DIPLÔME NATIONAL DE DOCTORAT

(Arrêté du 25 mai 2016)

Date de la soutenance : **10 février 2020**

Nom de famille et prénom de l'auteur : **Madame JABBOUR Lea**

Titre de la thèse : *« Rôle des protéines de la famille Bcl-2 au niveau du Réticulum Endoplasmique »*

Résumé

L'apoptose est un type de mort cellulaire programmée largement étudié. Ce processus permet naturellement le renouvellement des cellules, maintient l'homéostasie tissulaire et favorise la morphogenèse lors du développement embryonnaire. Par conséquent, toute perturbation de sa régulation peut avoir d'importantes conséquences comme dans le cas des maladies liées à l'âge ou le cancer. Deux voies apoptotiques principales ont été décrites. La voie extrinsèque est activée lors de l'activation des récepteurs de mort entraînant l'activation en cascade de protéases appelées caspases aboutissant au clivage de nombreuses protéines et à la mort cellulaire. La voie intrinsèque, aussi appelée voie mitochondriale, est déclenchée par divers stimuli intracellulaires ou extracellulaires, comme par exemple un déficit de facteurs de croissance. Dans la voie mitochondriale, l'évènement-clef, déclenchant l'activation des caspases est la libération du cytochrome c hors de la mitochondrie. La famille des protéines Bcl-2 est connue pour contrôler l'apoptose mitochondriale *via* la libération du cytochrome c. Cette famille se compose de deux groupes fonctionnels principaux : les protéines anti-apoptotiques qui inhibent la mort cellulaire et les protéines pro-apoptotiques qui l'induisent. En fait, le deuxième sous-groupe est impliqué dans la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale menant à la libération dans le cytosol de facteurs à potentiel pro-apoptotique comme le cytochrome c. Ce dernier conduit à l'activation des caspases et à l'apoptose. Au sein de la famille Bcl-2, le groupe anti-apoptotique inhibe les pro-apoptotiques en s'y associant et en les séquestrant. Ces protéines anti-apoptotiques sont exprimées dans de nombreux types de tumeurs.

Il a été montré que la surexpression de Bcl-xL, un membre anti-apoptotique de la famille Bcl-2, observée dans de nombreux cancers comme le cancer du sein et le carcinome hépatocellulaire favoriserait le potentiel métastatique et l'invasion des cellules cancéreuses. Il est intéressant de noter

que l'inhibition de l'expression de *bclx* induit chez la souris une mortalité embryonnaire, suggérant un rôle majeur de Bcl-xL dans le développement. En effet, pendant l'ontogenèse neuronale, l'expression de Bcl-xL augmente et reste élevée jusqu'à ce qu'elle atteigne son apogée dans les cellules qui se différencient. Par ailleurs, Bcl-xL joue un rôle majeur dans le système hématopoïétique où il a été démontré que cette protéine favorise la survie des thymocytes et régule la différenciation des mégacaryocytes et érythroblastes. En cancérologie, Bcl-xL, ainsi que Bcl-2 sont des cibles thérapeutiques contre lesquelles plusieurs inhibiteurs spécifiques (BH3 mimétiques) ont été développés, certains étant désormais en phase clinique.

