy in cART-treated HIV⁺ patients could be the consequence of altered *ATG* genes transcription and, since Cytochalasin interacts with at least 3 ATG proteins – LC3b, p62 and GABARAP – we also question *GALIG* expression in the same patients. Standard statistical methods were applied as well as classification machine learning algorithms. Indeed algorithms have been used to differentiate between two groups of individuals and thus can serve as an auxiliary tool for diagnosis, patient management and identification of specific biomarker patterns. For instance, they helped to classify lung cancer [21] and thyroid lesion [22], and identify which genes, expressed during diagnosis of patients with urothelial carcinoma, constituted the molecular signature predicting recurrence risk [23].

Results

Pro-apoptotic *GALIG* and anti-apoptotic *MCL1* mRNA are overexpressed in PBMC of HIV-infected patients on cART

Twenty-seven HIV-infected patients, under suppressive cART for at least 4 years, were enrolled. Their main clinical characteristics are summarized in Table 1. Patients have normal CD4 T cell count [median (interquartile range IQR): 702 cell/ μ l (560-875)] and standard CD4/CD8 ratio [median (IQR): 1.1 (0.73-1.49)]. They were diagnosed with HIV infection with a median of 14.5 years ago (IQR: 9-19) and have received cART for a median of 11 years (IQR: 8-18). Four of them were on bi-therapy, 22 on tri-therapy and 1 on tetra-therapy. All patients showed undetectable plasma viral loads for at least 4 years.

To measure *GALIG* expression in uninfected donors and HIV-positive patients, classical quantitative RT-PCR as well as RT-Droplet Digital PCR (ddPCR) were performed. As indicated in Figures 1A and 1B, regardless of which method is carried out, *GALIG* transcripts in cART-treated HIV-positive PBMC are present in significantly higher amounts than in HIV-negative donors ($p < 0.000066$ and $p < 0.00001$, respectively). *GALIG* expression measured by qRT-PCR scales positively with *GALIG* expression *via* RT-ddPCR ($p < 0.0068$, $r = 0.428$) (data not shown). These results suggest that, even after at least 4 years of suppressive cART, the *GALIG* expression rate stays elevated and does not come down to the uninfected donor level.

As *GALIG* is embedded within the *LGALS3* gene, we wondered if *GALIG* and *LGALS3* transcription efficiencies are correlated. Figure 1C shows that the *LGALS3* mRNA level is similar in cART-treated HIV-positive patients and in HIV-negative controls. These data confirmed that *GALIG* and *LGALS3* are 2 independent genes with 2 self-regulated promoters [2].

Along with the activation of the pro-apoptotic *GALIG* gene, there must be some mechanism preventing cell death. Concurrently with *GALIG* mRNA analyses, we also monitored the expression of

MCL1 (Fig. 1D), an important inhibitor of *GALIG*-mediated cell death [5]. The increase in *GALIG* transcripts occurs in conjunction with a significant rise of *MCL1* mRNA ($p < 0.0096$).

In brief, PBMC of HIV-infected patients demonstrate a concomitant increase of both the pro-apoptotic *GALIG* and the anti-apoptotic *MCL1* gene expressions when compared to PBMC from uninfected donors.

Dysregulation of autophagic gene expression in HIV-positive treated patients

With the overexpression of *GALIG* in cART-treated patients on one hand, and the interaction of Cyto galigin, translated from *GALIG* mRNA, with three proteins belonging to the autophagy pathway (LC3b, p62 and GABARAP) on the other, we then inquired whether the expression of 7 main autophagy genes were disrupted in PBMC of HIV-infected patients under suppressive cART. All mRNA levels were quantified by ddPCR (Table 2). The level of *BECN1* mRNA, driving production of Beclin-1, involved in autophagosomes initiation, is significantly under-expressed in HIV-positive patients ($p < 0.0058$). Two members of the ATG8 family required for autophagosome elongation and maturation are also dysregulated: *MAP1LC3B* and *GABARAPL1* transcripts are present in significantly greater amounts in HIV-positive patients than in uninfected donors with $p < 0.00011$ and $p < 0.00001$, respectively (Table 2). No differences are observed for *ATG9*, *p62/SQSTM1*, *GABARAP* and *GABARAPL2* between patients and uninfected donors.

Hence at least 3 main genes, *BECN1*, *MAP1LC3B* and *GABARAPL1*, involved in basal and stress-induced autophagy, are disrupted in HIV-infected patients under suppressive antiretrovirals.

GABARAPL1 and GALIG mRNA levels individually discriminate cART-treated HIV-infected patients from uninfected donors

As classification learning algorithms allow to segregate samples into distinct populations, we applied them to make multistep predictions on all measured gene expression rate, in order to determine if some pattern of gene expression could give the best molecular signature. Three separate engines, Support Vector Machine with linear kernel (SVM), Logistic Regression (LR) and Random Forest (RF), were used to evaluate expression levels of 8 genes in 27 HIV-positive patients *versus* 40 healthy donors. Accuracies obtained after five-fold cross-validation method with feature normalization are given in Table 3. Obtained performance give comparable results whichever algorithm was used, with SVM showing a slightly higher accuracy.

When analysing gene expression levels one by one (Table 3, line “one gene tested”), we show that *GABARAPL1* expression can classify a sample as HIV-negative donor or HIV-positive patient without detectable viral load, with 91% of certainty. *GALIG* expression can segregate these two groups as well, although less efficiently (81%). To confirm, and to determine the optimal cut-off for gene expression level, we built ROC curves [26]. The area under the ROC curve (AUC) measures

discrimination, which is the ability of expression level to correctly classify those with and without HIV infection. Amongst all the measured mRNA rates, sensitivity and specificity are optimal with *GABARAPL1* (Fig. 2A). The AUC is 0.977, therefore close to 1, which represents the perfect test. Using 524 copies/ng of total RNA as a threshold gives the highest discriminant ability (sensitivity: 0.963, specificity 0.900, coefficient c: 0,932). As already observed for machine learning algorithms (Table 3, line “one gene tested”), *GALIG* expression level is a good separator as well, although slightly less potent (AUC = 0.910, and cut-point of 97.6 copies/ng of total RNA gives sensitivity: 0.852, specificity: 0.875, coefficient c: 0.863) (data not shown).

***GABARAPL1* and *ATG9a* transcript levels are the molecular signature of cART-treated HIV-infected patients**

Even though the predictive performance for *GABARAPL1* mRNA rate is high in the one by one gene tests, a second round of machine learning analyses were run to check if any linear model with more than one gene expression level could be more efficient. When *GABARAPL1* and *ATG9a* expression levels are combined, the predictive performance climbs to 94.5% (Table 3, line “*GABARAPL1*+another gene”). At first sight the selection of *ATG9a* is unexpected: when *ATG9a* expression levels is tested by classical Mann Whitney U test, there is no significant difference between the HIV-positive patients and HIV-negative donors (Table 2). However, when analysing effective distribution (data not shown), we noticed that all individuals who have a *GABARAPL1* rate less than 300 copies/ng of total RNA are uninfected and all individuals who have *GABARAPL1* rate greater than 1000 copies/ng of total RNA are HIV-positive individuals. Hence, there is a mix of infected and uninfected samples for the range 300-1000 *GABARAPL1* mRNA copies/ng of total RNA. However after the best gene choice, here *GABARAPL1* mRNA rate, to determine which the best second gene to add is, machine learning algorithms focus on unseparated individuals, here individuals whose *GABARAPL1* mRNA rate is between 300 and 1000 copies/ng. They don't consider individuals who have already been separated with *GABARAPL1* mRNA alone into account (*GABARAPL1* rate < 300 and > 1000 copies/ng). Interestingly for individuals who have a *GABARAPL1* rate in the range 300-1000 copies/ng, *ATG9a* transcripts in HIV-positive cART-treated patients are present in significantly lower amounts than uninfected donors with $p < 0.0027$ (Fig. 2C).

The three gene analyses presented Table 3, line “*GABARAPL1*+*ATG9a*+another gene” show no mean accuracy and confidence interval increase.

In conclusion, the prediction power of the three machine learning algorithms we ran is the highest, 94.5%, when using the two variables, *GABARAPL1* and *ATG9a* expression levels. This suggests that the basal level of autophagy in efficiently treated HIV-positive patients is disrupted, and probably inhibited.

Discussion (including a conclusion)

As of today, there is only a single study that looked at autophagy in cART-treated HIV-positive patients and it reported a significant decrease of autophagy in CD4 T cells [20]. Due to the newly discovered interaction of Cytochalasin with several main autophagy proteins (A. Legrand, personal communication), we first investigated *GALIG* mRNA rate in the PBMC of cART-treated HIV-positive patients, then interrogated the expression level of 7 main autophagy genes and applied classical statistical and machine learning algorithm analyses to search for any differences between HIV-positive and HIV-negative PBMC.

Although HIV-infected and efficiently treated patients have normal CD4 T cell count, standard CD4/CD8 ratio and no detectable plasma viral load for at least 4 years, their PBMC demonstrate a concomitant increase in the expression of both the pro-apoptotic *GALIG* gene and the anti-apoptotic *MCL-1*. This *MCL1* overexpression could explain why PBMC of cART-treated HIV+ patients show no evidence of cell death despite their high level of *GALIG* transcripts. In such conditions, we have already shown that the high *GALIG* transcription level can play a role in cell differentiation and therefore appears to have physiological roles other than activation of apoptosis (A. Serrano, to be published). This data supports the fact that when HIV-infected patients are efficiently treated, apoptotic features are reduced.

Our non-parametric statistical tests show that the expression rate of *BECN1*, *MAP1LC3B* and *GABARAPL1* are disrupted in HIV-positive patients without plasma viral load. Even if one could expect that the increased level of *MAP1LC3B* and *GABARAPL1* mRNA will lead to an abundance of autophagosome and increased basal autophagy, the under-expression of *BECN1* mRNA should result in a low level of autophagosome initiation and consequently an inhibition of basal autophagy. DNA methylation and histone post-translational modifications affect the level of chromatin compaction, and therefore control gene expression via the regulation of promoter accessibility to transcriptional factors [28]. It will be interesting to check if modulations of *GALIG* and *ATG* gene expressions in cART-treated patients is associated with such epigenetic modifications. Moreover in breast cancer, a high level of *GABARAPL1* expression inhibits growth rate [29]. Despite efficient cART, HIV infection is associated with accelerating aging and these two observations could be linked.

The ROC curve is a good way to visualise the performance of a classifier, here gene expression level. The accuracy of this test depends on how well mRNA numbers accurately separate the population being tested into those with and without HIV infection and is measured by the AUC. AUC is optimal for *GABARAPL1* mRNA (0.977) and high for *GALIG* mRNA (0.910). When analysing genes one by one, the machine learning approach enables us to rank genes by importance to classification. Interestingly, as already observed with AUC analyses, *GABARAPL1* expression level can classify a sample as HIV-positive or HIV-negative with the best accuracy (91%), followed by *GALIG* mRNA with

81% rate. Interestingly *GABARAPL1* expression scales positively with *GALIG* expression in the HIV-negative group ($p < 0.00665$, $r = 0.905$) while there is no correlation in the HIV-positive patient group (data not shown).

When analysed *via* machine learning algorithms, transcriptomic data can provide specific activation features of molecular pathways describing formation and progression of the disease [30]. Here algorithms were used to build a two-gene molecular signature, namely *GABARAPL1* and *ATG9a* mRNA rates, that could classified patients with or without HIV-infection with 94 % overall accuracy. Thus even though *ATG9a* mRNA rate alone is not statistically different between the whole population of HIV-positive and HIV-negative samples, we have shown that the expression levels of *GABARAPL1* and *ATG9a* are surrogate markers to segregate PBMC according to HIV status. Therefore machine learning algorithms trained via gene expression levels identify specific autophagy alteration of *ATG9a* expression in cART-treated HIV-positive patients that were not detected using classical statistical tests. Focusing on these markers, functional tests, both on constitutive and induced autophagy, will be the next step. In addition, autophagy has important effects on inflammation regulation via modulation of inflammasome activation and IL-1 β release [9]. As prolonged efficient treatments lead to new HIV-associated complications, resulting in chronic inflammatory status [31], autophagy dysregulation could play a role in the chronic inflammation observed in cART-treated HIV-infected patients.

The present study shows gene expression differences between patients and uninfected donor cohorts and consequently autophagy dysfunctions can be suspected in PBMC of cART-treated HIV-positive patients. As *BECN1* whose protein is involved in autophagosome initiation, and *ATG9a*, are downregulated, basal autophagy in successfully treated patients should be less effective. This could explain the significant decrease of autophagy in CD4 T cells in cART-treated patients when compared to HIV-negative donors already described [20]. Furthermore basal autophagy allows selective engulfment of damaged mitochondria [19]. The inhibition of such phenomenon could be linked to accelerated ageing of the immune system evidenced in long term cART-treated HIV-infected patients. Like all pilot studies, this study has some limitations. It will be ideal to validate these findings in a larger cohort. In the future we will sort PBMC subsets to determine which types of blood cells display this dysregulated *GALIG* and *ATG* alteration pattern. As thymidine reverse transcriptase inhibitors inhibit autophagy in hepatocytes [32], their impact on PBMC *in vitro* will also be monitored.

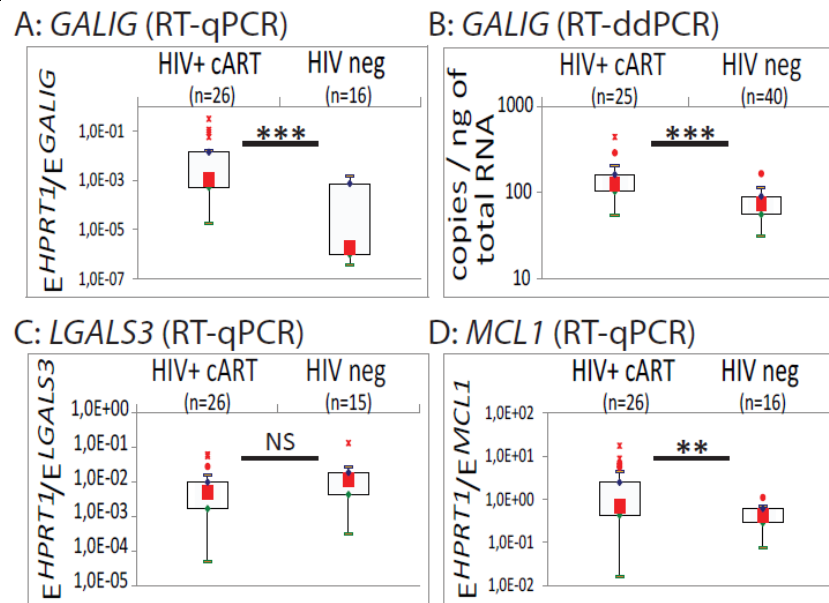


Figure 1: *GALIG* mRNA is highly expressed in PBMC of treated HIV-infected patients.

PBMC of HIV-positive patients who had been efficiently treated for at least 4 years and from HIV-negative controls were purified and total mRNAs were extracted. *GALIG* mRNA expression levels, normalized to the amount of *HPRT1* transcripts, were determined by real-time qRT-PCR [24] [A: “*GALIG* (qRT-PCR)”] and *GALIG* mRNA copy number per ng of total RNA were quantified by droplet digital PCR [25] [B: “*GALIG* (RT-ddPCR)”]. *LGALS3* and *MCL1* mRNA expression levels, normalized to the amount of *HPRT1* transcripts, were determined by real-time qRT-PCR [24] [respectively C: “*LGALS3* (qRT-PCR)”] and D: “*MCL1* (qRT-PCR)”]. Mann-Whitney U statistical results are shown as boxes and whisker plots. The rectangles show the median value, the boxes the 25th (Q1) and 75th (Q3) percentiles, the bars the maximum and minimum non atypical values, respectively, the crosses symbolize extreme values and the dots, outliers. **: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$; NS: not statistically different.

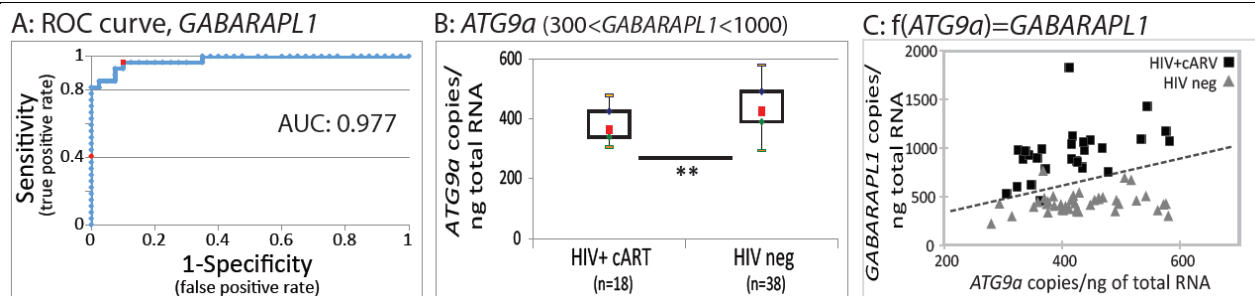


Figure 2: The expression of *GABARAPL1* and *ATG9a* is a potent molecular signature of c-ART-treated HIV-infected PBMC

PBMC of HIV-positive patients who had been efficiently treated for at least 4 years and from HIV-negative controls were purified. Total mRNAs were extracted and *GABARAPL1* and *ATG9a* mRNA copy number per ng of total RNA were quantified by droplet digital PCR [25]. (A) Receiver operating characteristic (ROC) curve for *GABARAPL1* mRNA copy numbers/ng of total RNA, on HIV-positive and HIV-negative PBMC data. The area under curve (AUC) is specified.

(B) The number of *ATG9a* mRNA copies/ng of total RNA for HIV-positive and HIV-negative PBMC whose *GABARAPL1* rate is in the range 300 to 1000 copies/ng of total RNA is statistically analysed with Mann-Whitney U statistical test. Results are shown as boxes and whisker plots. The rectangles show the median value, the boxes the 25th (Q1) and 75th (Q3) percentiles. **: $p < 0.01$

(C) Scatter plot of *ATG9a* mRNA copies/ng of total RNA versus *GABARAPL1* mRNA copies/ng of total RNA. Black squares stands for cART-treated HIV-positive patient dataset and grey triangles for HIV-negative donor dataset. The dotted line symbolises the best separator.

Table 1: Main clinical characteristics of the 27 HIV-infected patients included in the cohort

	Age (y ¹)	Time since HIV diagnosis (y)	Time on cART ² (y)	Zenith HIV RNA (copies/ ml plasma)	Nadir, CD4 T (cell/μl)	CD4 Tcell count (cell/μl)	Ratio CD4/CD8	Current cART regimen ³
median	55	14.5	11	70 937	292.5	702	1.11	1NN+1IPb=1
Q25⁴	46	9	8	14 150	122	560	0.73	1NN+1II=1
Q75⁵	63.5	19	18	172 000	451.2	874.5	1.49	2N=2
								2N+1II=4
								2N+1NN=13
								2N+1IP=2
								2N+1IPb=3
								2N+1IP+1II=1

1: y: year(s)

2: cART: combined antiretroviral therapy

3: N: Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, NN: Non Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitor, II: Integrase Inhibitor, IP: Protease Inhibitor IPb: boosted Protease Inhibitor

4: 25th percentiles

5: 75th percentiles

Table 2: HIV-positive PBMCs differ from uninfected controls in terms of ATG gene expression

Gene expression tested	Protein	mRNA copies/ng of total		HIV+cART vs HIV neg ⁵
		RNA ¹ :		
		Median		p value ⁶
		(25 th - 75 th percentiles)		
		HIV neg ² (n=40) ³	HIV+ cART ⁴ (n=27) ³	
<i>BECN1</i>	Beclin	681.5 (632-730)	616 (532-687)	↘ 0,0058
<i>MAP1LC3B</i>	LC3 (ATG8 family)	1367 (1146-1600)	1760 (1486-2010)	↗ 0,00011
<i>GABARAP</i>	GABARAP (ATG8 family)	6300 (5640-7080)	6940 (5570-7940)	0,17
<i>GABARAPL1</i>	GABARAPL1 (ATG8 family)	426 (371-484)	972 (830-1067)	↗ 0,00001
<i>GABARAPL2</i>	GABARAPL2 (ATG8 family)	1322 (1210-1462)	1158 (1010-1416)	0,074
<i>ATG9a</i>	ATG9a	423.5 (385-492)	416 (353-443)	0,29
<i>P62/SQSTM1</i>	P62 or sequestrosome	1560 (1358-1786)	1530 (1114-1680)	0,31

1: PBMC mRNA were quantified by RT-ddPCR and expressed in absolute value (number of mRNA copies per 1 ng of total RNA). Results are expressed as median and 25th and 75th percentiles.

2: HIV-negative individuals

3: n= number of tested individuals.

4: HIV-positive patients who had been efficiently treated (i.e. plasma HIV viral load below detectable level) with combined antiretroviral therapy (cART) for at least the last 4 years.

5: Mann Whitney U test comparison of efficiently treated HIV-positive patients (HIV+ cART) and uninfected individuals (HIV neg). ↗ : mRNA copies in HIV+ cART PBMC > mRNA copies in HIV neg PBMC. ↘: mRNA copies in HIV+ cART PBMC > rate in HIV neg PBMC.

6: p values. Significant values (p<0.05) are shown in bold.

Table 3: Predictive performance of 3 supervised machine learning algorithms

Classified data	Machine learning algorithms	<i>GALIG</i>	<i>ATG9a</i>	<i>LC3b</i>	<i>GABARAP</i>	<i>BECLIN</i>	<i>GABARAPL1</i>	<i>GABARAPL2</i>	<i>p62</i>
One gene tested	SVM ¹	0.809 ⁴ (+/-0.317)	0.598 (+/-0.043)	0.732 (+/-0.224)	0.555 (+/-0.201)	0.643 (+/-0.237)	0.911 (+/-0.139)	0.568 (+/-0.089)	0.598 (+/-0.043)
	LR ²	0.837 (+/-0.207)	0.612 (+/-0.046)	0.718 (+/-0.217)	0.643 (+/-0.093)	0.670 (+/-0.233)	0.911 (+/-0.139)	0.568 (+/-0.089)	0.599 (+/-0.126)
	RF ³	0.777 (+/-0.153)	0.536 (+/-0.198)	0.705 (+/-0.280)	0.646 (+/-0.326)	0.643 (+/-0.321)	0.910 (+/-0.111)	0.476 (+/-0.156)	0.505 (+/-0.141)
<i>GABARAPL1</i> + another gene	SVM	0.911 (+/-0.139)	0.955 (+/-0.074)	0.896 (+/-0.147)	0.911 (+/-0.139)	0.941 (+/-0.108)		0.896 (+/-0.147)	0.911 (+/-0.139)
	LR	0.925 (+/-0.091)	0.925 (+/-0.091)	0.911 (+/-0.139)	0.911 (+/-0.139)	0.941 (+/-0.108)	skip	0.925 (+/-0.091)	0.896 (+/-0.147)
	RF	0.910 (+/-0.111)	0.954 (+/-0.075)	0.925 (+/-0.091)	0.910 (+/-0.111)	0.924 (+/-0.169)		0.912 (+/-0.209)	0.940 (+/-0.061)
<i>GABARAPL1</i> + <i>ATG9a</i> + another gene	SVM	0.940 (+/-0.061)		0.925 (+/-0.091)	0.940 (+/-0.061)	0.955 (+/-0.074)		0.941 (+/-0.108)	0.925 (+/-0.133)
	LR	0.940 (+/-0.061)	skip	0.925 (+/-0.091)	0.925 (+/-0.091)	0.940 (+/-0.061)	skip	0.941 (+/-0.108)	0.955 (+/-0.074)
	RF	0.940 (+/-0.061)		0.924 (+/-0.097)	0.910 (+/-0.064)	0.940 (+/-0.115)		0.925 (+/-0.091)	0.924 (+/-0.097)

1: SVM: Support Vector Machine (linear kernel)

2: LR: Logistic Regression

3: RF: Random Forest

1, 2, 3: software *Scikit-learn* [30], a Python module integrating machine learning engines

4: Mean accuracy (+/- 95% confidence interval)

Methods (including ethical and statistical information)

Study Populations Blood samples and RNA isolation

A pilot cohort study was initiated to analyse the expression of 7 autophagy genes and *GALIG*, *MCL1* and *LGALS3* in 27 HIV-positive patients under suppressive cART for at least 4 years. Peripheral blood samples were obtained from patients at the Centre Hospitalier Régional d'Orléans-La Source (CHRO). The institutional ethics committee of the CHRO approved the study protocol (CE 2004.04 - 12/10/2014). All written informed consents followed the ethical guidelines that the 1964 Declaration of Helsinki had set.

Forty healthy HIV-negative volunteers (Etablissement Français du Sang Centre Atlantique) were included in the control cohort, after obtaining their written informed consent.

Peripheral blood mononuclear cell (PBMC) from HIV-positive and negative individuals were purified after Ficoll-hypaque separation (GE Healthcare Life Sciences). Total RNAs were extracted using a NucleoSpin RNA II kit according to the manufacturer's instructions (Macherey-Nagel). RNA concentration was measured using a spectrophotometer (NanodropOne™).

Real time qRT-PCR

cDNA synthesis was performed with 1 µg of RNA and the Maxima 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific) and qPCRs on 100 ng of cDNA with a Maxima™ SYBR® Green/Fluorescein qPCR kit, according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific). Specific primers for *GALIG* and *MCL1* quantitative PCR were the same as previously listed [5]. *LGALS3* transcripts were evaluated with the following primers GGCAGACACAATTTTCGCTC and AGGTTATAAGGCAATCAGTG. PCRs were performed on a MyiQ™ Single-Color Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad) as previously described [5]. All analyses were conducted with Bio-Rad IQ5 2.0 standard edition software. Levels of mRNA were calculated using the Pfaffl method [24] using the expression of *HPRT1* for sample normalization.

Droplet Digital PCR (ddPCR)

cDNA synthesis was performed with 500 ng of RNA and the Maxima 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific). The concentration was then adjusted to 5 ng/µl.

The ddPCR mix consisted of: 10 µl 2x QX200 ddPCR™ EvaGreen supermix (Bio-Rad), 100 nM of primers, 20 ng of the cDNA template into a final volume of 20 µl. *GALIG* primers were the same as for qRT-PCR [5]. The 7 ATG gene primers were as followed: ***BECN1***, CAAGATCCTGGACCGTGTCA and TGGCACTTTCTGTGGACATCA; ***MAP1LC3B***, AGCAGCATCCAACCAAAATC and TTGAGCTGTAAGCGCCTTCT; ***ATG9a***, CTCATCGGGGAGATCTTTGA and GACTTGAGCAGGCAAAAAGG; ***P62/SQSTM1***, AAGAACGTTGGGGAGAGTGTG and GACTCCAAGGCGATCTTCCTC; ***GABARAP***, ATGTCATTCCACCCACCACT and CAGCAGCTTCACAGACCGTA; ***GABARAPL1***, ATCCGGAAGAGAATCCACCT and TCTTCCTCATGATTGTCCTCA and ***GABARAPL2***, AAATATCCCGACAGGGTTCC and CAGGAAGATCGCCTTTTCAG. The total mix was placed into the 8

channel cartridge, 70 µl of droplet generating oil was added and droplets were formed in the QX200™ droplet generator (Bio-Rad). Droplets in oil suspensions were transferred to an Eppendorf® 96 well plate and placed into a conventional PCR machine. Cycling conditions were as follows (ramp rate of 2°C/second): 95°C for 5 min, followed by 40 cycles of 95°C for 30 sec, 55°C for 30 sec and 72°C for 30 sec and an terminal extension cycle 72°C for 5 min. After an ultimate stabilization step (4°C for 5 min, and 90°C for 5 min), the droplets were subsequently read automatically by the QX200™ droplet reader (Bio-Rad) and the data was analyzed with the QuantaSoft™ analysis software (Bio-Rad). The copy number of each cDNA was normalized with the amount of RNA used for reverse transcription [25].

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using StatEL software (www.adscience.eu). We used the non-parametric Mann-Whitney U test (criterion of significance: 5%). The non-parametric measure of statistical dependence between two variables was analysed by the Spearman's link analysis test, using the Spearman's rank correlation coefficient. The results were considered statistically significant at p-value <0.05.

The ability of a gene expression level to differentiate between those with or without HIV infection was evaluated using receiver operator characteristics (ROC) curve [26]. It graphically displays the sensitivity (true positive rate) and specificity (false positive rate) for various gene expression levels. It may identify the cut-points, i.e. the value of a given gene expression level where small gains in sensitivity result in large decreases in specificity (or vice versa). The area under the ROC curve (AUC) indicates the overall ability of the gene expression level to distinguish HIV-negative donors from cART-treated HIV-positive patients (AUC of 1 represents the perfect test and 0.5 a random test).

Learning algorithm system and cross-validation method

Data set encompassed the normalized expression level of 8 different genes (*GALIG*, *BECN1*, *MAP1LC3B*, *GABARAP*, *GABARAPL1*, *GABARAPL2*, *ATG9a*, *P62/SQSTM1*) in 27 HIV-positive cART-treated patients and 40 HIV-negative donors. We have used the software *Scikit-learn* [27], a Python module integrating state-of-the-art machine learning engines. Three classifiers were chosen to analyse the data set: Support Vector Machine with linear kernel (SVM), Logistic Regression (LR) and Random Forest (RF).

To examine the performance of the 3 prediction engines, the five-fold cross-validation method with feature normalization was used. The dataset is equally divided into 5 stratified parts. Four of them are used as training sets and the last one is used in turn, as the test set. Hence all samples in each part are selected as testing samples to test the classifier that is trained by samples in the other 4 parts. Each sample is tested once. To evaluate the performance of our prediction model, we calculated the predictive accuracy of each prediction. Using the confusion matrix, the accuracy is the

ratio of all correct predictions (true positive + true negative) to the total number of cases evaluated (true positive + true negative + false positive + false negative).

References

- 1 Raimond J, Rouleux F, Monsigny M, Legrand A. The second intron of the human galectin-3 gene has a strong promoter activity down-regulated by p53. *FEBS Lett* 1995; **363**:165–169.
- 2 Guittaut M, Charpentier S, Normand T, Dubois M, Raimond J, Legrand A. Identification of an internal gene to the human Galectin-3 gene with two different overlapping reading frames that do not encode Galectin-3. *J Biol Chem* 2001; **276**:2652–2657.
- 3 Duneau M, Boyer-Guittaut M, Gonzalez P, Charpentier S, Normand T, Dubois M, *et al.* Galig, a novel cell death gene that encodes a mitochondrial protein promoting cytochrome c release. *Exp Cell Res* 2005; **302**:194–205.
- 4 Gonzalez P, Robinet P, Charpentier S, Mollet L, Normand T, Dubois M, *et al.* Apoptotic activity of a nuclear form of mitogaligin, a cell death protein. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **378**:816–820.
- 5 Mollet L, Robinet P, Dubois M, Aurouet A, Normand T, Charpentier S, *et al.* Opposing Mcl-1, the GALIG proapoptotic gene is upregulated as neutrophils die and underexpressed in Acute Myeloid Leukemia cells. *Mol Immunol* 2013; **56**:123–128.
- 6 Gonzalez P, Duneau M, Charpentier S, Normand T, Mollet L, Dubois M, *et al.* Destabilization of membranes containing cardiolipin or its precursors by peptides derived from mitogaligin, a cell death protein. *Biochemistry* 2007; **46**:7374–7382.
- 7 Remy I, Michnick SW. A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase. *Nat Methods* 2006; **3**:977–979.
- 8 Lamb CA, Yoshimori T, Tooze SA. The autophagosome: origins unknown, biogenesis complex. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2013; **14**:759–774.
- 9 Netea-Maier RT, Plantinga TS, van de Veerdonk FL, Smit JW, Netea MG. Modulation of inflammation by autophagy: Consequences for human disease. *Autophagy* 2016; **12**:245–260.
- 10 Maiuri MC, Zalckvar E, Kimchi A, Kroemer G. Self-eating and self-killing: crosstalk between autophagy and apoptosis. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007; **8**:741–752.
- 11 Levine B, Deretic V. Unveiling the roles of autophagy in innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol* 2007; **7**:767–777.
- 12 Gougeon ML, Lecoœur H, Dulioust A, Enouf MG, Crouvoiser M, Goujard C, *et al.* Programmed cell death in peripheral lymphocytes from HIV-infected persons: increased susceptibility to apoptosis of CD4 and CD8 T cells correlates with lymphocyte activation and with disease progression. *J Immunol* 1996; **156**:3509–3520.
- 13 Espert L, Denizot M, Grimaldi M, Robert-Hebmann V, Gay B, Varbanov M, *et al.* [Autophagy and CD4 T lymphocyte destruction by HIV-1]. *Med Sci (Paris)* 2006; **22**:677–678.
- 14 Denizot M, Varbanov M, Espert L, Robert-Hebmann V, Sagnier S, Garcia EGE, *et al.* HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells. *Autophagy* 2008; **4**:998–1008.
- 15 Zhou D, Spector SA. Human immunodeficiency virus type-1 infection inhibits autophagy. *AIDS* 2008; **22**:695–699.
- 16 Sagnier S, Daussy CF, Borel S, Robert-Hebmann V, Faure M, Blanchet FP, *et al.* Autophagy restricts HIV-1 infection by selectively degrading Tat in CD4+ T lymphocytes. *J Virol* 2015; **89**:615–625.
- 17 Daussy CF, Beaumelle B, Espert L. Autophagy restricts HIV-1 infection. *Oncotarget* 2015; **6**:20752–20753.
- 18 Borel S, Robert-Hebmann V, Alfaisal J, Jain A, Faure M, Espert L, *et al.* HIV-1 viral infectivity factor interacts with microtubule-associated protein light chain 3 and inhibits autophagy. *AIDS* 2015; **29**:275–286.
- 19 Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy* 2011; **7**:279–296.
- 20 Gómez-Mora E, Robert-Hebmann V, García E, Massanella M, Clotet B, Cabrera C, *et al.* Brief Report: Impaired CD4 T-Cell Response to Autophagy in Treated HIV-1-Infected Individuals. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2017; **74**:201–205.
- 21 Podolsky MD, Barchuk AA, Kuznetsov VI, Gusarova NF, Gaidukov VS, Tarakanov SA. Evaluation of Machine Learning Algorithm Utilization for Lung Cancer Classification Based on Gene Expression Levels. *Asian Pac J Cancer Prev* 2016; **17**:835–838.
- 22 Wylie D, Beaudenon-Huibregtse S, Haynes BC, Giordano TJ, Labourier E. Molecular classification of thyroid lesions by combined testing for miRNA gene expression and somatic gene alterations. *J Pathol Clin Res* 2016; **2**:93–103.
- 23 Bartsch G, Mitra AP, Mitra SA, Almal AA, Steven KE, Skinner DG, *et al.* Use of Artificial Intelligence and Machine Learning Algorithms with Gene Expression Profiling to Predict Recurrent Nonmuscle Invasive Urothelial Carcinoma of the Bladder. *J Urol* 2016; **195**:493–498.
- 24 Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Res* 2001; **29**:e45.

- 25 Hindson BJ, Ness KD, Masquelier DA, Belgrader P, Heredia NJ, Makarewicz AJ, *et al.* High-Throughput Droplet Digital PCR System for Absolute Quantitation of DNA Copy Number. *Anal Chem* 2011; **83**:8604–8610.
- 26 Metz CE. Basic principles of ROC analysis. *Semin Nucl Med* 1978; **8**:283–298.
- 27 Pedregosa F, Varoquaux G, Gramfort A, Michel V, Thirion B, Grisel O, *et al.* Scikit-learn: Machine Learning in Python. *Journal of Machine Learning Research* 2011; **12**:2825–2830.
- 28 Guil S, Esteller M. DNA methylomes, histone codes and miRNAs: tying it all together. *Int J Biochem Cell Biol* 2009; **41**:87–95.
- 29 Berthier A, Seguin S, Sasco AJ, Bobin JY, De Laroche G, Datchary J, *et al.* High expression of gabarapl1 is associated with a better outcome for patients with lymph node-positive breast cancer. *Br J Cancer* 2010; **102**:1024–1031.
- 30 Shepelin D, Korzinkin M, Vanyushina A, Aliper A, Borisov N, Vasilov R, *et al.* Molecular pathway activation features linked with transition from normal skin to primary and metastatic melanomas in human. *Oncotarget* 2015; **7**:656–670.
- 31 Deeks SG, Lewin SR, Havlir DV. The End of AIDS: HIV Infection as a Chronic Disease. *Lancet* 2013; **382**:1525–1533.
- 32 Stankov MV, Panayotova-Dimitrova D, Leverkus M, Vondran FWR, Bauerfeind R, Binz A, *et al.* Autophagy inhibition due to thymidine analogues as novel mechanism leading to hepatocyte dysfunction and lipid accumulation: *AIDS* 2012; **26**:1995–2006.

Acknowledgements

We are thankful to uninfected volunteers and patients who have contributed to this study.

We thank Dr Valerie Berthelie from 4Publication for critically reading, proofreading this manuscript and providing English editorial assistance.

This work was supported by grants (“GALIGPATH”) from the Conseil Départemental du Loiret (CD45).

Contributions:

Assay development: AS. Performed the experiments: AS, SEH, FM, CR. Data analyses: AS, SHE, LM, FM. Contribution to experimental analyses: FB, SC, TN, AL. Discussion of results: all authors. Supervised the study: LM, LH. Coordination of patient inclusion: LH. Help with subject recruitment: TP. Management of biological patient analyses: EL. Daft writing: AS LM. Contribution to reviewing the manuscript and manuscript corrections: all authors.

III. Conclusion :

Ce **second article** nous a permis de montrer que le gène ***GALIG*** était **surexprimé** dans les **cellules mononucléées du sang** des patients atteints du VIH sous **traitement efficace et sans aucune charge virale détectable**.

De plus, nous avons également montré chez ces patients que **plusieurs gènes impliqués dans l'autophagie** étaient également **dérégulés**. Chez les patients VIH positifs, les gènes ***GABARAPL1*, *LC3B* et *MCL1*** sont **surexprimés**, comme le gène ***GALIG***, alors que le gène **Bécline-1/*BCN1*** est **sous-exprimé**. Par contre, aucune différence significative n'a été observée pour les gènes ***ATG9*, *GABARAP*, *GABARAPL2*, *p62/SQSTM1* et *LGALS3***.

L'analyse de ces expressions via des outils statistique et informatique, comme **l'apprentissage automatique** (learning algorithm system), nous a permis de mettre en évidence que l'expression du gène ***GABARAPL1*** est **déterminant** et permet de séparer les populations d'individus sains et malades. De plus, combiner les critères permet de se focaliser, non plus sur la population entière VIH positive versus VIH négative) mais sur le sous-groupe d'individus se trouvant dans la **zone de recouvrement d'expression de *GABARAPL1***. Dans ces conditions une plus grande efficacité de séparation est atteinte si, au niveau d'expression de ***GABARAPL1***, est **combinée l'expression d'*ATG9***. Le choix par apprentissage de ce second gène nous a dans un premier temps surpris. En effet, par un test de statistique classique, nous n'observons **aucune différence significative d'expression du gène *ATG9a*** entre les individus VIH positifs et les individus sains. Mais le système d'apprentissage automatique apprend, teste et réapprend, donc lorsqu'il utilise 2 gènes, il se **concentre, pour déterminer quel est le deuxième meilleur gène, sur les points non séparés** avec le premier gène. En l'occurrence, si on analyse la distribution des effectifs VIH+ vs VIH- par rapport au niveau d'expression du gène ***GABARAPL1***, on remarque que pour un taux **inférieur ou égal à 300 copies/ng** d'ARN totaux, on ne retrouve que des **individus non infectés**, et les taux **supérieurs à 1000 copies/ng** d'ARN totaux ne concernent que les patients VIH positifs. Lorsqu'on **évalue par un test statistique classique, l'éventuelle différence d'expression d'*ATG9a*** pour les individus ayant un taux de ***GABARAPL1* compris entre 300 et 1000 copies**, on observe bien dans ce cas l'apparition d'une **différence significative entre les patients**

infectés par le HIV et traités efficacement, et les donneurs non infectés. Le niveau d'expression de ces 2 gènes, *GABARAPL1* et *ATG9* permet une séparation optimale des individus VIH positifs et négatifs, et l'addition **d'autres critères** n'augmente plus le taux de séparation. Bien au contraire, l'ajout de gènes supplémentaires induit un phénomène de **sur-apprentissage** (overfitting) qui diminue le niveau d'efficacité du test.

Discussions

Et

Perspectives

Discussions-Perspectives

I. GALIG et différenciation myéloïde :

A. Blocage de la différenciation myéloïde : les LAM

La première classification de cellules issues de patients atteints de LAM, appelée Franco-Américano-Britannique (FAB), est basée sur **l'état de différenciation de la cellule leucémique, arrêtée à différents stades** (Löwenberg, Downing, et Burnett 1999). Cette classification a par la suite évolué en tenant compte d'autres paramètres, comme les **aberrations chromosomiques**. Dans notre étude nous sommes intéressés à la différenciation cellulaire, c'est pourquoi nous avons utilisé cette ancienne classification.

Il a été montré que le **gène GALIG** est **sous-exprimé** dans la **moelle osseuse** de patients **atteints de LAM-M2** (myéloblastes) par rapport à celle de **donneurs sains**, tandis que l'expression de **MCL1 ne varie pas** (Mollet *et al.* 2013). Pour rappel, la protéine Mcl-1 se trouve être exprimée au cours de la différenciation myéloïde et sa déplétion induit une mort des cellules en différenciation (Moulding *et al.* 2000) et leucémiques (Glaser *et al.* 2012).

☞ LAM de type M0 à M4 : Expression du gène GALIG

Dans l'article 1 (Fig-1), il a été mis en évidence que **GALIG** est **moins exprimé** dans les cellules leucémiques LAM-M2 (myéloblastes), **plus immatures**, par rapport aux cellules de LAM-M3 (promyélocytes), ce qui laisse sous-entendre que le **niveau d'expression de GALIG augmente avec la différenciation cellulaire**. Cette première analyse est confirmée par notre seconde étude, mettant en évidence une sous-expression de **GALIG** dans les cellules de la **moelle osseuse et du sang** de patients atteints de LAM de type **M0, M1, M2, M3 et M4 au diagnostic** par rapport à leur **retour post-cure de chimiothérapie**, soit après le traitement thérapeutique, lorsque la moelle osseuse retrouve sa fonction hématopoïétique (Figure 33, Figure 34).

Sachant l'implication de Mcl-1 dans les LAM, il serait intéressant de doser l'expression de ce gène au **diagnostic**, en **post-cure de chimiothérapie** et au cours de la **réinduction de la différenciation cellulaire**.

Si l'expression du gène *GALIG* augmente avec le **niveau de différenciation**, ceci laisse supposer que son expression devrait être plus forte dans les LAM M4 et plus faible dans les LAM M0 et M1. Malheureusement, le faible effectif de patients pour chaque type de LAM dans cette seconde étude ne nous permet pas **de tester cette hypothèse par analyse statistique**, mais les dosages, sur faible effectif, semblent le montrer (n = 12). Il serait donc important de le vérifier, lorsque l'échantillonnage le permettra.

En conclusion, le gène *GALIG* se trouve être dérégulé au diagnostic de la leucémie, et poursuivre cette étude permettrait de confirmer que l'expression de *GALIG* augmente avec le taux de différenciation cellulaire. De plus, une analyse protéique par western blot permettra de confirmer et de renforcer l'implication des Galigines dans cette pathologie.

☞ LAM de type M0 à M4 : Expression des gènes impliqués dans l'autophagie

Dans le panel d'étude, dans la moelle osseuse nous n'avons montré **aucune différence d'expression** des gènes impliqués dans l'autophagie (*GABARAP*, *GABARAPL1*, *LC3*, Bécline-1/*BECN1* et p62/*SQSTM1*) pour ces patients (Figure 33). Pourtant il a été décrit que l'**expression** de plusieurs de ces gènes (*GABARAPL1*, *L2* et *LC3*), ainsi que le **flux autophagique**, sont **diminués** dans les blastes de patients atteints de LAM ou dans des modèles murins (Watson *et al.* 2015).

Nos résultats sont donc en **contradiction avec ces données**. Ceci peut être dû à la **technique de dosage utilisée**. En effet, notre étude a été réalisée par **droplet digital PCR (ddPCR)**, qui permet une **quantification absolue** sans l'utilisation d'un **gène rapporteur**. Leur étude est effectuée par **PCR automatique**, et **normalisée** par l'expression du gène *GAPDH*. Or dans notre panel d'étude, nous avons également dosé l'expression de *GAPDH* et on observe une **différence significative** entre le **diagnostic** et **après le traitement** de chimiothérapie (p = 0,017, donnée non montrée).

Par ailleurs, dans cette étude de moelle osseuse, nous n'avons malheureusement pas pu comparer **les taux d'expression obtenus à ceux observés chez des contrôles sains**, comme pour l'article précédent (Mollet *et al.* 2013), mais uniquement **aux retours**

post-cure des patients. Il serait important de comparer ces taux au diagnostic à ceux d'une moelle osseuse saine.

Dans le panel d'études **du sang** de ces patients atteints de LAM-M0 à LAM-M4, nous avons montré plusieurs **différences d'expression**. Il s'agit du **gène *GALIG***, et de 5 gènes impliqués dans l'autophagie, à savoir ***LC3*, *GABARAP*, *GABARAPL1*, *Bécline-1/BECN1* et *p62/SQSTM1*** (Figure 34). Ces différences peuvent être dues en grande partie à l'**envahissement du sang par les blastes immatures** qui sont sortis de la moelle osseuse. Nous avons également pu montrer **qu'après le traitement de chimiothérapie**, dans le sang, le niveau d'expression de ***GALIG*, *GABARAP* et *p62/SQSTM1*** est similaire à celui évalué pour les donneurs sains. Nous observons ainsi pour ces gènes un retour à la « norme ».