Cette protéine possède une double localisation subcellulaire, dans les mitochondries et au niveau du réticulum endoplasmique (RE). Son rôle dans les mitochondries est lié à l'inhibition de l'apoptose. Cependant, sa fonction au niveau du RE reste mal connue. Au niveau de ce dernier compartiment, Bcl-xL interagit avec les canaux calciques récepteurs de l'inositol triphosphate (IP3R). En dehors de la régulation de l'homéostasie calcique au niveau du RE, on sait peu de choses sur les autres fonctions non canoniques Bcl-xL. Nous nous sommes intéressés au rôle fonctionnel du pool réticulaire de Bcl-xL. Pour cela, nous avons généré des souris génétiquement modifiées par le système de recombinaison Cre-LoxP et avons obtenu des souris exprimant Bcl-xL exclusivement soit au RE (ER-xL) soit à la mitochondrie (Mt-xL). Tout d'abord, nous avons vérifié l'expression du Bcl-xL dans des cellules extraites de plusieurs organes de souris et dans des fibroblastes embryonnaires (MEFs) de type sauvage (WT), ER-xL et Mt-xL obtenus à partir d'embryons de souris. Nous avons validé la localisation de cette protéine dans ces MEFs par fractionnement subcellulaire, immunofluorescence et marquage ImmunoGold. Ensuite, nous avons effectué des tests de mort cellulaire sur les MEFs en les traitant avec des drogues cytotoxiques tels que la Staurosporine. Nous avons montré que les MEFs ER-xL sont plus vulnérables à la Staurosporine mais plus résistantes aux inducteurs de stress ER comme la Thapsigargine. De plus, l'analyse des marqueurs de la réponse aux protéines non-repliées ou Unfolded Protein Response (UPR) a montré que les MEFs ER-xL répondaient de façon atténuée aux inducteurs du stress du RE. Nous avons émis l'hypothèse que la résistance observée pourrait impliquer une régulation des échanges de calcium au niveau du RE. En effet, nous avons pu montrer que Bcl-xL interagit avec IP3R (par Proximity Ligation Assay) et diminue la libération de calcium médiée par IP3R (par microscopie confocale et dosage du calcium-45). En utilisant des inhibiteurs spécifiques des canaux IP3R nous avons établi un lien entre la résistance vis à vis du stress du RE et la diminution de la perméabilité de IP3R provoquée par Bcl-xL.

En résumé nos données ont permis de mettre en évidence un nouveau rôle de Bcl-xL au niveau du RE, qui, en régulant négativement la libération de calcium *via* IP3R, protège contre le stress du RE.

En nous basant sur les fonctions non canoniques des protéines Bcl-2 et sur le nouveau rôle de Bcl-xL que nous avons mis en évidence, nous avons souhaité savoir si ces fonctions étaient conservées au cours de l'évolution des métazoaires. En effet, après la découverte du gène Bcl-2, de nombreux membres de cette famille ont émergé chez l'homme et chez d'autres espèces comme l'hydre et les

nématodes. Nous nous sommes intéressés à une branche basale des métazoaires appelée placozoaire. L'un des représentants de cet embranchement est *Trichoplax adhaerens* (T. adhaerens.). Il s'agit d'un petit organisme d'environ un millimètre de diamètre, plat, dépourvu de structures internes et d'organes avec seulement six types cellulaires. T. adhaerens possède un génome plus petit que celui de la majorité des métazoaires, mais il présente un contenu et une structure génétique conservés au sein du phylum. Il a été démontré que T. adhaerens est capable d'induire une apoptose en réponse à certains agents cytotoxiques. Le génome de T. adhaerens a été séquencé en 2008 ; nous avons pu mettre en évidence que quatre gènes codant potentiellement pour des protéines ayant une similarité structurelle avec des protéines Bcl-2 multidomaines. Nous les avons nommés trBcl-2Like (trBcl-2L). Les analyses phylogénétiques ont identifié deux d'entre eux comme facteurs anti-apoptotiques (trBcl-2L1 et -2L2) et les deux autres comme pro-apoptotiques (trBcl-2L3 et -2L4). Nous avons pu démontrer que trBcl-2L3 est une protéine de type Bax capable d'induire une perméabilisation de la membrane externe mitochondriale. En revanche, trBcl-2L4 est un homologue de type Bak au plan structural, mais agit comme sensibilisateur BH3-only, réprimant les activités anti-apoptotiques de trBcl-2L1 et trBcl-2L2. Enfin, nous avons démontré la double localisation subcellulaire des trBcl-2L1 et trBcl-2L2 présentes à la fois à la mitochondrie et au RE. Dans ce dernier cas, il a été démontré que le trBcl-2L1 contrôle les flux calciques dépendants de IP3R. Dans l'ensemble, ces données suggèrent que la pléiotropie des protéines Bcl-2 serait conservée dans l'évolution et que, en plus de réguler l'apoptose, elles sont impliquées depuis l'origine dans d'autres processus cellulaires dépendant notamment du calcium.

En conclusion, nos données ont mis en lumière une nouvelle fonction de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL au RE, elles renforcent également l'idée selon laquelle les fonctions non canoniques des membres de la famille Bcl-2 ont été conservées au cours de l'évolution, depuis les organismes les plus primitifs.