Il serait important de **tester fonctionnellement l'autophagie**. Ceci pourrait être envisagé au **niveau protéique**, par marquage de LC3 en immunofluorescence et western blot révélé par un anticorps anti-LC3 (visualisation de LC3 et LC3-PE), dans les blastes. Les conséquences de l'activation par la torine ou la rapamycine permettraient **d'évaluer le flux autophagique** dans les LAM au diagnostic et en retour post-cure de chimiothérapie.

⌘ LAM de type M5 :

Pour les **LAM de type M5**, nous ne pouvons malheureusement pas conclure sur l'expression des gènes étudiés car celle-ci est **très hétérogène** (Tableau 7). L'augmentation de l'effectif nous permettra peut-être par la suite, de réaliser des sous-groupes en fonction du sous-type et donc du degré de différenciation de ces cellules, à savoir **LAM 5a, monoblastes indifférenciés** et **LAM 5b, blastés différenciés, monocytaires**.

⌘ LAM de type M6 et M7 :

Pour les **LAM de type M6**, nous ne pouvons également pas conclure, car nous avons reçu qu'un seul prélèvement au diagnostic (Tableau 8). Mais ces résultats semblent encourageants car le **taux de *GALIG* reste faible, 47 copies** (médiane groupe M0 à M4 : **40 copies**). Ce type de **LAM est assez rare, 3 à 5%** des cas de LAM, et augmenter l'effectif pourrait nous permettre de statuer quant au taux d'expression de

GALIG et des gènes impliqués dans l'autophagie dans cette situation pathologique. En effet, la différenciation normale de ce lignage implique des **processus autophagiques** très importants, pour **l'élimination du noyau et des mitochondries** (Honda *et al.* 2014; Mizushima et Levine 2010). Nous n'avons pas reçu de **LAM de type M7**, qui est également très rare, 3 à 12%. C'est pourquoi étudier **la différenciation de la lignée K562, semble important. En effet cette lignée peut être différenciée *in vitro* en érythrocytes**, par ajout de DMSO (voie de la LAM-M6) et en **plaquettes** par ajout d'acide butyrique (voie de la LAM-M7). Cette étude est actuellement en cours au laboratoire.

☞ Perspectives générales sur les LAM :

Comparer les taux d'expression des différents gènes étudiés en utilisant la **nouvelle classification de l'OMS**, basée sur les réarrangements génétiques les plus courants, qui permet de proposer un pronostic favorable, défavorable ou intermédiaire, pourrait également être envisagé (*WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues / ed. by Steven H. Swerdlow [et al.]; WHO. International Agency for Research on Cancer (IARC) 2008*). Cette classification donne des sous-groupes plus homogènes, et tient compte également du **caryotype** (types réarrangements, nombre de chromosomes), de la **leucocytose** (% de globules blancs dans le sang) et de plusieurs **caractéristiques moléculaires** (réarrangement et surexpression génique, notamment) (cf. p. 54).

Une évaluation qui tiendrait compte du fait que la **leucémie est *de novo* ou secondaire à une autre pathologie**, serait également intéressante. En effet, si la LAM n'est pas *de novo*, elle a plus de chance d'avoir dérivé (accumulation de mutations *etc...*) par rapport à la cellule normale initiale. Une étude d'expression de ces différents gènes sur des cellules de moelle osseuse saine, triées par type cellulaire pourrait également être intéressante.

Enfin, augmenter l'effectif permettra peut-être d'obtenir des données quant à l'expression de *GALIG* dans tout lignage myéloïde.

B. Induction et réinduction de la différenciation myéloïde :

Le gène ***GALIG*** a été initialement décrit comme induisant la mort cellulaire (Duneau *et al.* 2005). Mais lorsque l'on co-transfecte ***GALIG*** et un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2, comme ***MCL1*** ou ***Bcl-x_L***, les cellules survivent (Duneau *et al.* 2005; Mollet *et al.* 2013). Les produits des gènes ***GALIG*** et ***MCL1*** influent sur la balance mort/survie des polynucléaires neutrophiles (Mollet *et al.* 2013). Le polynucléaire neutrophile est une cellule myéloïde qui a une **durée de vie très courte *in vivo***, inférieure à un jour. Au cours de cette **apoptose spontanée**, nous avons montré que l'expression du gène ***GALIG*** augmente de 100 fois tandis que celle du gène ***MCL1*** quant à lui diminue, de 5 fois (Mollet *et al.* 2013).

Il a également été rapporté un **différentiel d'expression** du gène ***GALIG*** entre les cellules immatures de la moelle osseuse et les cellules matures du sang (Guittaut *et al.* 2001). D'autre part, il a été établi que les caspases impliquées dans l'apoptose jouent également un rôle dans la différenciation cellulaire (Berg *et al.* 2001; Sordet *et al.* 2002; Rébé *et al.* 2007; Droin *et al.* 2008). Ainsi, le gène pro-apoptotique ***GALIG***, comme les caspases, **pourrait jouer un rôle dans la différenciation cellulaire**.

1) Différenciation en macrophages :

⌘ Monocytes et lignées

Les cellules myéloïdes, qu'elles soient issues de lignées (HL-60, THP-1 et U937) ou du sang (monocytes) sont des cellules en suspension. La **différenciation en macrophages** induit, en premier lieu, chez tous les modèles étudiés, dès les premières 24 heures, d'importants changements morphologiques. En effet, ces cellules deviennent **adhérentes au support et plus granuleuses** (Figure 31).

L'expression du gène ***GALIG***, au cours de chacune de ces différenciations cellulaires en macrophages, **augmente**. De plus, cette augmentation se trouve être d'autant plus importante que la cellule induite est immature. En effet, dès le premier jour, elle augmente de plus de **100 fois** pour la lignée **HL-60, très immature** (article1-Fig-2D), de **10 fois** pour les lignées **THP-1 et U937, plus matures** (Figure 29), et de seulement **5 fois** pour les **monocytes issus de donneurs sains** (Figure 30). Ceci est en **accord avec l'hypothèse** que l'expression de *GALIG* augmente avec la maturité cellulaire. En effet, une augmentation plus forte de ***GALIG*** serait nécessaire à la

différenciation d'une cellule très immature, et elle serait moindre pour une cellule plus mature.

Par ailleurs, l'étude de son expression pendant les premiers temps de la différenciation de la lignée HL-60 a montré que son **expression augmente dès la 2^e heure de différenciation** : il est donc exprimé **précocement** (Figure 28). Cette hausse d'expression du gène *GALIG* s'accompagne cette fois-ci, à la différence de l'apoptose spontanée du polynucléaire neutrophile, **de l'augmentation de l'expression du gène anti-apoptotique *MCL1***. Elle est d'environ **10 fois** pour les lignées HL-60, THP-1 et U937 et est encore plus **précoce, puisque détectée 1 heure** après l'induction de la différenciation (Figure 28), soit **en amont de l'augmentation du gène *GALIG***. L'augmentation de l'expression de ce gène anti-apoptotique *MCL1* pourrait donc permettre à la **cellule de survivre au cours de la différenciation**, tandis que sa diminution permet aux polynucléaires neutrophiles de mourir. Il a été montré que la déplétion de Mcl-1 au cours de la différenciation de la lignée U937 **induit une mort rapide** (Moulding *et al.* 2000). De plus, la cellule en différenciation possède des caspases-9 activées, il faut donc qu'elle protège ses mitochondries pour permettre sa survie (article 1-Figure 2A). La mort cellulaire induite par *GALIG* implique également la mitochondrie (Duneau *et al.* 2005; Gonzalez *et al.* 2007), et la **protéine Mcl-1** permettrait alors elle une protection de la membrane mitochondriale (Thomas, Lam, et Edwards 2010).

A l'inverse, au cours de la **différenciation terminale du monocyte** en macrophage, on note une **diminution de l'ARNm *MCL1*** d'environ 5 fois, mais nous n'observons aucune caractéristique apoptotique au cours de cette différenciation. D'autres membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 peuvent contrecarrer la mort induite par *GALIG*, comme **Bcl-x_L** (Duneau *et al.* 2005). Il serait donc intéressant de quantifier **l'expression de Bcl-x_L** au cours de ce type de différenciation.

L'expression des gènes *GALIG* et *MCL1* augmente donc rapidement au cours de l'induction de la différenciation. Afin de pouvoir positionner ces augmentations dans le processus de différenciation, nous avons complété l'analyse d'expression de ces gènes par l'analyse de différents paramètres associés à la maturité cellulaire.

Pour la lignée HL-60, on note un ralentissement de la prolifération cellulaire et ce dès le premier jour de différenciation (article 1-Fig-3A). Cela peut être dû en partie au fait que ces cellules deviennent adhérentes (Sordet *et al.* 2002). Mais ce ralentissement se poursuit, et **conduit à un arrêt** de la prolifération : **seules 9% des cellules se divisent** encore après 4 jours. De plus, **2 jours seulement** après induction, ces cellules sont capables de phagocyter des bactéries (Figure 32). Nous montrons également, une **activation des caspases-3, -8 et -9**, comme décrit dans la littérature (article 1-Fig-2A,B) (Droin *et al.* 2008). **Après 3 jours** de différenciation, **46% de ces cellules** possèdent une **caspase-1 active** (article 1-Fig-3B), et sont donc capables de produire de l'interleukine-1 β (IL-1 β). IL-1 β étant **majoritairement sécrétée** dans l'organisme par le **macrophage mature**, l'**activation de la caspase-1** est donc également une donnée caractéristique de la maturité du macrophage après 3 jours de différenciation.

L'**augmentation d'expression** des gènes *GALIG* et *MCL1* au cours de la différenciation myéloïde semble donc être un **phénomène très précoce**, survenant en amont des différentes caractéristiques requises pour un macrophage mature, comme l'arrêt de prolifération, la capacité à phagocyter des bactéries et à produire de l'IL-1 β .

Pour les monocytes issus de donneurs sains et de lignées THP-1 et U937, Nous n'avons pas étudié l'arrêt de la prolifération cellulaire et l'activation des caspases au cours de ces différenciations. Les lignées **THP-1 et U937**, plus avancées dans la différenciation que la lignée HL-60, acquièrent la capacité à phagocyter **dès le premier jour** de différenciation, tandis que les **monocytes de donneurs sains**, plus matures que toutes les lignées étudiées, acquièrent cette capacité **après 2 jours** (Figure 32).

Cette différence peut être expliquée par le fait que les monocytes sont des cellules primaires, induites en **différenciation par ajout de M-CSF**, ce qui induit une différenciation plus physiologique que l'ajout de PMA, sur des lignées établies. L'induction de la différenciation des lignées **THP-1 et U937** conduit donc à des macrophages matures **dès le premier jour de la différenciation**, alors qu'il faut attendre **2 jours pour les monocytes issus de donneurs sains**.

Pour ces différenciations également, l'augmentation d'expression du gène *GALIG* semble donc être, au même titre que *MCL1*, un phénomène très précoce.

§ Cellules de patients atteints de LAM

Les études préliminaires de **réinduction de différenciation en monocytes/macrophages** de cellules issues de prélèvements de patients **atteints de LAM-M1, M2 et M4** nous ont permis de montrer que, comme pour les lignées cellulaires précédentes, **l'expression du gène *GALIG* augmente** (Figure 35). Cette augmentation est de **28 fois pour la LAM-M1** évaluée, de **9 fois pour la LAM-M2** et de **2 fois pour la LAM-M3**. Malgré ce faible échantillonnage, comme pour **les lignées cellulaires**, cette augmentation semble également être fonction de **l'état de différenciation initiale de la cellule induite**.

De plus, l'expression des gènes *p62/SQSTM1* et *LC3* **augmente** également au cours de ces différenciations, ce qui n'est pas le cas du gène *GABARAP*. Bien sûr cette étude a été réalisée sur un effectif de 3 patients, il faudra bien évidemment les confirmer. Mais il a été montré que *p62/SQSTM1* modulait la dégradation de la **protéine chimère** impliquée dans le réarrangement touchant les **LAM-M3** (Trocoli *et al.* 2011; Wang *et al.* 2011). Quel serait le rôle de ces augmentations dans les autres types de LAM ?

Le faible volume du prélèvement initial ne nous a pas permis de tester l'arrêt de la prolifération cellulaire de ces cellules tumorales, leur capacité à phagocyter des bactéries ou encore l'activation des caspases apoptotiques et inflammatoires.

Ces études de la réinduction de la différenciation sont donc **à compléter par un échantillonnage plus grand**. De plus, nous avons également **réalisé en parallèle de l'induction de la différenciation en monocyte/macrophage via le PMA**, d'autres inductions, *via* le DMSO, l'ATRA, l'acide butyrique ainsi que l'ajout d'**inducteurs de mort cellulaire** comme le VP16 (étoposide, inhibiteur de topoisomérase utilisé dans le traitement de cancer) et la **cytarabine** (analogue de la base azotée pyrimidine, utilisée en thérapie des LAM). Faute de temps, ces différents traitements n'ont pas été analysés, il serait donc intéressant de **quantifier l'expression de *GALIG* et des gènes**

impliqués dans l'autophagie suite à l'incubation avec ces différents inducteurs de différenciation ou de mort cellulaire.

Pour cette étude préliminaire de réinduction de différenciation de ces cellules leucémiques, nous nous sommes **majoritairement intéressés à l'expression génique**. L'expression du gène *GALIG* augmente au cours de la différenciation en macrophages, afin de renforcer cette augmentation, il faudrait bien sûr la compléter par une analyse des protéines issues du gène *GALIG*. De plus, les résultats tendent à montrer que **l'expression du gène *LC3* et *p62/SQSTM1* augmente également**, qu'en est-il des protéines même, et du flux autophagique ? **Des tests fonctionnels d'activation ou d'inhibition de l'autophagie**, ainsi que l'observation des autophagosomes par le marquage de LC3 permettraient de confirmer l'implication de ces gènes dans la réinduction de la différenciation des cellules de patients atteints de LAM. Evaluer l'autophagie **en condition basale**, et aux différents jours de la différenciation en macrophages pourrait également être intéressant.

2) Différenciation en polynucléaire neutrophile :

Au cours de la **différenciation** de la ligné HL-60 **en polynucléaire neutrophile**, on peut observer une **augmentation de la granulosité cellulaire** dès le premier jour de différenciation, **l'apparition de pseudopodes** et un allongement du noyau qui ressemble **au noyau polylobé** caractéristique du polynucléaire neutrophile, dès le deuxième jour de différenciation (données non montrées). De plus, l'expression du gène *GALIG* **augmente de 10 fois dès le premier jour** (article 1-Fig-2D). On observe aussi une augmentation de l'expression du gène **anti-apoptotique *MCL1* de 10 fois** (article 1-Fig-2C), comme pour la différenciation en monocytes/macrophages. L'augmentation de *MCL1* peut dans ce cas également, permettre la survie de la cellule en différenciation (Moulding *et al.* 2000). Par ailleurs, **la caspase-9 est la seule caspase apoptotique à être activée**, et ce dès le **deuxième jour** de différenciation (article 1-Fig-2A, B), suivi de la **caspase inflammatoire-1**, qui est **activée** dès le **troisième jour** de différenciation (article 1-Fig-3B). On note également un **ralentissement de la prolifération cellulaire** et ce après **4 jours** de différenciation (article 1-Fig-3A).

Au cours de la différenciation en **polynucléaires neutrophiles**, on montre donc également une **augmentation rapide et précoce** des gènes *GALIG* et *MCL1*, qui précède l'activation de la caspase-9, et les témoins de maturation terminale que sont l'activation de la caspase-1 et l'arrêt de la prolifération, qui est dans ce cas, relativement tardive.

Comme pour la différenciation en monocytes/macrophages, qu'en est-il des protéines traduites depuis le gène *GALIG*? Qu'en est-il de leurs localisations cellulaires, sont-elles accumulées au niveau des autophagosomes, aux niveaux des mitochondries ou dans le cytosol? Il a également été montré que la **différenciation via l'ATRA** des LAM-M3, ou de la lignée cellulaire NB4 établit à partir d'un prélèvement de LAM-M3 et la lignée HL-60 induit une augmentation de vésicules autophagiques et de Bécline-1 (Trocoli *et al.* 2011; Trocoli *et al.* 2014). Il serait donc intéressant d'étudier l'expression de *GALIG* dans cette lignée issue de LAM-M3 (donc avec réarrangement PML-RAR), et l'éventuelle relation au niveau protéique entre les protéines du gène *GALIG* et l'autophagie au cours des différents types de différenciations possibles avec ce type de cellule.

3) En résumé :

L'expression de l'ARNm de *GALIG* **augmente** au cours de la différenciation granulo-monocytaire. Nous l'avons montré *via* des lignées (HL-60, THP-1 et U937), des monocytes issus de donneurs sains, ainsi que pendant la **réinduction** de la différenciation depuis des cellules **issues de patients** atteints de LAM. Cette augmentation d'expression du gène *GALIG* pendant la différenciation est accompagnée par **l'augmentation d'expression du gène MCL1**. Ces variations d'expression de *GALIG* et *MCL1* se trouvent être **très précoces** par rapport à **l'acquisition de la maturité cellulaire** comme l'attestent différents paramètres, tels que l'activation des caspases, la phagocytose ou encore l'arrêt de la prolifération cellulaire.

Afin de **renforcer le rôle de GALIG** au cours de la différenciation en monocytes/macrophages et polynucléaires, il faudrait étudier l'expression des Galigines par western blot. Comment se passeraient ces différenciations en conditions de **sous-expression du gène GALIG ou MCL1**? Deux lignées exprimant stablement un ARN anti-sens ciblant les ARNm *GALIG* ou *MCL1*, disponibles au laboratoire, permettraient de répondre à cette question.

Une autre perspective serait de compléter l'étude de l'expression de ***GALIG*** au cours de la différenciation de la lignée K562, puisque cette lignée peut être différenciée *in vitro* en **plaquette ou érythrocyte**, soit vers le **lignage érythro-plaquettaire**. Ceci nous permettra de connaître l'expression de ***GALIG*** dans tout le lignage myéloïde, puisque nous l'avons déjà renseigné dans le **lignage granulo-monocytaire**. Nous n'avons pas quantifié l'expression des gènes impliqués dans l'autophagie et le système ubiquitine protéasome au cours de ces différenciations, ces interactions n'ayant pas encore été mises en évidence (cf. p. 43). Doser ces gènes permettrait de renforcer les analyses réalisées sur les cellules issues de prélèvements de patients atteints de LAM.

Il serait important de compléter les dosages d'expression de gènes par des études fonctionnelles, par exemples des marquages de LC3b en **activant ou inhibant l'autophagie** au cours de ces différenciations.

II. Expression du gène ***GALIG*** et des gènes impliqués dans l'autophagie : cas de l'infection au VIH :

1) Expression du gène ***GALIG***

L'infection par le VIH induit un très fort **déclin des LT CD4+** (Weiss 1993), puis l'introduction d'un traitement efficace permet l'interruption de la réplication virale et donc une **régénération des lymphocytes** (Autran *et al.* 1997). Or, dans la première partie de ce travail de thèse, nous avons montré que ***GALIG***, impliqué dans l'apoptose, intervient également dans la différenciation cellulaire.

Dans les cellules mononucléées du sang de patients infectés par le VIH, sous traitement depuis plusieurs années et ne possédant aucune charge virale plasmatique détectable, nous avons montré une **surexpression du gène *GALIG***, par rapport à des cellules de donneurs non infectés (article 2-Fig-1A et B). Cette surexpression de ***GALIG*** s'accompagne **d'une surexpression de *MCL1*** (article 2-Fig1-D). Cette double expression ***GALIG/MCL1*** pourrait expliquer le fait que, comme pour les cellules en différenciation, ces cellules n'ont pas de **caractéristiques apoptotiques**, malgré leur **taux élevé de *GALIG***.

Ces différences d'expression nous ont dans un **premier temps surpris**. En effet, dans ce groupe de patients, nous nous attendions à une expression identique à celle des

donneurs sains. En effet, **le nombre de L_TCD4^+ , ainsi que le ratio L_TCD4^+/L_TCD8^+** de ces patients **sous traitement** sont **quasi normaux**. Ces patients ne présentent **aucune charge virale circulante** détectable et les **marqueurs d'activations** du système immunitaire (CD38, HLA-DR, *etc...*) sont retournés à la norme. Mais il est connu que **l'activation longue du système immunitaire**, même sous traitement, peut entraîner un **épuisement relatif du système immunitaire**, conduisant à une **perte à la fois de certaines fonctions effectrices** et de la **capacité proliférative de certains L_T mémoires** (Mohan *et al.* 2014). Le traitement ne parvient donc pas à **restaurer un système immunitaire** équivalent à celui d'individus séronégatifs (Wilson et Sereti 2013). Dans la littérature, peu d'études ont été réalisées sur des patients **infectés par le VIH, traités efficacement depuis longtemps et n'ayant aucune charge virale circulante détectable**. Quelques travaux scientifiques ont montré une **dérégulation de plusieurs gènes** entre les patients traités et des contrôles sains, ou entre le diagnostic et après le traitement efficace. **Ces dérégulations** touchent notamment l'expression de gènes impliqués dans la **réponse immunitaire, la prolifération cellulaire, la structure de la chromatine et l'apoptose** (Ockenhouse *et al.* 2005; Massanella *et al.* 2013).

Cette surexpression du gène *GALIG* laisse supposer que le système immunitaire de ces patients n'est pas retourné à un état « basal », et qu'une activation résiduelle perdure. Chez certains patients, la **restauration immunitaire** est suivie par une **réponse inflammatoire aiguë**, ou **résiduelle** avec notamment des **niveaux élevés de plusieurs cytokines proinflammatoires**, comme les interleukines-1, -8, -6 ou encore la protéine réactive C (Wilson et Sereti 2013). Il se trouve que les monocytes sont les cellules majoritairement responsables de l'inflammation, *via* la production de l'IL-1 β . Le gène *GALIG* se trouve être **plus exprimé dans les monocytes que dans les lymphocytes du sang périphérique**, chez des **donneurs sains**. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que le taux d'expression de *GALIG* pourrait **refléter l'état d'activation et/ou d'inflammation du système immunitaire**.

Afin de vérifier cette hypothèse et si l'expression de *GALIG* peut-être corrélée à un état d'inflammation chronique et/ou de « fatigue » du système immunitaire, il serait intéressant de tester **l'expression de *GALIG*** dans les différentes

populations cellulaires **L_TCD4⁺, L_TCD8⁺ et les monocytes**, chez ces patients infectés par le VIH n'ayant aucune charge virale. De même il serait important d'étudier en parallèle, les marqueurs **d'activation des L_T CD4 et CD8**, l'activation des **caspases apoptotiques et inflammatoires**, ainsi que des marqueurs permettant d'évaluer **l'état général du système immunitaire**.

Par ailleurs, le **réservoir du virus** reste un **enjeu scientifique** majeur. En effet, pour bon nombre de patients infectés par le VIH, le traitement est commencé pendant la phase asymptomatique, ce qui permet au réservoir viral de s'établir. L'existence de ce réservoir implique de maintenir le traitement ARV **tout le long de la vie** (Laskey et Siliciano 2014). Compléter nos **données d'expression du gène *GALIG*** avec une évaluation du **réservoir viral** (ADN viral intégré et/ou ADN viral circulaire) **de ces patients** pourrait être informatif. Ceci nous permettra par exemple de savoir si la **taille du réservoir** peut avoir des **conséquences sur l'expression de gènes**. Par ailleurs, **introduire le traitement précocement** permet de **diminuer l'établissement de ce réservoir viral** (Hocqueloux *et al.* 2013). Ainsi, dans l'étude **VISCONTI** (Viro-Immunological Sustained CONtrol after Treatment Interruption), sur 14 patients traités en primo-infection pendant 3 ans (médiane), 10 ont pu arrêter leur traitement ensuite, sans remontée de charge virale (Hocqueloux *et al.* 2013; Sáez-Cirión *et al.* 2013). Il serait particulièrement intéressant d'évaluer le **taux d'expression de *GALIG*** chez ces patients.

Une **étude préliminaire** sur des PBMC de **patients nouvellement diagnostiqués** comme étant infectés par le VIH a été réalisée. L'effectif de ce groupe reste faible ($n = 7$), et il se trouve **très hétérogène**. En effet, la plupart de ces patients ne sont pas **diagnostiqués en phase de primo-infection**, mais durant toutes les phases (cf. p. 72), (médiane **CD4** = 308 cellules/mL de sang ; [99-1398] ; médiane **CV** = 10 900 copies/mL de sang ; [636-2 228 000]). Dans ce groupe, nous montrons également une **surexpression** du gène ***GALIG***, équivalente aux individus traités (donnée non montrée). L'étude statistique par apprentissage n'a pas pu être réalisée (cf. article 2), car le nombre de patients est trop faible. Il faudrait donc augmenter l'effectif, afin de pouvoir **diviser**

ces patients en sous-groupe en fonction de leur **CV** et/ou de leur taux de **L_TCD4⁺** au diagnostic. Par la suite, l'analyse de l'expression génique dans les sous-populations **L_TCD4⁺**, **L_TCD8⁺** et **monocytes**, et une étude statistique des dosages obtenues sur les cellules de ces patients **nouvellement diagnostiqués**, donc ayant une charge virale circulante, seront réalisées. Cette étude pilote montre néanmoins **une augmentation d'expression de *GALIG*** au cours d'une **infection active sans traitement**.

Une **étude complémentaire** pourrait être réalisée lors d'une **infection VIH *in vitro***, de lignées monocytaires et lymphocytaires T, puis de cellules primaires. En effet, suivre la **cinétique d'expression des gènes *GALIG* et *MCL1*** au cours de l'infection ainsi que la **localisation cellulaire des Galigines** dans des **monocytes** et des lymphocytes infectés serait également un complément intéressant. En effet, dans un modèle *in vitro* les paramètres de l'infection (pourcentage de cellules infectées, production de virions etc....) sont bien définis en comparaison à ceux caractéristiques d'une infection *in vivo*.

2) Expression des gènes impliqués dans l'autophagie :

Différentes d'études ont montré que le virus, pour se répliquer dans l'organisme, établit différentes stratégies afin d'échapper au système immunitaire et d'utiliser au mieux la machinerie cellulaire pour se répliquer. Par exemple, le virus **bloque l'autophagie** dans les cellules dendritiques et les macrophages, **empêchant la présentation de l'Ag viral** (Blanchet et Piguet 2010), et dans les L_TCD4⁺ infectés qui produisent du virus (Espert *et al.* 2009).

Le virus inhibe donc l'autophagie afin d'effectuer son cycle viral, mais qu'en est-il lorsque le patient est sous traitement efficace et donc sans aucune charge virale circulante ?

Parmi les 7 gènes impliqués dans l'autophagie que nous avons évalués, nous montrons une **surexpression** des gènes ***LC3*** et ***GABARAPL1*** chez ces patients alors que pour le gène **Bécline-1/*BECN1***, elle **diminue**. Ces résultats d'expression chez ces patients nous ont également surpris. En effet, il est connu, chez les patients ayant du virus circulant, que l'autophagie est inhibée par le virus lui-même (Espert *et al.* 2009). Or nous avons étudié un panel de patients sous traitement efficace, et nos résultats laissent penser que l'autophagie **serait toujours altérée chez ces patients sans charge virale plasmatique**.

Une étude publiée, en février 2017, la seule à ce jour réalisée sur des **patients traités efficacement et n'ayant aucune charge virale circulante**, a montré une **altération de l'autophagie**, notamment une **diminution de la réponse** après induction chez ces patients (Gómez-Mora *et al.* 2017). Dans notre étude, nous révélons par algorithme d'apprentissage automatique (« machine learning algorithm system») (article 2-Fig2) que l'**augmentation du gène *GABARAPL1*** et le **taux du gène *ATG9a*** sont les deux discriminants majeurs entre les individus infectés par VIH et les individus non infectés. Ainsi, même si l'**augmentation de *GABARAPL1* et *LC3*** que nous rapportons pourrait être en faveur d'une **augmentation de l'autophagie** chez ces patients VIH+, les **diminutions de l'expression de Bécline-1/BECN1 et d'*ATG9a***, qui permettent respectivement la formation du **complexe initiateur PI3K/Bécline** (Lamb, Yoshimori, et Tooze 2013) (cf. p. 32), et l'**apport de phospholipides et de morceaux de membrane** au niveau du **site du phagophore en formation** (Papinski *et al.* 2014), pourraient expliquer pourquoi l'**autophagie est diminuée chez les patients infectés par le VIH**. Nos résultats sont donc **en accord avec la littérature** et permettent d'émettre l'hypothèse d'une **inhibition de l'autophagie via la sous-expression de Bécline-1/BECN1 et d'*ATG9a***. Il serait donc important de compléter ces résultats par l'étude de ces protéines chez ces patients n'ayant aucune charge virale.

Il a été rapporté qu'un **haut niveau d'expression de *GABARAPL1*** dans les **cancers du sein** est associé à une **diminution du taux de croissance cellulaire** (Berthier *et al.* 2010). De plus, *GABARAPL1* joue un rôle dans le métabolisme cellulaire et la production d'énergie, notamment par le recyclage des mitochondries endommagées (Boyer-Guittaut *et al.* 2014). Par ailleurs, le **gène *GALIG* est également surexprimé** chez ces patients et une de ces protéines, la **Mitogaligine** a une **localisation mitochondriale**. Il serait donc intéressant d'étudier la **quantité et la qualité des mitochondries**, ainsi que leur **métabolisme** (production d'ATP, potentiel membranaire etc...) chez ces patients. Selon les résultats obtenus, ceci pourrait alors donner des **pistes d'études complémentaires sur le vieillissement précoce** rapporté chez les patients infectés et traités au long cours.

L'étude préliminaire sur des PBMC de patients nouvellement diagnostiqués révèle également une surexpression de *LC3*, de *GABARAPL1*, mais aussi de *p62/SQSTM1*. Nous ne montrons aucune différence pour les gènes *ATG9*, *GABARAP* et *Bécline-1/BECN1*, mais nous mettons en évidence une sous-expression de *GABARAPL2*. Comme pour *GALIG*, l'analyse des données par apprentissage n'a également pas pu être réalisée, et augmenter l'effectif nous permettra de savoir si la signature d'expression génique *GABARAPL1/ATG9a* est la même que chez les patients sans charge virale.

En ce qui nous concerne, nous avons travaillé sur toutes les cellules mononucléées du sang de ces patients. Or il a été montré que le niveau basal d'autophagie dans les monocytes ou les lymphocytes n'était pas identique (Espert *et al.* 2009; Borel, Espert, et Biard-Piechaczyk 2012; Dinkins, Pilli, et Kehrl 2015). C'est pourquoi il faudrait continuer les investigations chez ces patients, après tris cellulaires des *L_TCD4⁺*, *L_TCD8⁺* et des monocytes, afin de tester le niveau d'expression de ces gènes impliqués dans l'autophagie. Ceci devra être complété par des études fonctionnelles de l'autophagie, toujours dans ces populations triées, notamment par l'évaluation du niveau basal de l'autophagie (repérage de LC3 par microscopie à épifluorescence et western blot), par l'analyse de l'expression de *GALIG* et des gènes impliqués dans l'autophagie après l'induction et l'inhibition de celle-ci, ainsi que par l'étude protéique des produits du gène *GALIG* et des protéines impliquées dans l'autophagie.

III. GALIG et mécanisme d'action :

Le gène *GALIG*, initialement décrit comme induisant la mort cellulaire (Duneau *et al.* 2005), est sous-exprimé dans une pathologie associée à un blocage de la différenciation cellulaire myéloïde (Mollet *et al.* 2013). Nous montrons ici que ce gène est également exprimé au cours de la différenciation myéloïde *in vitro*, de lignées et de cellules primaires (article 1, Figure 28, Figure 29, Figure 30 et Figure 35). dans ce cas, cette augmentation de *GALIG* s'accompagne de l'augmentation de *MCL1*, qui, pour rappel, peut contrecarrer la mort induite par les Galigines (Mollet *et al.* 2013). De plus, son expression augmente avec le degré de différenciation des cellules myéloïdes (article

1). Par ailleurs, ***GALIG*** et ***MCL1*** sont **surexprimés** dans les cellules de patients infectés par le **VIH**, **traités** et **n'ayant aucune charge virale**. Le gène ***GALIG*** de part ses **propriétés apoptotiques** nécessite **d'être étroitement régulé** au sein de la cellule, et toutes ces données renforcent l'idée d'une régulation fine entre **molécules pro-apoptotiques et anti-apoptotiques**.

Nous observons donc des **régulations d'expression génique opposées** dans ces deux pathologies. **L'activation ou la répression** de gènes peut être contrôlée par plusieurs mécanismes, notamment par des **facteurs de transcriptions** (*GATA-1*, *p53*, *CBFa-CBF β* etc...), mais également par **modification épigénétique**, comme par exemple, l'ajout ou le retrait de groupement méthyle sur l'ADN et/ou les histones et/ou de groupement acétyle sur les histones. Ainsi le promoteur du gène ***GABARAPL1*** se trouve être hyper-méthylé dans les tumeurs mammaires, entraînant une diminution de son expression (Hervouet *et al.* 2015). Il serait donc **indispensable d'étudier et de comparer les régions promotrices du gène *GALIG*** chez des individus sains, chez des patients atteints de LAM (où ***GALIG*** est sous-exprimé) ainsi que chez des patients VIH+ (où ***GALIG*** est surexprimé), afin de savoir si les dérégulations d'expression de ce gène, observées dans ces deux pathologies, peuvent être dues à ce type de modifications épigénétiques

Les données récentes d'interaction des produits du gène ***GALIG*** avec d'autres protéines permettent de fournir des pistes sur son mécanisme d'action.

En marge de ce travail, il a été montré au laboratoire que la **Cytogaligine** interagit avec le complexe **THEM4/LETM1** (données non montrées). LETM1 se trouve être un transporteur calcique mitochondrial (Jiang, Zhao, et Clapham 2009). Le **gradient de calcium** entre la mitochondrie et le cytosol est impliqué dans la régulation de l'apoptose et l'autophagie (Pinton *et al.* 2008). Ainsi ce complexe THEM4/LETM1 permet la régulation de plusieurs processus comme l'apoptose et le cycle cellulaire. De plus, la protéine **Mcl-1**, qui s'oppose à la mort induite par ***GALIG***, interagit également avec ce complexe **THEM4/LETM1** (donnée non montrée). Ce triangle d'interaction pourrait être à l'origine de cette **balance mort/survie entre les protéines du gène *GALIG* et Mcl-1**. Des études de transfections avec une sonde calcique mitochondrial (m_{t} pericam,

(Nagai *et al.* 2001)) ou cytosolique (Fura-2), pourraient nous permettre de mieux comprendre cette **opposition mort/survie** entre les produits du gène *GALIG* et Mcl-1.

Par ailleurs, la protéine **Mcl-1** se trouve être **ubiquitinylée** par Huwe1, une E3-Ligase (Zhong *et al.* 2005) (cf. p. 40 et 43) entraînant ainsi sa **dégradation par le protéasome**. Or **HUWE1** interagit également avec la **Cytogaligine**, ce qui pourrait contrecarrer la dégradation de Mcl-1 et donc permettre la survie de la cellule exprimant *GALIG*.

Les interactions entre la **Cytogaligine** et les protéines impliquées dans **l'autophagie et le système ubiquitine protéasome** (cf. p. 43) laissent supposer plusieurs hypothèses :

- La Cytogaligine participe à l'autophagie et/ou au système ubiquitine protéasome.

Afin de répondre à cette question il faudrait tester les **conséquences de l'invalidation du gène *GALIG* sur le déroulement de l'autophagie**. Poursuivre les recherches des études d'interaction, afin de savoir si **d'autres protéines impliquées dans l'autophagie interagissent** avec les produits du gène *GALIG* est également une perspective intéressante. Ceci permettrait peut-être de positionner les Galigines dans ce processus. De plus, une étude est en cours au laboratoire afin de connaître les **séquences ou les domaines par lesquelles la Cytogaligine interagit** avec ses différents partenaires impliqués dans l'autophagie, ceci pourrait permettre de mieux comprendre l'aspect structural de la Cytogaligine.

- La Cytogaligine est dégradée dans la cellule par l'autophagie et/ou au système ubiquitine protéasome.

Etudier le devenir de la Cytogaligine dans la cellule *via* des études complémentaires, permettrait de savoir si elle est dégradée par ces systèmes. **Des tests de transfection** de la Cytogaligine, avec **inhibition du protéasome, inhibition et/ou activation de l'autophagie**, suivis d'une analyse protéique, par western blot, nous permettraient ainsi de répondre à cette question.

Pour conclure, les résultats obtenus au cours de ce travail révèlent que l'expression du gène *GALIG* est sujette à des modulations importantes, que ce soit dans des situations pathologiques ou non. Ces résultats permettent de penser que la fonction du gène *GALIG* est associée à d'autres fonctions que l'apoptose, notamment la différenciation myéloïde. Décrire plus précisément les mécanismes de régulation de l'expression du gène ainsi que les mécanismes d'action des Galigines nous permettra de mieux comprendre son rôle, et ainsi son implication dans les pathologies étudiées (LAM et infection à VIH).

*Références
bibliographiques*

Références bibliographiques :☞ Article et thèse :

- Adams, J. M., et S. Cory. 1998. « The Bcl-2 Protein Family: Arbiters of Cell Survival ». *Science (New York, N.Y.)* 281 (5381): 1322- 26.
- Adams, J. M., et S. Cory. 2002. « Apoptosomes: Engines for Caspase Activation ». *Current Opinion in Cell Biology* 14 (6): 715- 20.
- Adams, J. 2003. « The proteasome: structure, function, and role in the cell ». *Cancer Treatment Reviews* 29, Supplement 1 (mai): 3- 9.
- Andersson, L. C., K. Nilsson, et C. G. Gahrberg. 1979. « K562—A Human Erythroleukemic Cell Line ». *International Journal of Cancer* 23 (2): 143- 47.
- Arber, D. A., A. Orazi, R. Hasserjian, J. Thiele, M. J. Borowitz, M. M. Le Beau, C. D. Bloomfield, M. Cazzola, et J. W. Vardiman. 2016. « The 2016 Revision to the World Health Organization Classification of Myeloid Neoplasms and Acute Leukemia ». *Blood* 127 (20): 2391- 2405.
- Ashford, T. P., et K. R. Porter. 1962. « CYTOPLASMIC COMPONENTS IN HEPATIC CELL LYSOSOMES ». *The Journal of Cell Biology* 12 (1): 198- 202.
- Autran, B., G. Carcelain, T. S. Li, C. Blanc, D. Mathez, R. Tubiana, C. Katlama, P. Debré, et J. Leibowitch. 1997. « Positive Effects of Combined Antiretroviral Therapy on CD4+ T Cell Homeostasis and Function in Advanced HIV Disease ». *Science (New York, N.Y.)* 277 (5322): 112- 16.
- Baba, M., M. Osumi, et Y. Ohsumi. 1995. « Analysis of the Membrane Structures Involved in Autophagy in Yeast by Freeze-Replica Method ». *Cell Structure and Function* 20 (6): 465- 71.
- Baliga, B. S., M. Mankad, A. K. Shah, et V. N. Mankad. 1993. « Mechanism of Differentiation of Human Erythroleukaemic Cell Line K562 by Hemin ». *Cell Proliferation* 26 (6): 519- 29.
- Barre-Sinoussi, F., J. C. Chermann, F. Rey, M. T. Nugeyre, S. Chamaret, J. Gruest, C. Dauguet, *et al.* 1983. « Isolation of a T-Lymphotropic Retrovirus from a Patient at Risk for Acquired Immune Deficiency Syndrome (AIDS) ». *Science* 220 (4599): 868- 71.
- Barré-Sinoussi, F., A. L. Ross, et J-F. Delfraissy. 2013. « Past, Present and Future: 30 Years of HIV Research ». *Nature Reviews Microbiology* 11 (12): 877- 83.
- Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick, et C. Sultan. 1976. « Proposals for the Classification of the Acute Leukaemias. French-American-British (FAB) Co-Operative Group ». *British Journal of Haematology* 33 (4): 451- 58.
- Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick, et C. Sultan. 1985a. « Criteria for the Diagnosis of Acute Leukemia of Megakaryocyte Lineage (M7). A Report of the French-American-British Cooperative Group ». *Annals of Internal Medicine* 103 (3): 460- 62.
- Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick, et C. Sultan. 1985b. « Proposed Revised Criteria for the Classification of Acute Myeloid Leukemia. A Report of the French-American-British Cooperative Group ». *Annals of Internal Medicine* 103 (4): 620- 25.
- Bennett, J. M., D. Catovsky, M. T. Daniel, G. Flandrin, D. A. Galton, H. R. Gralnick, et C. Sultan. 1991. « Proposal for the Recognition of Minimally Differentiated Acute Myeloid Leukaemia (AML-MO) ». *British Journal of Haematology* 78 (3): 325- 29.
- Berg, C. P., I. H. Engels, A. Rothbart, K. Lauber, A. Renz, S. F. Schlosser, K. Schulze-Osthoff, et S. Wesselborg. 2001. « Human Mature Red Blood Cells Express Caspase-3 and Caspase-8, but Are Devoid of Mitochondrial Regulators of Apoptosis ». *Cell Death and Differentiation* 8 (12): 1197- 1206.

- Berthier, A., S. Seguin, A. J. Sasco, J. Y. Bobin, G. De Laroche, J. Datchary, S. Saez, *et al.* 2010. « High Expression of Gabarapl1 Is Associated with a Better Outcome for Patients with Lymph Node-Positive Breast Cancer ». *British Journal of Cancer* 102 (6): 1024- 31.
- Blanchet, F. P., et V. Piguet. 2010. « Immunoamphisomes in dendritic cells amplify TLR signaling and enhance exogenous antigen presentation on MHC-II ». *Autophagy* 6 (6): 816- 18.
- Bollag, W. 1983. « Vitamin A and Retinoids: From Nutrition to Pharmacotherapy in Dermatology and Oncology ». *Lancet (London, England)* 1 (8329): 860- 63.
- Borel, S., L. Espert, et M. Biard-Piechaczyk. 2012. « Macroautophagy regulation during HIV-1 infection of CD4+ T cells and macrophages ». *Antigen Presenting Cell Biology* 3: 97.
- Borel, S., V. Robert-Hebmann, J. Alfaisal, A. Jain, M. Faure, L. Espert, L. Chaloin, J-C. Paillart, T. Johansen, et M. Biard-Piechaczyk. 2015. « HIV-1 Viral Infectivity Factor Interacts with Microtubule-Associated Protein Light Chain 3 and Inhibits Autophagy ». *AIDS (London, England)* 29 (3): 275- 86.
- Boyer-Guittaut, M., L. Poillet, Q. Liang, E. Bôle-Richard, X. Ouyang, G. A. Benavides, F-Z. Chakrama, *et al.* 2014. « The Role of GABARAPL1/GEC1 in Autophagic Flux and Mitochondrial Quality Control in MDA-MB-436 Breast Cancer Cells ». *Autophagy* 10 (6): 986- 1003.
- Broemer, M., et P. Meier. 2009. « Ubiquitin-Mediated Regulation of Apoptosis ». *Trends in Cell Biology* 19 (3): 130- 40.
- Campbell, G. R., P. Rawat, R. S. Bruckman, et S. A. Spector. 2015. « Human Immunodeficiency Virus Type 1 Nef Inhibits Autophagy through Transcription Factor EB Sequestration ». *PLoS Pathogens* 11 (6): e1005018.
- Cassan, E., A-M. Arigon-Chifolleau, J-M. Mesnard, A. Gross, et O. Gascuel. 2016. « Concomitant Emergence of the Antisense Protein Gene of HIV-1 and of the Pandemic ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (41): 11537- 42.
- Centers for Disease Control (CDC). 1981. « Pneumocystis Pneumonia--Los Angeles ». *MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report* 30 (21): 250- 52.
- Cheng, E. H., M. C. Wei, S. Weiler, R. A. Flavell, T. W. Mak, T. Lindsten, et S. J. Korsmeyer. 2001. « BCL-2, BCL-X(L) Sequester BH3 Domain-Only Molecules Preventing BAX- and BAK-Mediated Mitochondrial Apoptosis ». *Molecular Cell* 8 (3): 705- 11.
- Choe, H., M. Farzan, Y. Sun, N. Sullivan, B. Rollins, P. D. Ponath, L. Wu, *et al.* 1996. « The Beta-Chemokine Receptors CCR3 and CCR5 Facilitate Infection by Primary HIV-1 Isolates ». *Cell* 85 (7): 1135- 48.
- Chomont, N., M. El-Far, P. Ancuta, L. Trautmann, F. A Procopio, B. Yassine-Diab, G. Boucher, *et al.* 2009. « HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation ». *Nature Medicine* 15 (8): 893- 900.
- Cleary, M. L., S. D. Smith, et J. Sklar. 1986. « Cloning and structural analysis of cDNAs for bcl-2 and a hybrid bcl-2/immunoglobulin transcript resulting from the t(14;18) translocation ». *Cell* 47 (1): 19- 28.
- Cohen-Kaplan, V., I. Livneh, N. Avni, C. Cohen-Rosenzweig, et A. Ciechanover. 2016. « The Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy: Coordinated and Independent Activities ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, juillet.
- Collins, S. J., R. C. Gallo, et R. E. Gallagher. 1977. « Continuous Growth and Differentiation of Human Myeloid Leukaemic Cells in Suspension Culture ». *Nature* 270 (5635): 347- 49.
- Cory, S., et J. M. Adams. 2002. « The Bcl2 Family: Regulators of the Cellular Life-or-Death Switch ». *Nature Reviews Cancer* 2 (9): 647- 56.

- Daigneault, M., J. A. Preston, H. M. Marriott, M. K. B. Whyte, et D. H. Dockrell. 2010. « The Identification of Markers of Macrophage Differentiation in PMA-Stimulated THP-1 Cells and Monocyte-Derived Macrophages ». *PLOS ONE* 5 (1): e8668.
- Dalton, W T, Jr, M J Ahearn, K B McCredie, E J Freireich, S A Stass, et J M Trujillo. 1988. « HL-60 Cell Line Was Derived from a Patient with FAB-M2 and Not FAB-M3 ». *Blood* 71 (1): 242- 47.
- Daussy, Coralie F., Bruno Beaumelle, et Lucile Espert. 2015. « Autophagy Restricts HIV-1 Infection ». *Oncotarget* 6 (25): 20752- 53.
- Declercq, W., T. Vanden Berghe, et P. Vandenabeele. 2009. « RIP Kinases at the Crossroads of Cell Death and Survival ». *Cell* 138 (2): 229- 32.
- Demasi, M, V. Simões, et D. Bonatto. 2015. « Cross-Talk between Redox Regulation and the Ubiquitin-Proteasome System in Mammalian Cell Differentiation ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1850 (8): 1594- 1606.
- Denes, A, G Lopez-Castejon, et D Brough. 2012. « Caspase-1: is IL-1 just the tip of the ICEberg? ». *Cell Death & Disease* 3 (7): e338.
- Denizot, M., M. Varbanov, L. Espert, V. Robert-Hebmann, S. Sagnier, E. G. E. Garcia, M. Curriu, R. Mamoun, J. Blanco, et M. Biard-Piechaczyk. 2008. « HIV-1 gp41 fusogenic function triggers autophagy in uninfected cells ». *Autophagy* 4 (8): 998- 1008.
- Dinkins, C., M. Pilli, et J. H. Kehrl. 2015. « Roles of Autophagy in HIV Infection ». *Immunology and Cell Biology* 93 (1): 11- 17.
- Djavaheri-Mergny, M., M. C. Maiuri, et G. Kroemer. 2010. « Cross Talk between Apoptosis and Autophagy by Caspase-Mediated Cleavage of Beclin 1 ». *Oncogene* 29 (12): 1717- 19.
- Döhner, H., E. H. Estey, S. Amadori, F. R. Appelbaum, T. Büchner, A. K. Burnett, H. Dombret, et al. 2010. « Diagnosis and Management of Acute Myeloid Leukemia in Adults: Recommendations from an International Expert Panel, on Behalf of the European LeukemiaNet ». *Blood* 115 (3): 453- 74.
- Droin, N., S. Cathelin, A. Jacquelin, L. Guéry, C. Garrido, M. Fontenay, O. Hermine, et E. Solary. 2008. « A role for caspases in the differentiation of erythroid cells and macrophages ». *Biochimie* 90 (2): 416- 22.
- Duneau, M., M. Boyer-Guittaut, P. Gonzalez, S. Charpentier, T. Normand, M. Dubois, J. Raimond, et A. Legrand. 2005. « Galig, a novel cell death gene that encodes a mitochondrial protein promoting cytochrome c release ». *Experimental cell research* 302 (2): 194- 205.
- Ellis, H. M., et H. R. Horvitz. 1986. « Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans* ». *Cell* 44 (6): 817- 29.
- Espert, L., M. Denizot, M. Grimaldi, V. Robert-Hebmann, B. Gay, M. Varbanov, P. Codogno, et M. Biard-Piechaczyk. 2006. « Autophagy Is Involved in T Cell Death after Binding of HIV-1 Envelope Proteins to CXCR4 ». *The Journal of Clinical Investigation* 116 (8): 2161- 72.
- Espert, L., M. Varbanov, V. Robert-Hebmann, S. Sagnier, I. Robbins, F. Sanchez, V. Lafont, et M. Biard-Piechaczyk. 2009. « Differential Role of Autophagy in CD4 T Cells and Macrophages during X4 and R5 HIV-1 Infection ». *PLOS ONE* 4 (6): e5787.
- Esteve, J. M, et E. Knecht. 2011. « Mechanisms of autophagy and apoptosis: Recent developments in breast cancer cells ». *World Journal of Biological Chemistry* 2 (10): 232- 38.
- Evangelisti, C., C. Evangelisti, F. Chiarini, A. Lonetti, F. Buontempo, L. M. Neri, J. A. McCubrey, et A. M. Martelli. 2015. « Autophagy in Acute Leukemias: A Double-Edged Sword with Important Therapeutic Implications ». *Biochimica Et Biophysica Acta* 1853 (1): 14- 26.

- Fackler, O. T., et A. S. Baur. 2002. « Live and Let Die: Nef Functions beyond HIV Replication ». *Immunity* 16 (4): 493- 97.
- Fanale-Belasio, E., M. Raimondo, B. Suligoi, et S. Buttò. 2010. « HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview ». *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* 46 (1): 5- 14.
- Fauci, A. S. 1988. « The Human Immunodeficiency Virus: Infectivity and Mechanisms of Pathogenesis ». *Science (New York, N.Y.)* 239 (4840): 617- 22.
- Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, et E. A. Berger. 1996. « HIV-1 Entry Cofactor: Functional CDNA Cloning of a Seven-Transmembrane, G Protein-Coupled Receptor ». *Science (New York, N.Y.)* 272 (5263): 872- 77.
- Fischl, M. A., D. D. Richman, M. H. Grieco, M. S. Gottlieb, P. A. Volberding, O. L. Laskin, J. M. Leedom, J. E. Groopman, D. Mildvan, et R. T. Schooley. 1987. « The Efficacy of Azidothymidine (AZT) in the Treatment of Patients with AIDS and AIDS-Related Complex. A Double-Blind, Placebo-Controlled Trial ». *The New England Journal of Medicine* 317 (4): 185- 91.
- Flynn, P. J., W. J. Miller, D. J. Weisdorf, D. C. Arthur, R. Brunning, et R. F. Branda. 1983. « Retinoic Acid Treatment of Acute Promyelocytic Leukemia: In Vitro and in Vivo Observations ». *Blood* 62 (6): 1211- 17.
- Gallagher, R., S. Collins, J. Trujillo, K. McCredie, M. Ahearn, S. Tsai, R. Metzgar, et al. 1979. « Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia ». *Blood* 54 (3): 713- 33.
- Garg, H., J. Mohl, et A. Joshi. 2012. « HIV-1 Induced Bystander Apoptosis ». *Viruses* 4 (11): 3020- 43.
- Geissmann, F., M. G. Manz, S. Jung, M. H. Sieweke, M. Merad, et K. Ley. 2010. « Development of Monocytes, Macrophages, and Dendritic Cells ». *Science* 327 (5966): 656- 61.
- Geng, J., et D. J. Klionsky. 2008. « The Atg8 and Atg12 ubiquitin-like conjugation systems in macroautophagy. 'Protein Modifications: Beyond the Usual Suspects' Review Series ». *EMBO Reports* 9 (9): 859- 64.
- Glaser, S. P., E. F. Lee, E. Trounson, P. Bouillet, A. Wei, W. D. Fairlie, D. J. Izon, et al. 2012. « Anti-Apoptotic Mcl-1 Is Essential for the Development and Sustained Growth of Acute Myeloid Leukemia ». *Genes & Development* 26 (2): 120- 25.
- Gómez-Mora, E., V. Robert-Hebmann, E. García, M. Massanella, B. Clotet, C. Cabrera, J. Blanco, et M. Biard-Piechaczyk. 2017. « Brief Report: Impaired CD4 T-Cell Response to Autophagy in Treated HIV-1-Infected Individuals ». *Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes (1999)* 74 (2): 201- 5.
- Gonzalez, P., M. Duneau, S. Charpentier, T. Normand, L. Mollet, M. Dubois, et A. Legrand. 2007. « Destabilization of membranes containing cardiolipin or its precursors by peptides derived from mitogaligin, a cell death protein ». *Biochemistry* 46 (25): 7374- 82.
- Gonzalez, P., P. Robinet, S. Charpentier, L. Mollet, T. Normand, M. Dubois, et A. Legrand. 2009. « Apoptotic activity of a nuclear form of mitogaligin, a cell death protein ». *Biochemical and biophysical research communications* 378 (4): 816- 20.
- Green, Douglas R., et Gerard I. Evan. 2002. « A Matter of Life and Death ». *Cancer Cell* 1 (1): 19- 30.
- Guihot, Amélie, Anne Bourgarit, Guislaine Carcelain, et Brigitte Autran. 2011. « Immune Reconstitution after a Decade of Combined Antiretroviral Therapies for Human Immunodeficiency Virus ». *Trends in Immunology* 32 (3): 131- 37.

- Guittaut, M., S. Charpentier, T. Normand, M. Dubois, J. Raimond, et A. Legrand. 2001. « Identification of an internal gene to the human Galectin-3 gene with two different overlapping reading frames that do not encode Galectin-3 ». *The Journal of biological chemistry* 276 (4): 2652- 57.
- Gulick, R. M., J. W. Mellors, D. Havlir, J. J. Eron, C. Gonzalez, D. McMahon, D. D. Richman, *et al.* 1997. « Treatment with Indinavir, Zidovudine, and Lamivudine in Adults with Human Immunodeficiency Virus Infection and Prior Antiretroviral Therapy ». *New England Journal of Medicine* 337 (11): 734- 39.
- Gutierrez, M. G., S. S. Master, S. B. Singh, G. A. Taylor, M. I. Colombo, et V. Deretic. 2004. « Autophagy Is a Defense Mechanism Inhibiting BCG and Mycobacterium Tuberculosis Survival in Infected Macrophages ». *Cell* 119 (6): 753- 66.
- Hammer, S. M., K. E. Squires, M. D. Hughes, J. M. Grimes, L. M. Demeter, J. S. Currier, J. J. Jr. Eron, *et al.* 1997. « A Controlled Trial of Two Nucleoside Analogues plus Indinavir in Persons with Human Immunodeficiency Virus Infection and CD4 Cell Counts of 200 per Cubic Millimeter or Less ». *New England Journal of Medicine* 337 (11): 725- 33.
- Hengartner, M. O., et H. R. Horvitz. 1994. « Programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* ». *Current Opinion in Genetics & Development* 4 (4): 581- 86.
- Herrmann, J., L. O. Lerman, et A. Lerman. 2010. « On to the Road to Degradation: Atherosclerosis and the Proteasome ». *Cardiovascular Research* 85 (2): 291- 302.
- Hervouet, E., A. Claude-Taupin, T. Gauthier, V. Perez, A. Fraichard, P. Adami, G. Despouy, *et al.* 2015. « The Autophagy GABARAPL1 Gene Is Epigenetically Regulated in Breast Cancer Models ». *BMC Cancer* 15 (octobre): 729.
- Hicke, L., H. L. Schubert, et C. P. Hill. 2005. « Ubiquitin-Binding Domains ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 6 (8): 610- 21.
- Hocqueloux, L., V. Avettand-Fènoël, S. Jacquot, T. Prazuck, E. Legac, A. Mélard, M. Niang, *et al.* 2013. « Long-Term Antiretroviral Therapy Initiated during Primary HIV-1 Infection Is Key to Achieving Both Low HIV Reservoirs and Normal T Cell Counts ». *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 68 (5): 1169- 78.
- Hocqueloux, L., T. Prazuck, V. Avettand-Fenoel, A. Lafeuillade, B. Cardon, J-P Viard, et C. Rouzioux. 2010. « Long-Term Immunovirologic Control Following Antiretroviral Therapy Interruption in Patients Treated at the Time of Primary HIV-1 Infection ». *AIDS (London, England)* 24 (10): 1598- 1601.
- Hoffman, S. J., et W. A. Robinson. 1988. « Use of Differentiation-Inducing Agents in the Myelodysplastic Syndrome and Acute Non-Lymphocytic Leukemia ». *American Journal of Hematology* 28 (2): 124- 27.
- Honda, S., S. Arakawa, Y. Nishida, H. Yamaguchi, E. Ishii, et S. Shimizu. 2014. « Ulk1-Mediated Atg5-Independent Macroautophagy Mediates Elimination of Mitochondria from Embryonic Reticulocytes ». *Nature Communications* 5 (juin): 4004.
- Hozumi, N., et S. Tonegawa. 1976. « Evidence for Somatic Rearrangement of Immunoglobulin Genes Coding for Variable and Constant Regions ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 73 (10): 3628- 32.
- Jacquel, A., S. Obba, E. Solary, et P. Auberger. 2012. « Proper Macrophagic Differentiation Requires Both Autophagy and Caspase Activation ». *Autophagy* 8 (7): 1141- 43.
- Jiang, D., L. Zhao, et D. E. Clapham. 2009. « Genome-Wide RNAi Screen Identifies Letm1 as a Mitochondrial Ca²⁺/H⁺ Antiporter ». *Science (New York, N.Y.)* 326 (5949): 144- 47.

- Johansen, T., et T. Lamark. 2011. « Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins ». *Autophagy* 7 (3): 279- 96.
- Jourdain, A., et J-C Martinou. 2009. « Mitochondrial Outer-Membrane Permeabilization and Remodelling in Apoptosis ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41 (10): 1884- 89.
- Kang, R, H J Zeh, M T Lotze, et D Tang. 2011. « The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis ». *Cell Death and Differentiation* 18 (4): 571- 80.
- Kerr, J F, A H Wyllie, et A R Currie. 1972. « Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics ». *British journal of cancer* 26 (4): 239- 57.
- Kim, S S, S. Rhee, K. Ho Lee, J. Hwa Kim, H. Sun Kim, M.-Sik Kang, et C. Ha Chung. 1998. « Inhibitors of the proteasome block the myogenic differentiation of rat L6 myoblasts ». *FEBS Letters* 433.
- Koeffler, H. P., et D. W. Golde. 1980. « Human Myeloid Leukemia Cell Lines: A Review ». *Blood* 56 (3): 344- 50.
- Kuiken, C., T. Leitner, B. Foley, B. Hahn, P. Marx, F. McCutchan, S. Wolinsky, *et al.* 2009. « HIV sequence compendium 2009 ». *Los Alamos, New Mexico: Los Alamos National Laboratory, Theoretical Biology and Biophysics*.
- Kyei, G. B., C. Dinkins, A. S. Davis, E. Roberts, S. B. Singh, C. Dong, L. Wu, *et al.* 2009. « Autophagy pathway intersects with HIV-1 biosynthesis and regulates viral yields in macrophages ». *The Journal of Cell Biology* 186 (2): 255- 68.
- Lamb, C. A., T. Yoshimori, et S. A Tooze. 2013. « The Autophagosome: Origins Unknown, Biogenesis Complex ». *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14 (12): 759- 74.
- Laskey, S. B., et R. F. Siliciano. 2014. « A Mechanistic Theory to Explain the Efficacy of Antiretroviral Therapy ». *Nature Reviews Microbiology* 12 (11): 772- 80.
- Launay, S., O. Hermine, M. Fontenay, G. Kroemer, E. Solary, et C. Garrido. 2005. « Vital Functions for Lethal Caspases ». *Oncogene* 24 (33): 5137- 48.
- Leveque-El Mouttie, L., T. Vu, K. E. Lineburg, R. D. Kuns, F. O. Bagger, B. E. Teal, M. Lor, *et al.* 2015. « Autophagy Is Required for Stem Cell Mobilization by G-CSF ». *Blood* 125 (19): 2933- 36.
- Li, J., et J. Yuan. 2008. « Caspases in Apoptosis and Beyond ». *Oncogene* 27 (48): 6194- 6206.
- Li, W-W., J. Li, et J-k. Bao. 2012. « Microautophagy: Lesser-Known Self-Eating ». *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 69 (7): 1125- 36.
- Lindqvist, L. M., et D. L. Vaux. 2014. « BCL2 and related prosurvival proteins require BAK1 and BAX to affect autophagy ». *Autophagy* 10 (8): 1474- 75.
- Löwenberg, B, J R Downing, et A Burnett. 1999. « Acute myeloid leukemia ». *The New England journal of medicine* 341 (14): 1051- 62.
- Lozzio, B. B., et C. B. Lozzio. 1979. « Properties and Usefulness of the Original K-562 Human Myelogenous Leukemia Cell Line ». *Leukemia Research* 3 (6): 363- 70.
- Lynch-Day, M. A., K. Mao, K. Wang, M. Zhao, et D. J. Klionsky. 2012. « The Role of Autophagy in Parkinson's Disease ». *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* 2 (4).
- Maiuri, M. C., G. Le Toumelin, A. Criollo, J-C Rain, F. Gautier, P. Juin, E. Tasdemir, *et al.* 2007. « Functional and Physical Interaction between Bcl-XL and a BH3-like Domain in Beclin-1 ». *The EMBO Journal* 26 (10): 2527- 39.
- Majeski, A. E., et J. F. Dice. 2004. « Mechanisms of Chaperone-Mediated Autophagy ». *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 36 (12): 2435- 44.

- Marchetti, P. 2005. « [Apoptosis: basic knowledge and applications] ». *Gynécologie, obstétrique & fertilité* 33 (9): 632- 41.
- Martin, S. J., C. P. Reutelingsperger, A. J. McGahon, J. A. Rader, R. C. van Schie, D. M. LaFace, et D. R. Green. 1995. « Early Redistribution of Plasma Membrane Phosphatidylserine Is a General Feature of Apoptosis Regardless of the Initiating Stimulus: Inhibition by Overexpression of Bcl-2 and Abl. » *The Journal of Experimental Medicine* 182 (5): 1545- 56.
- Martina, J. A., Y. Chen, M. Gucek, et R. Puertollano. 2012. « MTORC1 functions as a transcriptional regulator of autophagy by preventing nuclear transport of TFEB ». *Autophagy* 8 (6): 903- 14.
- Martinou, J.-C., et D. R. Green. 2001. « Breaking the Mitochondrial Barrier ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2 (1): 63- 67.
- Massanella, M., A. Singhanian, N. Beliakova-Bethell, R. Pier, S. M. Lada, C. H. White, J. Pérez-Santiago, et al. 2013. « Differential Gene Expression in HIV-Infected Individuals Following ART ». *Antiviral Research* 100 (2): 420- 28.
- Miller, R. H. 1988. « Human Immunodeficiency Virus May Encode a Novel Protein on the Genomic DNA plus Strand ». *Science (New York, N.Y.)* 239 (4846): 1420- 22.
- Mizushima, N., et B. Levine. 2010. « Autophagy in mammalian development and differentiation ». *Nature cell biology* 12 (9): 823- 30.
- Mohan, T., S. Bhatnagar, D. L. Gupta, et D. N. Rao. 2014. « Current Understanding of HIV-1 and T-Cell Adaptive Immunity: Progress to Date ». *Microbial Pathogenesis*, juin.
- Mollet, L., P. Robinet, M. Dubois, A. Aurouet, T. Normand, S. Charpentier, A. Sureau, et al. 2013. « Opposing Mcl-1, the GALIG Proapoptotic Gene Is Upregulated as Neutrophils Die and Underexpressed in Acute Myeloid Leukemia Cells ». *Molecular Immunology* 56 (1- 2): 123- 28.
- Moulleron, H., V. Delcourt, et X. Roucou. 2016. « Death of a Dogma: Eukaryotic MRNAs Can Code for More than One Protein ». *Nucleic Acids Research* 44 (1): 14- 23.
- Moulding, D. A., R. V. Giles, D. G. Spiller, M. R. H. White, D. M. Tidd, et S. W. Edwards. 2000. « Apoptosis Is Rapidly Triggered by Antisense Depletion of MCL-1 in Differentiating U937 Cells ». *Blood* 96 (5): 1756- 63.
- Nagai, T., A. Sawano, E. S. Park, et A. Miyawaki. 2001. « Circularly Permuted Green Fluorescent Proteins Engineered to Sense Ca²⁺ ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (6): 3197- 3202.
- Naujokat, C., et T. Šarić. 2007. « Concise Review: Role and Function of the Ubiquitin-Proteasome System in Mammalian Stem and Progenitor Cells ». *STEM CELLS* 25 (10): 2408- 18.
- Neutzner, A., S. Li, S. Xu, et M. Karbowski. 2012. « The Ubiquitin/Proteasome System-Dependent Control of Mitochondrial Steps in Apoptosis ». *Seminars in Cell & Developmental Biology* 23 (5): 499- 508.
- Nicholson, D. W. 1999. « Caspase Structure, Proteolytic Substrates, and Function during Apoptotic Cell Death ». *Cell Death and Differentiation* 6 (11): 1028- 42.
- Ockenhouse, C. F., W. B. Bernstein, Z. Wang, et M. T. Vahey. 2005. « Functional Genomic Relationships in HIV-1 Disease Revealed by Gene-Expression Profiling of Primary Human Peripheral Blood Mononuclear Cells ». *The Journal of Infectious Diseases* 191 (12): 2064- 74.
- Orkin, S. H., et L. I. Zon. 2008. « Hematopoiesis: An Evolving Paradigm for Stem Cell Biology ». *Cell* 132 (4): 631- 44.

- Papinski, D., M. Schuschnig, W. Reiter, L. Wilhelm, C. A. Barnes, A. Maiolica, I. Hansmann, *et al.* 2014. « Early Steps in Autophagy Depend on Direct Phosphorylation of Atg9 by the Atg1 Kinase ». *Molecular Cell* 53 (3): 471- 83.
- Pegoraro, L., J. Abraham, R. A. Cooper, A. Levis, B. Lange, P. Meo, et G. Rovera. 1980. « Differentiation of Human Leukemias in Response to 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetate in Vitro ». *Blood* 55 (5): 859- 62.
- Piao, L., Y. Li, S. J. Kim, K-C. Sohn, K-J Yang, K. A. Park, H. S. Byun, *et al.* 2009. « Regulation of OPA1-Mediated Mitochondrial Fusion by Leucine Zipper/EF-Hand-Containing Transmembrane Protein-1 Plays a Role in Apoptosis ». *Cellular Signalling* 21 (5): 767- 77.
- Pinton, P., C. Giorgi, R. Siviero, E. Zecchini, et R. Rizzuto. 2008. « Calcium and apoptosis: ER-mitochondria Ca^{2+} transfer in the control of apoptosis ». *Oncogene* 27 (50): 6407- 18.
- Preudhomme, C., L. Llopis, et N. Boissel. 2012. « Classification et facteurs pronostiques des leucémies aiguës ». *EMC - Hématologie* 7 (1): 1- 17.
- Radzun, H. J., M. R. Parwaresch, C. Sundström, K. Nilsson, et M. Eissner. 1983. « Monocytic Origin of the Human Hematopoietic Cell Line U-937 and Its Convertibility to Macrophages Evidenced by Isoenzyme Mapping ». *International Journal of Cancer* 31 (2): 181- 86.
- Raimond, J., F. Rouleux, M. Monsigny, et A. Legrand. 1995. « The second intron of the human galectin-3 gene has a strong promoter activity down-regulated by p53 ». *FEBS letters* 363 (1- 2): 165- 69.
- Rébé, C., S. Cathelin, S. Launay, R. Filomenko, L. Prévotat, C. L'Ollivier, E. Gyan, *et al.* 2007. « Caspase-8 prevents sustained activation of NF-kappaB in monocytes undergoing macrophagic differentiation ». *Blood* 109 (4): 1442- 50.
- Remy, I., et S. W. Michnick. 2006. « A Highly Sensitive Protein-Protein Interaction Assay Based on Gaussia Luciferase ». *Nature Methods* 3 (12): 977- 79.
- Renneville, A., C. Roumier, V. Biggio, O. Nibourel, N. Boissel, P. Fenaux, et C. Preudhomme. 2008. « Cooperating Gene Mutations in Acute Myeloid Leukemia: A Review of the Literature ». *Leukemia* 22 (5): 915- 31.
- Reya, T., S. J. Morrison, M. F. Clarke, et I. L. Weissman. 2001. « Stem Cells, Cancer, and Cancer Stem Cells ». *Nature* 414 (6859): 105- 11.
- Robinet, P. 2010. *La mitogaline, protéine de la mort cellulaire programmée: localisation nucléaire, conséquences de modifications post-traductionnelles potentielles et interaction fonctionnelle avec Mcl-1*. Orléans. <http://www.theses.fr/2010ORLE2082>.
- Sáez-Cirión, A., C. Bacchus, L. Hocqueloux, V. Avettand-Fenoel, I. Girault, C. Lecuroux, V. Potard, *et al.* 2013. « Post-Treatment HIV-1 Controllers with a Long-Term Virological Remission after the Interruption of Early Initiated Antiretroviral Therapy ANRS VISCONTI Study ». *PLoS Pathogens* 9 (3): e1003211.
- Sagnier, S., C. F. Daussy, S. Borel, V. Robert-Hebmann, M. Faure, F. P. Blanchet, B. Beaumelle, M. Biard-Piechaczyk, et Lucile Espert. 2015. « Autophagy Restricts HIV-1 Infection by Selectively Degrading Tat in CD4+ T Lymphocytes ». *Journal of Virology* 89 (1): 615- 25.
- Salvesen, G. S., et C. S. Duckett. 2002. « IAP Proteins: Blocking the Road to Death's Door ». *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 3 (6): 401- 10.
- Shalini, S., L. Dorstyn, S. Dawar, et S. Kumar. 2015. « Old, New and Emerging Functions of Caspases ». *Cell Death & Differentiation* 22 (4): 526- 39.

- Shoji-Kawata, S., R. Sumpter, M. Leveno, G. R. Campbell, Z. Zou, L. Kinch, A. D. Wilkins, *et al.* 2013. « Identification of a Candidate Therapeutic Autophagy-Inducing Peptide ». *Nature* 494 (7436): 201- 6.
- Sinha, S., et B. Levine. 2009. « The Autophagy Effector Beclin 1: A Novel BH3-Only Protein ». *Oncogene* 27 (S1): S137- 48.
- Sordet, O., C. Rébé, S. Plenchette, Y. Zermati, O. Hermine, W. Vainchenker, C. Garrido, E. Solary, et L. Dubrez-Daloz. 2002. « Specific Involvement of Caspases in the Differentiation of Monocytes into Macrophages ». *Blood* 100 (13): 4446- 53.
- Sperandio, S., I. de Belle, et D. E. Bredesen. 2000. « An Alternative, Nonapoptotic Form of Programmed Cell Death ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (26): 14376- 81.
- Sundström, C., et K. Nilsson. 1976. « Establishment and Characterization of a Human Histiocytic Lymphoma Cell Line (U-937) ». *International Journal of Cancer* 17 (5): 565- 77.
- Tabilio, A., P. G. Pelicci, G. Vinci, P. Mannoni, C. I. Civin, W. Vainchenker, U. Testa, M. Lipinski, H. Rochant, et J. Breton-Gorius. 1983. « Myeloid and Megakaryocytic Properties of K-562 Cell Lines ». *Cancer Research* 43 (10): 4569- 74.
- Thé, H. d., M. Le Bras, et V. Lallemand-Breitenbach. 2012. « Acute promyelocytic leukemia, arsenic, and PML bodies ». *The Journal of Cell Biology* 198 (1): 11- 21.
- Thomas, L. W., C. Lam, et S. W. Edwards. 2010. « Mcl-1; the molecular regulation of protein function ». *FEBS letters* 584 (14): 2981- 89.
- Thornberry, N. A., et Y. Lazebnik. 1998. « Caspases: Enemies Within ». *Science (New York, N.Y.)* 281 (5381): 1312- 16.
- Tooze, S. A., et T. Yoshimori. 2010. « The Origin of the Autophagosomal Membrane ». *Nature Cell Biology* 12 (9): 831- 35.
- Trocoli, A., P. Bensadoun, E. Richard, G. Labrunie, F. Merhi, A. M. Schläfli, D. Brigger, *et al.* 2014. « P62/SQSTM1 Upregulation Constitutes a Survival Mechanism That Occurs during Granulocytic Differentiation of Acute Myeloid Leukemia Cells ». *Cell Death and Differentiation* 21 (12): 1852- 61.
- Trocoli, A., J. Mathieu, M. Priault, J. Reiffers, S. Souquère, G. Pierron, F. Besançon, et M. Djavaheri-Mergny. 2011. « ATRA-induced upregulation of Beclin 1 prolongs the life span of differentiated acute promyelocytic leukemia cells ». *Autophagy* 7 (10): 1108- 14.
- Tsuchiya, S., Y. Kobayashi, Y. Goto, H. Okumura, S. Nakae, T. Konno, et K. Tada. 1982. « Induction of Maturation in Cultured Human Monocytic Leukemia Cells by a Phorbol Diester ». *Cancer Research* 42 (4): 1530- 36.
- Tsuchiya, S., M. Yamabe, Y. Yamaguchi, Y. Kobayashi, T. Konno, et K. Tada. 1980. « Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1) ». *International journal of cancer* 26 (2): 171-176.
- Tsujimoto, Y., L. R. Finger, J. Yunis, P. C. Nowell, et C. M. Croce. 1984. « Cloning of the Chromosome Breakpoint of Neoplastic B Cells with the t(14;18) Chromosome Translocation ». *Science (New York, N.Y.)* 226 (4678): 1097- 99.
- Vainchenker, W., U. Testa, J. Guichard, M. Titeux, et J. Breton-Gorius. 1981. « Heterogeneity in the Cellular Commitment of a Human Leukemic Cell Line: K 562 ». *Blood Cells* 7 (2): 357- 75.
- Vihinen H., J. Biazik, E. L. Eskelinen, et E. Jokitalo. 2014. « LS-2-P-3219 Three-dimensional analysis of phagophore biogenesis at ultra-structural level ». Poster présenté à 18TH International Microscopy Congress, Prague, Czech Republic, septembre 7. <http://www.microscopy.cz/html/3219.html>.

- Wajant, H., et P. Scheurich. 2011. « TNFR1-Induced Activation of the Classical NF-KB Pathway ». *The FEBS Journal* 278 (6): 862- 76.
- Wang, Z., L. Cao, R. Kang, M. Yang, L. Liu, Y. Zhao, Y. Yu, *et al.* 2011. « Autophagy regulates myeloid cell differentiation by p62/SQSTM1-mediated degradation of PML-RAR α oncoprotein ». *Autophagy* 7 (4): 401- 11.
- Wani, W. Y., M. Boyer-Guittaut, M. Dodson, J. Chatham, V. Darley-Usmar, et J. Zhang. 2015. « Regulation of autophagy by protein post-translational modification ». *Laboratory Investigation* 95 (1): 14- 25.
- Watson, A. S., T. Riffelmacher, A. Stranks, O. Williams, J. De Boer, K. Cain, M. MacFarlane, *et al.* 2015. « Autophagy Limits Proliferation and Glycolytic Metabolism in Acute Myeloid Leukemia ». *Cell Death Discovery* 1 (août): 15008.
- Weidberg, H., E. Shvets, T. Shpilka, F. Shimron, V. Shinder, et Z. Elazar. 2010. « LC3 and GATE-16/GABARAP Subfamilies Are Both Essential yet Act Differently in Autophagosome Biogenesis ». *The EMBO Journal* 29 (11): 1792- 1802.
- Weiss, R. A. 1993. « How Does HIV Cause AIDS? » *Science (New York, N.Y.)* 260 (5112): 1273- 79.
- WHO classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues / ed. by S. H. Swerdlow [et al.]; WHO. International Agency for Research on Cancer (IARC). 2008. Lyon: IARC.*
- Wilson, E. M.P., et I. Sereti. 2013. « Immune restoration after antiretroviral therapy: the pitfalls of hasty or incomplete repairs ». *Immunological reviews* 254 (1): 343- 54.
- Zhong, Q., W. Gao, F. Du, et X. Wang. 2005. « Mule/ARF-BP1, a BH3-Only E3 Ubiquitin Ligase, Catalyzes the Polyubiquitination of Mcl-1 and Regulates Apoptosis ». *Cell* 121 (7): 1085- 95.
- Zhu, P., J. Liu, J. Bess, E. Chertova, J. D. Lifson, H. Grisé, G. A. Ofek, K. A. Taylor, et K. H. Roux. 2006. « Distribution and Three-Dimensional Structure of AIDS Virus Envelope Spikes ». *Nature* 441 (7095): 847- 52.

⌘ Site internet :

- « Fiche d'information, Novembre 2016 | ONUSIDA ». 2017. Consulté le 1^{er} février.
<http://www.unaids.org/fr/resources/fact-sheet>.
- « Laboratoire d'Hématologie Cellulaire du CHU d'Angers ». 2016. Consulté 2 aout.
<http://hematocell.fr/index.php/enseignement-de-lhematologie-cellulaire/hematologie-et-pathologie-generale/63-1-morphologie-phenotype-cytogenetique-des-lam-myeloblastes-promyelocytes>.

Annexe

Annexe :

Articles soumis

Interaction of Alpha-synuclein with Cytogaligin, a protein encoded by the proapoptotic gene GALIG.

Saïd EL HADDAD, Amandine SERRANO, Thierry NORMAND, Martine DUBOIS, Julien BURLAUD GAILLARD*, Fabienne BRULE-MORABITO, Lucile MOLLET, Stéphane CHARPENTIER, Alain LEGRAND.

Centre de Biophysique Moléculaire, CNRS UPR 4301, affiliated with the Université d'Orléans – Pôle Universitaire
Centre Val de Loire, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France

*Laboratoire de Biologie Cellulaire - Microscopie Electronique - Faculté de Médecine de Tours 10, bd Tonnellé B.P.
3223, 37032 TOURS Cedex - FRANCE

Corresponding author: Dr Alain LEGRAND, Centre de Biophysique Moléculaire, Rue Charles Sadron, 45071 Orléans Cedex 2, France.

Tel: +33 2 38 25 55 36

Fax: +33 2 38 25 55 83

E-mail : alain.legrand@cnrs-orleans.fr

Keywords

GALIG gene, Cytogaligin, Luciferase protein-fragment complementation assay, Alpha-synuclein, mitochondria.

Abbreviations: GALIG, Galectin-3 Internal Gene; α SYN, Alpha-synuclein.

Abstract

GALIG, an internal gene to the human galectin-3 gene, encode two distinct proteins, Mitogaligin and Cytogaligin through translation of a unique mRNA in two overlapping alternative reading frames. When overexpressed GALIG induces apoptosis. In cultured cells, Mitogaligin destabilizes mitochondria membranes through interaction with cardiolipin. Little is known regarding the role of Cytogaligin. We show here that Cytogaligin displays multiple subcellular localizations. The protein is evidenced in the cytosol, in the nucleus, at the inner membrane of mitochondria and in the extracellular medium. Cytogaligin is shown to interact with α -Synuclein, the major component of Lewy bodies in Parkinson's disease. Cytogaligin also inhibits α -Synuclein-induced mitochondria fragmentation raising the question of the role of Cytogaligin in relation with α -Synuclein aggregates.

Introduction

LGALS3 locus encodes Galectin-3, a lectin with specificity for beta galactosides [1]. This gene contains, fitted into its own sequences, a second gene whose promoter is located in the second intron [2]. This internal gene was called GALIG standing for Galectin-3 Internal Gene [3]. Two different proteins, designated as galigins, are generated by use of alternative translation initiation sites. In addition their open reading frames are out of frame of the one encoding Galectin-3. Consequently these two proteins are themselves different from Galectin-3 [2]. If such a gene structure could have been previously described as unconventional, recent studies challenged the fundamental concept that mature eukaryotic mRNAs contain a single coding sequence [4]. Indeed, mass spectrometry profiling based techniques revealed that translation of alternative open reading frames from a single mRNA is a common phenomenon. This property could lead to much more proteins that was previously acknowledged and could be a way to expand the genome capacity. This may provide also a mechanism to guarantee the synchronized expression of proteins with functional interactions. GALIG gene transfection experiments showed that the two reading frames are actually translated [2]. The first protein, Mitogaligin, a tryptophan-rich protein, localizes to mitochondria [2,3] and to the nucleus [5]. Mitogaligin amino-acids composition is reminiscent of membrane-interacting Trp-rich antimicrobial peptides such as indolicidin, tritrypticin, and lactoferrin derivatives [6-8] which are known to destabilize anionic membranes [9]. Indeed, use of Mitogaligin-derived peptides revealed the destabilization of mitochondria membranes through specific interaction with cardiolipin, a mitochondria-specific phospholipid [10]. This destabilization induced the release of mitochondrial cytochrome c [3]. These properties explain the cell death program observed in GALIG-transfected cells. This process is antagonized by BclXL and Mcl-1 expression [3,11].

The role of the second protein encoded by GALIG, called Cytogaligin, is much less understood and no specific cellular partner has been characterized. No homology with known proteins could be established. Upon ectopic expression, Cytogaligin was found in different cell compartments, mainly cytosol and nucleus [2]. However several experiments suggested that this protein could also be located at the mitochondria. In this paper, using electron microscopy, we provide the first evidence that Cytogaligin is also localized at the mitochondrial inner membrane. As mitochondria play an essential role in crucial cellular functions including control of cell death and because GALIG expression induced cell death, we were interested in searching for Cytogaligin mitochondrial partners. We have focused on several proteins known to be localized at least partly at the mitochondrial inner membrane. Among these proteins, we show here that Alpha-synuclein (α SYN) interacts with Cytogaligin. A fraction of α SYN is found at the inner membrane of mitochondria where it interacts with lipids and proteins, a process probably involved in mitochondrial fragmentation [12,13]. α SYN oligomerization plays a pivotal role in Parkinson's disease although the mechanism contributing to neural cell death remains not completely understood [14,15]. Furthermore the involvement of α SYN in mitochondria alteration gains more and more weight [16,17].

We also demonstrated that over-expression of CytoGaligin with α SYN decreased α SYN dimerization. Finally, while cells overexpressing α SYN exhibited mitochondrial fragmentation [18], co-expression of CytoGaligin reduced this fragmentation and restored a more tubular pattern. These results suggest that CytoGaligin is a new molecular partner of α SYN and raise its possible role in the evolution of α SYN aggregation.

Results

Mitochondrial localization of CytoGaligin.

When overexpressed after transfection in human HeLa cell line, CytoGaligin fused to EGFP localized to every compartment of the cells as observed under fluorescence microscope. However, careful analysis of EGFP fluorescence localization indicated a heterogeneous distribution of fluorescence associated with intracellular compartments. These compartments can be ascribed to mitochondria upon staining with MitoTracker® Red, a specific staining marker of mitochondria (Fig.1). HeLa cells were then transfected with a vector encoding GALIG mRNA modified to express Mitogaligin fused to EGFP and native CytoGaligin. As previously described [2,3], Mitogaligin-EGFP was associated to mitochondria (Fig.1). Permeabilization of these Mitogaligin-EGFP transfected cells followed by immunofluorescence staining with an anti-CytoGaligin antibody indicated that a fraction of CytoGaligin co-localized to the mitochondria with Mitogaligin-EGFP as showed with the merged pictures (Fig. 1, third row). The absence of CytoGaligin immunolabeling reflects the loss of freely diffusible cytosolic proteins due to permeabilization. In order to precise the submitochondrial distribution of Mitogaligin and CytoGaligin, electron microscopy experiments were undertaken. Vectors expressing Mitogaligin-EGFP or CytoGaligin-EGFP were transfected in HeLa cells and anti-EGFP antibodies coupled to gold particles were used as a probe. As expected, Mitogaligin-EGFP was extensively localized in mitochondria at the mitochondrial internal membrane (Fig.1). Cells transfected with CytoGaligin-EGFP revealed some remaining disseminated gold particles dispersed in the cytosol but also showed a specific labeling of the mitochondrial internal membrane. These results clarify the cellular distribution of CytoGaligin and demonstrate that a fraction of both galigins can co-localized at the mitochondria.

α -Synuclein (α SYN) interaction with CytoGaligin.

In an attempt to search for potential molecular partners of CytoGaligin, we used a Protein-fragment Complementation Assay (PCA) in which each cDNA of two potential interacting partners are fused to one of the two complementary fragments of humanized Gaussia Luciferase (hGLuc1 or hGLuc2) and co-transfected in cultured cells. In case of physical interaction between both protein partners, the two fragments of Gaussia Luciferase, hGLuc1 and hGLuc2 are brought closer and reconstitute Luciferase activity [19] (Fig. 2A). The following proteins were assayed for interaction with CytoGaligin: Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial (OPA1), Mitofusin-2 (MFN2), Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1 (MCL1), Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC1),

ATPase inhibitor, mitochondrial (ATPIF1), 39S Ribosomal Protein L36, mitochondrial (MRPL36), Protein DJ-1 (PARK7), Serine/threonine kinase PINK1, mitochondrial (PINK1), Calcium uptake protein 1, mitochondrial (MICU1), Calcium uniporter protein, mitochondrial (MCU) and Alpha-Synuclein (SNCA). Among all the proteins tested, CytoGaligin interacted with nothing but α SYN (Figure 2). Indeed, co-expression of CytoGaligin-hGLuc1 with α SYN-hGLuc2 led to an intense emission of light (around 15 times above the background) unveiling interactions of CytoGaligin with α -Synuclein (figure 2). The Luc-PCA also evidenced the effective dimerization of CytoGaligin and confirms the α SYN dimerization already extensively described by other authors.

Detection of CytoGaligin in extracellular medium.

It has been shown that α SYN oligomers are secreted in human plasma [22] Secreted α SYN was found in extracellular space associated or not to exosomes [23]. This secreted form of α SYN can be taken up by adjacent neuronal cells in cell cultures or animals [24]. It has been proposed this could be a pathway through which α SYN propagates its deleterious effect in neighborhood cells [23,25]. It was therefore interesting to analyze whether CytoGaligin could be released in the culture medium when interacting with α SYN. This was investigated using the Luciferase complementation assay which was applied to the culture medium of cells transfected with plasmids encoding CytoGaligin-hGLuc1 and α SYN-hGLuc2 (figure 3). A clear positive signal was detected specifying the release of α SYN-CytoGaligin heterodimers and indicating that the interaction persisted in the cellular medium. As expected, dimers of α SYN were also detected in the culture medium. Surprisingly, when cells were transfected with plasmids encoding CytoGaligin-hGLuc1 and CytoGaligin- hGLuc2, i.e. when testing CytoGaligin dimerization, a positive signal was also detected in the culture medium showing that the dimerized form of CytoGaligin was present in the culture medium. The amount of Luciferase activity released in the culture medium was consequent and reached about 75% of the total Luciferase activity produced after transfection (data not shown). It was checked that the Luciferase activity in the culture medium was not the result of Luciferase release from transfection-induced toxicity or gene expression (data not shown). In addition, when Hsc70, a protein known to interact with α SYN was tested for secretion, no signals specific for Hsc70- α SYN dimers were detected in the culture medium (Fig.3). These results indicated that a large part of CytoGaligin was secreted independently of interaction with α SYN.

Inhibition of α SYN dimerization by CytoGaligin expression.

Intraneuronal oligomers and aggregates of α SYN are considered as hallmarks of the Parkinson's disease. It has been suggested that the destabilization of these oligomers and aggregates with α SYN interactors could provide a neuronal protection. In this regard, we have questioned whether CytoGaligin could act as a modulator of α SYN oligomerization. This was evaluated using the adapted Luciferase complementation assay [26]. HeLa cells were transfected with α SYN-hGLuc1 and α SYN-hGLuc2. Modulation of α SYN dimerization was analyzed with a third plasmid encoding or not CytoGaligin (figure 4). The empty vector

pGEM11 was used as a negative control and exhibited the maximum of reconstituted Luciferase activity. β -synuclein (β SYN), an interactor of α SYN, has been described to destabilize α SYN dimers [27,28]. When a vector encoding β SYN was used in place of pGEM11, a large decrease of Luciferase activity was observed as expected. When a vector encoding CytoGaligin was used in place of β SYN, a significant decrease of Luciferase signal (around 60%) was detected as well suggesting that CytoGaligin inhibited α SYN dimerization as β SYN did (figure 4).

Expression of CytoGaligin and inhibition of α SYN-induced mitochondria fragmentation.

α SYN is known to induce mitochondria fragmentation in transfected cells [18]. Cellular consequences of the interaction between α SYN and CytoGaligin were observed on morphology of transfected cells. For that purpose cells were co-transfected with a plasmid encoding the fluorescent fusion protein α SYN-EYFP and a vector leading to CytoGaligin expression or an “empty” (mock) vector as control (figure 5). Additionally, mitochondria were labeled with the red fluorescent probe MitoTacker® Red CMXRos. As expected, α SYN-EYFP localized into the whole cell. In these transfected cells mitochondria exhibited a more punctuate distribution than in non-transfected cells. Interestingly co-transfection with CytoGaligin restored a tubular mitochondrial network. This observation was quantified by counting the number of cells exhibiting tubular or fragmented mitochondria (figure 5). Mock transfected cells appeared to display mainly tubular mitochondria and less frequently fragmented organelles (70% tubular vs 30% fragmented). α SYN-EYFP expression reversed totally this distribution with 70 % of cells displaying fragmented mitochondria. CytoGaligin co-expression with α SYN-EYFP partially counteracted the effect of α -synuclein on mitochondrial fragmentation (54% tubular vs 46% fragmented).

Discussion

The objective of this work was to initiate a study to decipher the role of CytoGaligin, one of the two proteins produced by the GALIG gene. This protein has no homology with known proteins. No obvious structure could be predicted by sequence analysis using protein structure prediction software. Moreover a high probability that CytoGaligin is an intrinsically disordered protein was proposed by analysis with IUPred [29]. The first point of interest was to specify the cellular localization of CytoGaligin. Although the expression of a CytoGaligin-EGFP fusion protein clearly exhibited cytosolic and nuclear localizations, an association with intracellular organelles has also to be considered (figure 1). Indeed, immunoelectron microscopy studies confirmed the cytosolic localization of CytoGaligin but it specified also its association with mitochondria indicating that CytoGaligin is belonging to the growing group of eukaryotic mitochondrial proteins with dual localization [30,31]. The C-terminal part of CytoGaligin is probably facing the matrix side of the mitochondrial inner membrane since gold beads are detected on this side. It should be noted that the mitochondrial localization of CytoGaligin is similar to the one of Mitogaligin, the other protein encoded by the GALIG gene, suggesting that the two proteins could be co-localized in this organelle or could even physically interact. Insofar as Mitogaligin contributes to the destabilization of the

mitochondrial membrane [3,32] it will be interesting to analyze the consequences of such a co-localization of the two galigins, about potential functional interaction, in particular regarding the decrease of the mitochondrial membrane potential and the release of Cytochrome c [3]. Indeed several examples of similar eukaryotic complex structure containing both a reference coding sequence and an alternative open reading frame (ORF), exhibit functional interaction between the two overlapping ORFs. These include particularly INK4a/ARF [33], XLalpha/Alex [34], ATXN1/altATXN1 [35] and MUC1/MUC1-ARF [36]. Remarkably, our results showed that a large part of Cytogaligin was secreted from the cell in the culture medium (figure 3) making it an ubiquitously-localized protein. It is apparent that Cytogaligin does not possess a typical signal peptide for the conventional pathway of protein secretion [37]. It must therefore take one of the unconventional routes of secretion [38,39]. Nowadays a large number of proteins are now known to take this alternative path like the two first described examples, Interleukin-1 [40] and Galectin-1 [41]. It will be interesting to establish whether Cytogaligin, like α SYN, takes the exosome pathway [23], a route especially used for the recovery of secreted proteins. It has been proposed that the recapture of exosomes containing extracellular α SYN oligomers may play a key role in the propagation of Parkinson's disease by allowing the dissemination of toxic α SYN aggregates from neuron to neuron [23]. In this context, it will be important to determine whether Cytogaligin is also prone to be recaptured. In addition, it will be essential to determine whether the unconventional secretion pathway of Cytogaligin is regulated or constitutive. In most cases, these alternative secretion pathways result from cellular stresses [42]. It will be important to determine whether Cytogaligin is associated with a cellular stress and if so which one?

The second objective of this study was to seek molecular partners of Cytogaligin. Since the GALIG gene induced-toxicity revealed mitochondrial damages (leakage of Cytochrome c, dissipation of the membrane potential, organelles' aggregation) [3,32], and insofar as a fraction of each galigin localized in this organelle, we have focused our attention on various mitochondrial proteins that could represent potential partners of Cytogaligin. Eleven proteins were tested by the Luc-PCA test [19]. Among these, only α SYN induced a substantial reconstituted Luciferase activity when co-expressed with Cytogaligin. α SYN is primarily found in the cytosol and not exclusively located in mitochondria [12]. However, it exhibits dual localization and associates with mitochondria substantially in the inner membrane in relation with cardiolipin, a mitochondria specific phospholipid [16,43]. The extent of α SYN mitochondria localization is modulated and depends largely of different stressors [12]. Thus α SYN mitochondrial distribution seems to depend on pathological conditions. Notably, in brain from patients with Parkinson's disease, α SYN accumulates in neuron mitochondria [44]. α SYN promotes its self-aggregation from disordered monomers which contributes to the formation of Lewy bodies in dopaminergic neurons, a hallmark of the disease. Although the pathological consequences of α SYN aggregates are still under debate, they constitute nevertheless a marker of the disease. Different α SYN oligomerization inhibitors and chaperones have

been described and may constitute potential therapeutic anti-parkinsonian agents by their capacity to downregulate oligomerization/aggregation and/or misfolding of α SYN monomers [45,46].

Whether the interaction of Cytogaligin with α SYN has functional consequences remains to be investigated. However, the preliminary results presented in this work make it possible to envisage that Cytogaligin expression modulates α SYN activity. Firstly, Cytogaligin could act as a competitor of α SYN dimerization/oligomerization (figure 4). Secondly, Cytogaligin expression has a negative effect on α SYN-induced mitochondria fragmentation (figure 5). Our results confirmed other studies showing that overexpression of α SYN induces mitochondria fission [18]. However, when Cytogaligin is co-expressed with α SYN, there appears to be a marked decrease in mitochondrial fragmentation. Different hypotheses can be considered regarding the role of Cytogaligin in this process. Cytogaligin could play a protective role against mitochondria fragmentation linked to the overexpression of α SYN. Cytogaligin could act as a chaperone to limit the toxicity of α SYN. In that way, Cytogaligin could have a similar role to the Hsp70 chaperone which limits the formation and toxicity of secreted α SYN oligomers [25]. Conversely, it is possible to envisage a harmful effect. Fragmented mitochondria following the overproduction of α SYN are normally eliminated by mitophagy. The fact that Cytogaligin decreased the mitochondrial fission generated by the expression of α -synuclein could prevent the elimination of damaged mitochondria. The results presented here do not allow to discriminate between these hypotheses. Nonetheless, they offer new interesting perspectives regarding the functions of Cytogaligin and the GALIG gene.

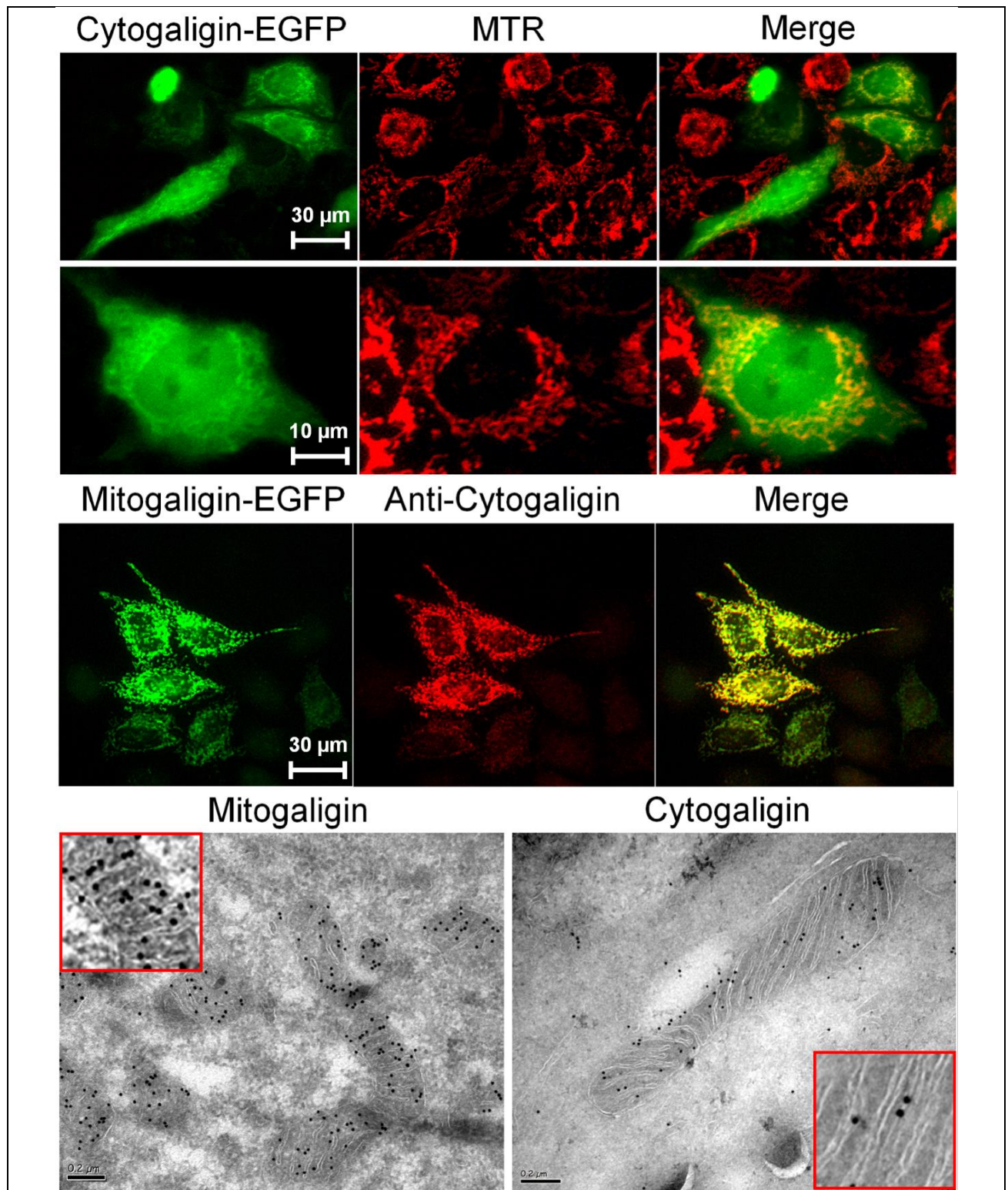


Figure 1. Mitochondrial Cytogaligin localization by fluorescence and electron microscopies.

Two upper rows: HeLa cells were transfected with a vector encoding Cytogaligin-EGFP. Two days later, cells were observed for EGFP fluorescence (Cytogaligin-EGFP column) and for mitochondria staining performed with MitoTracker® Red (MTR column). Third row: Cells were transfected with a plasmid expressing *GALIG* mRNA modified to encode Mitogaligin-EGFP and native Cytogaligin. Mitogaligin was detected with EGFP fluorescence (Mitogaligin-EGFP) and Cytogaligin was visualized by immunodetection (anti-Cytogaligin). Lower row: Cryosections of cells transfected with plasmids encoding Mitogaligin-EGFP (Mitogaligin) or Cytogaligin-EGFP (Cytogaligin) were analyzed by EGFP immunogold labelling and electron microscopy.

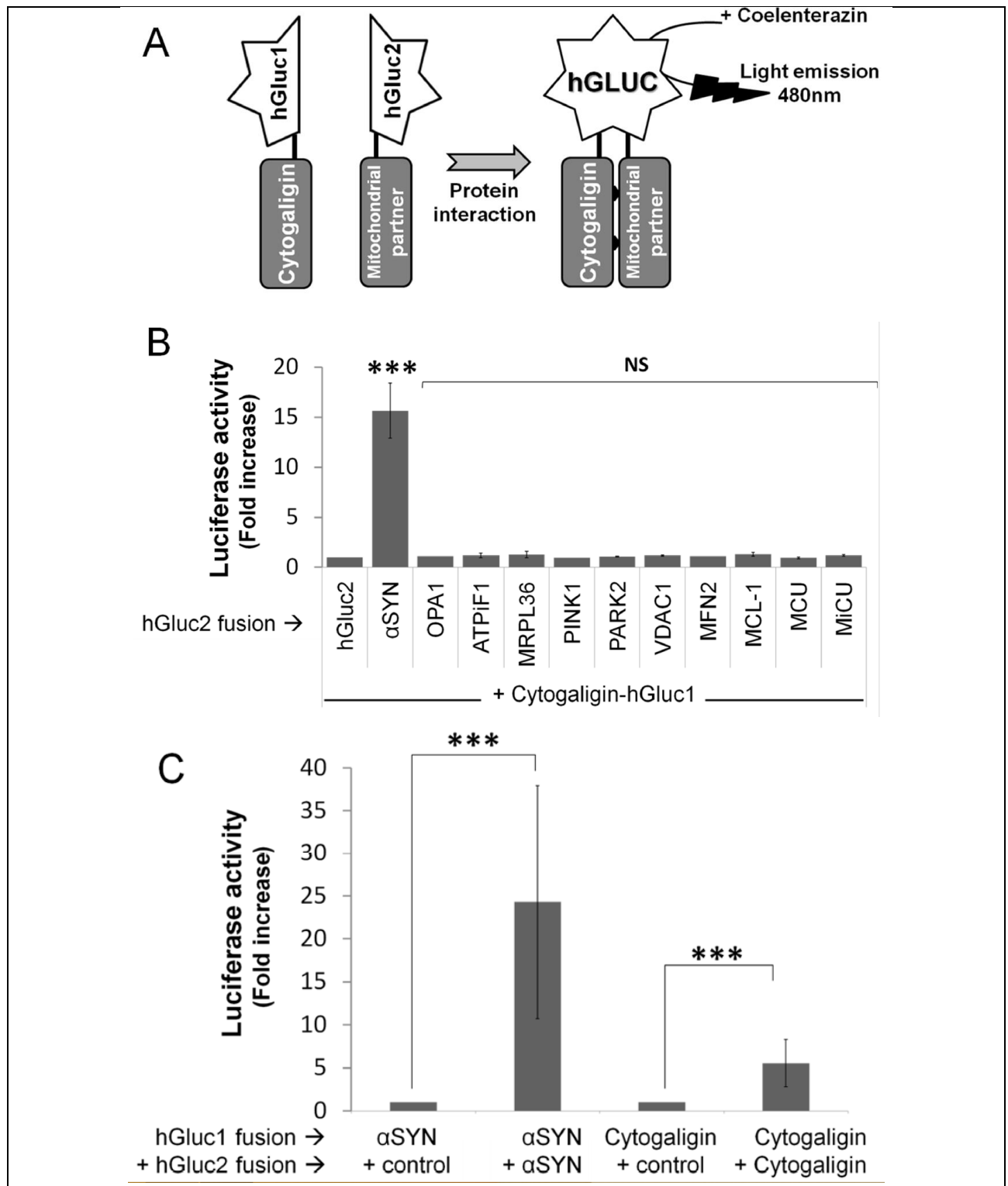


Figure 2: Interaction of Cytoagalin and αSYN.

(A) Schematic representation of Luc-PCA system. Non bioluminescent halves of humanized Gaussia Luciferase 1 and 2 (hGluc1/hGluc2) were fused to the proteins tested for interaction. Protein interaction reconstitutes enzyme activity (see Materials and Methods). (B) HeLa cells were co-transfected with a plasmid encoding Cytoagalin-hGLuc1 and plasmids encoding different proteins fused to the hGLUC2 Luciferase domain. Results were expressed as fold increase in Luciferase activity which represents the normalization of the RLU signal from a couple of proteins to control RLU. Control was defined as RLU obtained from non-interacting proteins namely Cytoagalin and the hGLUC2 domain of Luciferase. (C) Cells were co-transfected with pairs of plasmids to test for αSYN and Cytoagalin dimerization. Data represent means (SD) of at least 5 independent experiments and were analyzed by a Mann and Whitney test (*** $p < 0.001$, NS = not significant).

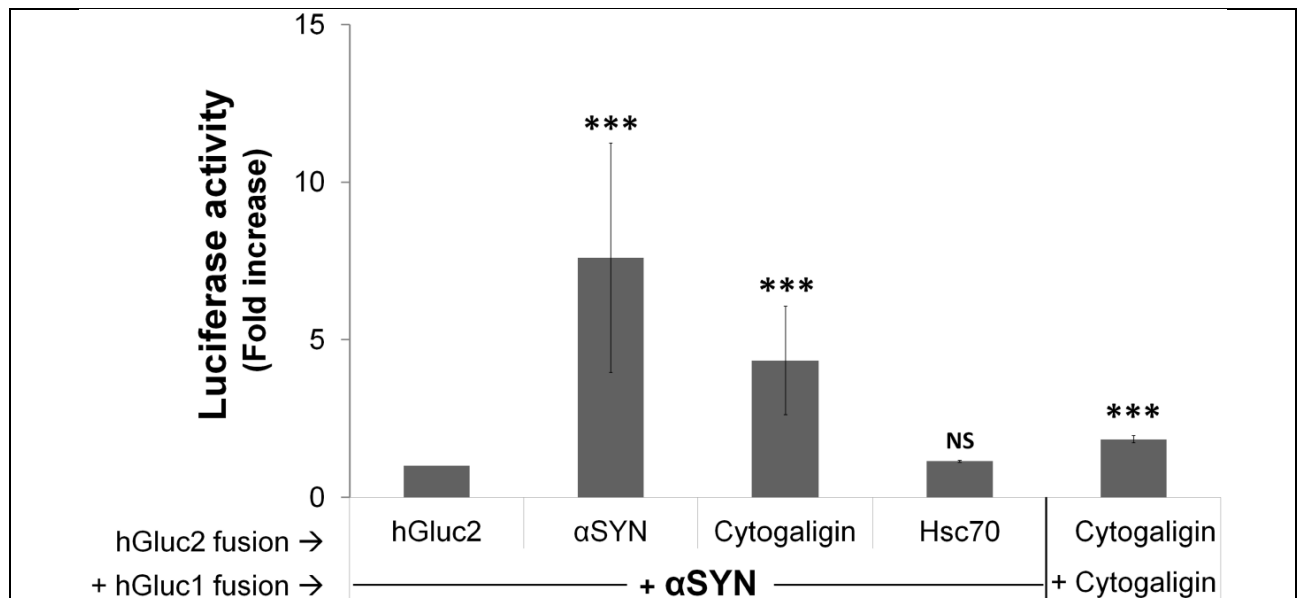


Figure 3: Secretion of Cytogaligin and αSYN homodimers and Cytogaligin-αSYN heterodimers in extracellular medium.

Culture medium of HeLa cells co-transfected with Luc-PCA constructs (hGluc2 fusion and hGluc1 fusion) was assayed for Luciferase activity 48 h after transfection. Hsc70 was used as a control of a non-secreted protein. Culture medium was tested for the presence of αSYN dimers, Cytogaligin-αSYN complex, Hsc70-αSYN complex and Cytogaligin dimers. Fold increase in Luciferase activity was defined as in legend of figure 2. Data represent means (SD) of at least 5 independent experiments and were analyzed by a Mann and Whitney test (**p<0.001, NS = not significant).

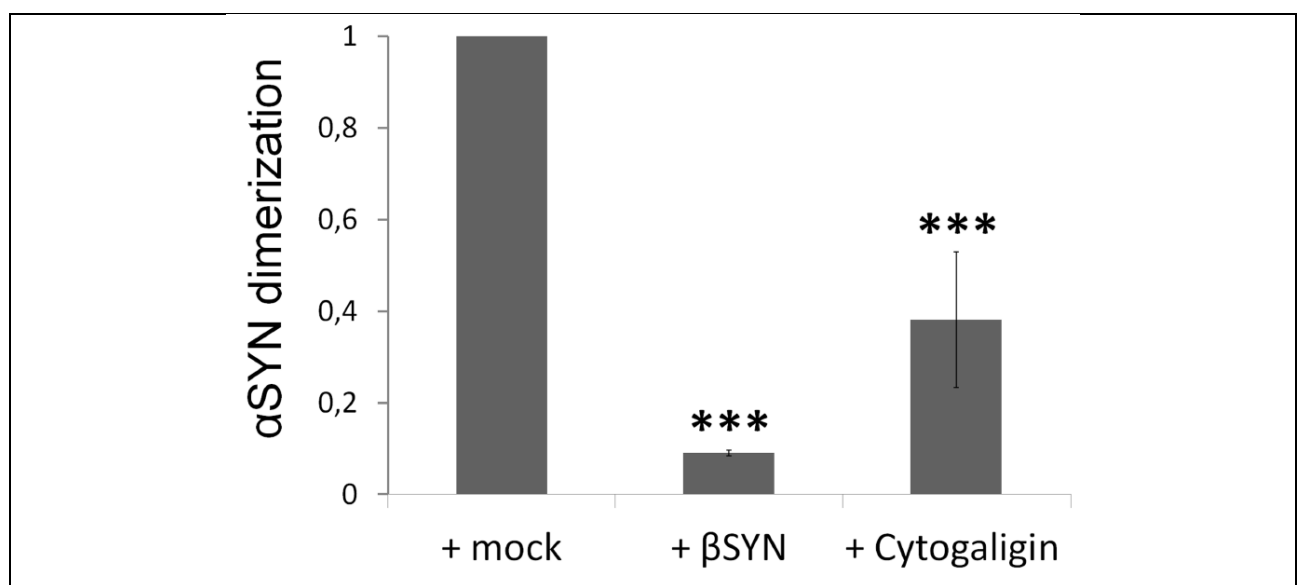


Figure 4: Inhibition of αSYN dimerization by Cytogaligin.

αSYN dimerization was induced in HeLa cells upon co-transfection of a complementary pair of plasmids encoding αSYN-hGLuc1 and αSYN-hGLuc2. A third plasmid encoding Cytogaligin (+Cytogaligin) was added to test the impact on αSYN dimerization. pGEM-11 (+mock) was used as a control to establish reference RLU produced by αSYN dimerization. A vector encoding βSYN (+βSYN) was used as a positive control for inhibition of αSYN dimerization. αSYN represents the normalization of RLU activity to the RLU reference. Data represent means (SD) of at least 5 independent experiments and were analyzed by a Mann and Whitney test (**p<0.001).

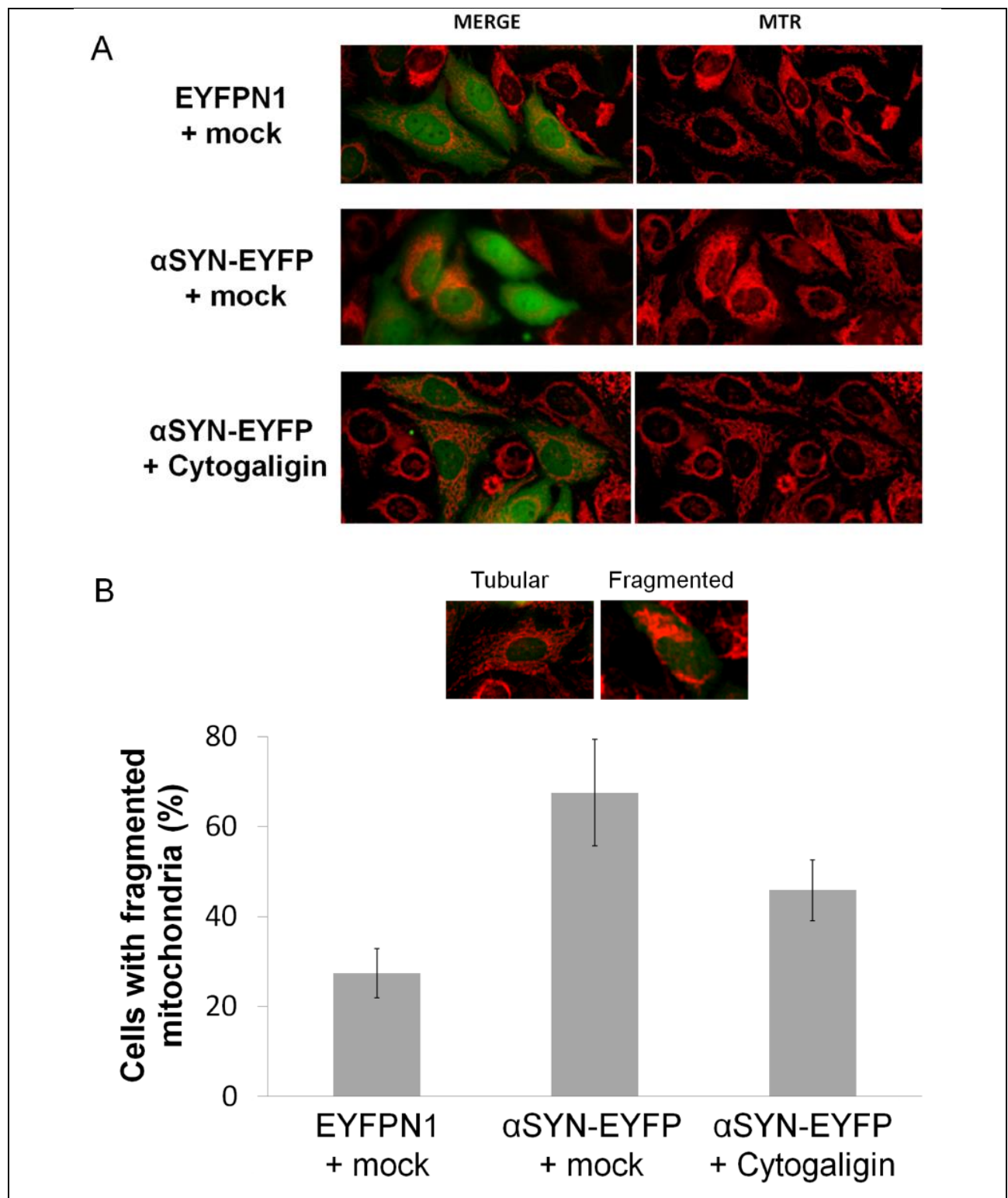


Figure 5: Cytochalasin inhibition of α SYN-induced mitochondrial fragmentation.

(A) HeLa cells were co-transfected with the following plasmids: *upper row*: EYFPN1 (encoding EYFP) and mock (empty plasmid), *second row*: α SYN-EYFP (encoding α SYN-EYFP) and mock, *third row*: α SYN-EYFP and pCytochalasin (encoding Cytochalasin). Fluorescence microscopy was performed to identify EGFP or α SYN-EGFP expressing cells and to analyze mitochondria morphology after MitoTracker® Red labeling (MTR). (B) The two pictures identify typical cells with tubular or fragmented mitochondria visualized with MTR staining. Lower part: Distribution of cells with fragmented mitochondria. At least 170 cells were counted per experiment.

Materials and Methods

Plasmids.

The plasmid pMitogaligin-EGFP encodes both galigins. The EGFP coding sequence is inserted in frame downstream that one of Mitogaligin and Cytogaligin is produced as a non-fusion protein. In the plasmid pCytogaligin-EGFP, the EGFP coding sequence is inserted at the C terminal end of Cytogaligin. This plasmid has been modified, by insertion of silent mutations within the Cytogaligin sequence, to prevent initiation of Mitogaligin translation.

Vectors encoding fusion α SYN-EYFP or Cytogaligin-EYFP were constructed by insertion of the respective cDNA in pEYFP-N3 (Clontech, Mountain View, CA), a plasmid encoding EYFP.

Luciferase-protein complementation assay.

In order to characterize interactors of Cytogaligin, the Luciferase-Protein-fragment Complementation Assay (Luc-PCA) was used. This assay is based on the split Gaussia princeps Luciferase (GLuc) [19]. The cDNA encoding the proteins of interest were fused to cDNA encoding complementary fragments of humanized Gaussia princeps Luciferase, designed as hGLuc1 and hGLuc2 [19]. Interaction of the proteins induces reconstitution of enzyme activity. Plasmids constructs were derived from the two following plasmids, pZip-hGLuc(1) and pZip-hGLuc(2), kindly provided by Dr S. Michnick. Briefly, the cDNA sequences encoding proteins of interest were inserted in place of the Zip sequences in pZip-hGLuc(1) and pZip-hGLuc(2), in frame of the hGLuc1 and hGLuc2 fragments. The following proteins were assayed for interaction with Cytogaligin: Dynamin-like 120 kDa protein, mitochondrial (OPA1), Mitofusin-2 (MFN2), Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1 (MCL1), Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 (VDAC1), ATPase inhibitor, mitochondrial (ATPIF1), 39S ribosomal Protein L36, mitochondrial (MRPL36), Protein DJ-1 (PARK7), Serine/threonine kinase PINK1, mitochondrial (PINK1), Calcium uptake protein 1, mitochondrial (MICU1), Calcium uniporter protein, mitochondrial (MCU) and Alpha-synuclein (SNCA). All constructs were verified by sequencing (Eurofins Genomics, Ebersberg, Germany).

Luciferase assays: 48h after transfection, cells were washed with PBS (phosphate buffered saline, pH 7.4). Luciferase activity was determined using a Mithras LB940 Multimode Microplate Reader by injecting 100 μ l of 15 μ M coelenterazin, a cell permeable Luciferase substrate. When necessary, 100 μ l cell medium was collected for measure of secreted Luciferase. Medium was centrifuged (1500 g for 5 min) and distributed in opaque 96 well plates. One hundred microliters of 15 μ M coelenterazin was added before Luciferase activity reading.

Statistical analyses.

Statistical analyses were carried out using the non-parametric Mann and Whitney test. Values in the figures are expressed as means (SD). At least 5 independent experiments were used for each assay.

Cell transfections.

Plasmids were transfected into HeLa cells (ATCC, CCL-2), maintained in MEM medium supplemented with 10% fetal bovine serum (both from Invitrogen, Carlsbad, CA), 1% Pen/Strep antibiotics, 1% NEAA (non-essential amino acids), 1% pyruvate and incubated at 37°C under 5% CO₂. Cells were seeded at 20.000 cells/well in 96-wells opaque plates (Greiner Bio-One, Les Ulis, France) 24 h prior to transfection for Luciferase-fragment complementation assays or regular 96-wells plates for fluorescence microscopy analysis. Transfections were performed using DNA-polyethylenimine complexes (PEI) [20] as described in [3]. Briefly, 1µg DNA was mixed with 6.75 µl 10 µM PEI solution (Sigma Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) in a total volume of 1 ml of serum-free DMEM (Life Technologies Inc., Rockville, MD). Cells were incubated in this solution for 2 h at 37°C and then placed in fresh EMEM (Life Technologies Inc., Rockville, MD) supplemented with 10% fetal calf serum (Invitrogen, Carlsbad, CA) for 24 h before analysis.

Fluorescence microscopy and Immunofluorescence.

Fluorescence microscopy was performed on an Axiovert 200 microscope (Carl Zeiss S.A.S., Marly-Le-Roi, France) 24 or 48 h after transfection, with fluorescein filters (excitation at 488 nm and detection at 520 nm for EGFP) or filters for red fluorescence (excitation at 650 nm and emission at 670 nm). When necessary, mitochondria were labelled by incubating cells 30 min at 37°C under 5% CO₂ with the red fluorescent probe MitoTracker® Red CMXRos (MTR) (Invitrogen, Carlsbad, CA). Cytogaligin immunofluorescence: Transfected cells, fixed in 4% paraformaldehyde and permeabilized with Triton X-100 0.5%, were incubated overnight at 4°C with a 1/1000 dilution of a polyclonal anti-Cytogaligin antibody in 1% bovine serum albumin-supplemented PBS. Slides were then incubated with a 1/1000 dilution of an anti-rabbit Cy5 (Invitrogen, Carlsbad, CA) antibody and analyzed by fluorescence microscopy.

Electron microscopy.

Immunogold labelling of cryosections were performed according to Tokuyasu for immunoelectron microscopy [21]. Cells were transfected with plasmids encoding Mitogaligin-EGFP or Cytogaligin-EGFP. Forty eight hour post-transfection cells were fixed for 2 hours with 4% paraformaldehyde / 0.1% glutaraldehyde in phosphate buffer (pH 7.6), washed twice with PBS (pH 7.6) for 5 min and centrifuged at 2000 g for 10 min. After removing the supernatant, the cell pellets were included in gelatin 12% and infused with sucrose 2.3 M overnight at 4°C. Ninety nanometers ultra-thin cryosections were made at -110°C on a LEICA UCT cryo-ultramicrotome. Sections were retrieved with Methylcellulose 2% / Sucrose 2.3 M mixture (1:1) and collected onto formvar/carbon coated nickel grids. After removal of gelatin at 37°C, sections were incubated on drops of 1:100 anti-GFP ab6556 (Abcam, Cambridge, UK). After six washes of five minutes each, grids were incubated on drops of PBS containing 1:30 gold-conjugated (10 nm) goat-anti-rabbit IgG (Aurion, Wageningen, Netherlands). Grids were finally washed with six drops of PBS (five minutes each), post-fixed in 1% glutaraldehyde and rinsed with three drops of distilled water.

Contrasting step was performed by incubating grids on drops of uranyl acetate 2% / methylcellulose 2% mixture (1:10). The sections were imaged in a transmission electron microscope at 100 kV (JEOL 1011).

References

- [1] Hirabayashi, J. and Kasai, K. (1993). The family of metazoan metal-independent beta-galactoside-binding lectins: structure, function and molecular evolution. *Glycobiology* 3, 297-304.
- [2] Guittaut, M., Charpentier, S., Normand, T., Dubois, M., Raimond, J. and Legrand, A. (2000). Identification of an Internal Gene to the Human Galectin-3 Gene with Two Different Overlapping Reading Frames That Do Not Encode Galectin-3. *Journal of Biological Chemistry* 276, 2652-2657.
- [3] Duneau, M., Boyer-Guittaut, M., Gonzalez, P., Charpentier, S., Normand, T., Dubois, M., Raimond, J. and Legrand, A. (2005). Galig, a novel cell death gene that encodes a mitochondrial protein promoting cytochrome c release. *Exp Cell Res* 302, 194-205.
- [4] Mouilleron, H., Delcourt, V. and Roucou, X. (2016). Death of a dogma: eukaryotic mRNAs can code for more than one protein. *Nucleic Acids Res* 44, 14-23.
- [5] Robinet, P., Mollet, L., Gonzalez, P., Normand, T., Charpentier, S., Brule, F., Dubois, M. and Legrand, A. (2010). The mitogaligin protein is addressed to the nucleus via a non-classical localization signal. *Biochem Biophys Res Commun* 392, 53-7.
- [6] Selsted, M.E., Novotny, M.J., Morris, W.L., Tang, Y.Q., Smith, W. and Cullor, J.S. (1992). Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils. *J Biol Chem* 267, 4292-5.
- [7] Bellamy, W., Takase, M., Yamauchi, K., Wakabayashi, H., Kawase, K. and Tomita, M. (1992). Identification of the bactericidal domain of lactoferrin. *Biochim Biophys Acta* 1121, 130-6.
- [8] Lawyer, C., Pai, S., Watabe, M., Borgia, P., Mashimo, T., Eagleton, L. and Watabe, K. (1996). Antimicrobial activity of a 13 amino acid tryptophan-rich peptide derived from a putative porcine precursor protein of a novel family of antibacterial peptides. *FEBS Lett* 390, 95-8.
- [9] Nissen-Meyer, J. and Nes, I.F. (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol* 167, 67-77.
- [10] Gonzalez, P., Robinet, P., Charpentier, S., Mollet, L., Normand, T., Dubois, M. and Legrand, A. (2009). Apoptotic activity of a nuclear form of mitogaligin, a cell death protein. *Biochem Biophys Res Commun* 378, 816-20.
- [11] Mollet, L. et al. (2013). Opposing Mcl-1, the GALIG proapoptotic gene is upregulated as neutrophils die and underexpressed in Acute Myeloid Leukemia cells. *Mol Immunol* 56, 123-8.
- [12] Nakamura, K. (2013). alpha-Synuclein and mitochondria: partners in crime? *Neurotherapeutics* 10, 391-9.
- [13] Cole, N.B., Dieuiliis, D., Leo, P., Mitchell, D.C. and Nussbaum, R.L. (2008). Mitochondrial translocation of alpha-synuclein is promoted by intracellular acidification. *Exp Cell Res* 314, 2076-89.
- [14] Kalia, L.V., Kalia, S.K., McLean, P.J., Lozano, A.M. and Lang, A.E. (2013). alpha-Synuclein oligomers and clinical implications for Parkinson disease. *Ann Neurol* 73, 155-69.
- [15] Stefanis, L. (2012). alpha-Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2, a009399.
- [16] Ghio, S., Kamp, F., Cauchi, R., Giese, A. and Vassallo, N. (2016). Interaction of alpha-synuclein with biomembranes in Parkinson's disease -role of cardiolipin. *Prog Lipid Res* 61, 73-82.
- [17] Mullin, S. and Schapira, A. (2013). alpha-Synuclein and mitochondrial dysfunction in Parkinson's disease. *Mol Neurobiol* 47, 587-97.
- [18] Nakamura, K. et al. (2011). Direct membrane association drives mitochondrial fission by the Parkinson disease-associated protein alpha-synuclein. *J Biol Chem* 286, 20710-26.
- [19] Remy, I. and Michnick, S.W. (2006). A highly sensitive protein-protein interaction assay based on Gaussia luciferase. *Nat Methods* 3, 977-9.
- [20] Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M.A., Mergny, M.D., Scherman, D., Demeneix, B. and Behr, J.P. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92, 7297-301.
- [21] Tokuyasu, K.T. (1973). A technique for ultracryotomy of cell suspensions and tissues. *J Cell Biol* 57, 551-65.
- [22] El-Agnaf, O.M., Salem, S.A., Paleologou, K.E., Curran, M.D., Gibson, M.J., Court, J.A., Schlossmacher, M.G. and Allsop, D. (2006). Detection of oligomeric forms of alpha-synuclein protein in human plasma as a potential biomarker for Parkinson's disease. *FASEB J* 20, 419-25.
- [23] Danzer, K.M., Kranich, L.R., Ruf, W.P., Cagsal-Getkin, O., Winslow, A.R., Zhu, L., Vanderburg, C.R. and McLean, P.J. (2012). Exosomal cell-to-cell transmission of alpha synuclein oligomers. *Mol Neurodegener* 7, 42.
- [24] Desplats, P. et al. (2009). Inclusion formation and neuronal cell death through neuron-to-neuron transmission of alpha-synuclein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 13010-5.

- [25] Danzer, K.M., Ruf, W.P., Putcha, P., Joyner, D., Hashimoto, T., Glabe, C., Hyman, B.T. and McLean, P.J. (2011). Heat-shock protein 70 modulates toxic extracellular alpha-synuclein oligomers and rescues trans-synaptic toxicity. *FASEB J* 25, 326-36.
- [26] Savolainen, M.H., Yan, X., Myohanen, T.T. and Huttunen, H.J. (2015). Prolyl oligopeptidase enhances alpha-synuclein dimerization via direct protein-protein interaction. *J Biol Chem* 290, 5117-26.
- [27] Hashimoto, M., Rockenstein, E., Mante, M., Mallory, M. and Masliah, E. (2001). beta-Synuclein inhibits alpha-synuclein aggregation: a possible role as an anti-parkinsonian factor. *Neuron* 32, 213-23.
- [28] Janowska, M.K., Wu, K.P. and Baum, J. (2015). Unveiling transient protein-protein interactions that modulate inhibition of alpha-synuclein aggregation by beta-synuclein, a pre-synaptic protein that co-localizes with alpha-synuclein. *Sci Rep* 5, 15164.
- [29] Dosztanyi, Z., Csizmok, V., Tompa, P. and Simon, I. (2005). IUPred: web server for the prediction of intrinsically unstructured regions of proteins based on estimated energy content. *Bioinformatics* 21, 3433-4.
- [30] Palmfeldt, J. and Bross, P. (2017). Proteomics of human mitochondria. *Mitochondrion* 33, 2-14.
- [31] Ben-Menachem, R., Tal, M., Shadur, T. and Pines, O. (2011). A third of the yeast mitochondrial proteome is dual localized: a question of evolution. *Proteomics* 11, 4468-76.
- [32] Gonzalez, P., Duneau, M., Charpentier, S., Normand, T., Mollet, L., Dubois, M. and Legrand, A. (2007). Destabilization of membranes containing cardiolipin or its precursors by peptides derived from mitogaligin, a cell death protein. *Biochemistry* 46, 7374-82.
- [33] Quelle, D.E., Zindy, F., Ashmun, R.A. and Sherr, C.J. (1995). Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83, 993-1000.
- [34] Klemke, M., Kehlenbach, R.H. and Huttner, W.B. (2001). Two overlapping reading frames in a single exon encode interacting proteins--a novel way of gene usage. *EMBO J* 20, 3849-60.
- [35] Bergeron, D., Lapointe, C., Bissonnette, C., Tremblay, G., Motard, J. and Roucou, X. (2013). An out-of-frame overlapping reading frame in the ataxin-1 coding sequence encodes a novel ataxin-1 interacting protein. *J Biol Chem* 288, 21824-35.
- [36] Chalick, M. et al. (2016). MUC1-ARF-A Novel MUC1 Protein That Resides in the Nucleus and Is Expressed by Alternate Reading Frame Translation of MUC1 mRNA. *PLoS One* 11, e0165031.
- [37] Palade, G. (1975). Intracellular aspects of the process of protein synthesis. *Science* 189, 347-58.
- [38] Nickel, W. and Seedorf, M. (2008). Unconventional mechanisms of protein transport to the cell surface of eukaryotic cells. *Annu Rev Cell Dev Biol* 24, 287-308.
- [39] Rabouille, C. (2017). Pathways of Unconventional Protein Secretion. *Trends Cell Biol* 27, 230-240.
- [40] Rubartelli, A. and Sitia, R. (1991). Interleukin 1 beta and thioredoxin are secreted through a novel pathway of secretion. *Biochem Soc Trans* 19, 255-9.
- [41] Cooper, D.N. and Barondes, S.H. (1990). Evidence for export of a muscle lectin from cytosol to extracellular matrix and for a novel secretory mechanism. *J Cell Biol* 110, 1681-91.
- [42] Giuliani, F., Grieve, A. and Rabouille, C. (2011). Unconventional secretion: a stress on GRASP. *Curr Opin Cell Biol* 23, 498-504.
- [43] Zigoneanu, I.G., Yang, Y.J., Krois, A.S., Haque, E. and Pielak, G.J. (2012). Interaction of alpha-synuclein with vesicles that mimic mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* 1818, 512-9.
- [44] Devi, L., Raghavendran, V., Prabhu, B.M., Avadhani, N.G. and Anandatheerthavarada, H.K. (2008). Mitochondrial import and accumulation of alpha-synuclein impair complex I in human dopaminergic neuronal cultures and Parkinson disease brain. *J Biol Chem* 283, 9089-100.
- [45] Sharma, S.K. and Priya, S. (2017). Expanding role of molecular chaperones in regulating alpha-synuclein misfolding; implications in Parkinson's disease. *Cell Mol Life Sci* 74, 617-629.
- [46] Kalia, L.V. and Kalia, S.K. (2015). alpha-Synuclein and Lewy pathology in Parkinson's disease. *Curr Opin Neurol* 28, 375-81.

Acknowledgements

This work was supported by the Conseil Départemental du Loiret. We thank Dr S. Michnick from the University of Montreal, Canada for the kind gifts of plasmids for the Luc-PCA experiments.

Author contributions

SEH, AS, TN, MD, JBG performed experiments; AL and SC supervised the study; AL, SC, TN and LM designed experiments; SHE, SC, AL wrote the manuscript; SC, FB, LM, SEH, corrected the manuscript.

Amandine SERRANO

EXPRESSION DE GALIG, GÈNE INDUCTEUR DE LA MORT CELLULAIRE, DANS DES CELLULES NORMALES ET PATHOLOGIQUES

Le gène *GALIG*, interne à celui de la *GALECTINE-3*, permet la production de 2 protéines, les Galigines, qui interagissent avec des protéines de l'autophagie. Décrit comme un gène pro-apoptotique, il est inhibé par l'anti-apoptotique Mcl-1. Il est sous-exprimé dans la moelle osseuse (MO) de patients atteints de Leucémies Aiguës Myéloïdes (LAM) M2, pathologie caractérisée par un blocage de la différenciation.

Au cours de cette thèse, j'ai pu montrer que le gène *GALIG* pourrait être impliqué dans la différenciation myéloïde. Son expression augmente de façon croissante chez les LAM en fonction de l'état de différenciation de la cellule leucémique. De plus, bien que faible au diagnostic, l'expression du gène augmente également dans la MO et le sang après traitement de chimiothérapie. Ces observations sont renforcées par des études *in vitro* qui indiquent que l'expression de *GALIG* augmente précocement lors de la différenciation en polynucléaires et en macrophages, avant l'apparition des caractéristiques de maturation terminale. La survie de ces cellules, suite à l'activité de *GALIG* pendant la différenciation, pourrait être assurée grâce à l'augmentation de l'expression du gène anti-apoptotique *MCL1*.

Dans le sang de patients infectés par le Virus de l'Immunodéficience Humaine, traités et sans charge virale, à l'inverse des LAM, il est observé une surexpression de *GALIG*. Ceci suggère une perturbation du système immunitaire. En plus de l'activation de *GALIG*, il est noté une dérégulation de l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'autophagie. Ceci pourrait conduire à une inhibition du niveau basal de l'autophagie chez ces patients, qui pourrait être à l'origine du vieillissement prématuré des cellules sanguines et qui serait liée à l'inflammation chronique observée chez ces patients.

En conclusion, ces résultats nous encouragent à poursuivre les études qui visent à comprendre les mécanismes de régulation de l'expression du gène *GALIG* et les mécanismes d'action des Galigines.

Mots clés : GALIG, LAM, Différenciation, VIH, Autophagie.

EXPRESSION OF GALIG, CELL DEATH INDUCTOR, IN NORMAL AND PATHOLOGICAL CELLS

Embedded within the *GALECTIN-3* gene, *GALIG* gene allows the production of 2 proteins, Galigins, which interact with autophagy proteins. Described as a pro-apoptotic gene, it is inhibited by Mcl-1, an anti-apoptotic protein. It is under-expressed in the bone marrow (BM) of patients with Acute Myeloid Leukemia (AML) M2, a pathology characterized by a differentiation blocking.

During my thesis, I showed that the *GALIG* gene could be involved in myeloid differentiation. The expression of *GALIG* gene gradually increases in AML with the differentiation stage of the leukemic cell. In addition, although weak at diagnosis, *GALIG* gene expression also increases in BM and blood after chemotherapy treatment. These observations are reinforced by *in vitro* studies which indicate that *GALIG* expression increases early during polymorphonuclear and macrophages differentiations, before the onset of terminal maturation features. Cell survival during differentiation could be ensured by the increasing expression of the *MCL1* which could counteract the apoptotic function of *GALIG*.

In the blood of treated HIV-infected patients, without viral load, the transcription rate of *GALIG* is higher when compared to uninfected donors. This suggests a possible dysfunction of the immune system. In addition, several autophagy genes are dysregulated which could lead to the inhibition of the basal level of autophagy in these patients, which in turn could be a cause of the premature aging of blood cells and linked to the chronic inflammation reported for efficient treated HIV patients.

In conclusion, these results encourage us to pursue studies deciphering the mechanisms of regulation of the *GALIG* gene expression and the mechanisms of action of the Galigins.

Key words: GALIG, AML, Differentiation, HIV, Autophagy
Centre de Biophysique Moléculaire – CNRS - UPR 4301
Rue Charles Sadron
45071 ORLEANS CEDEX 2

